

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

Pâmela Billig Mello Carpes

**PARTICIPAÇÃO DA VIA NTS-PGI-LC-HIPOCAMPO (NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO – NÚCLEO PARAGIGANTOCELULAR – *LOCUS COERULEUS* – HIPOCAMPO) NA CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS**

Porto Alegre, 2010.

Pâmela Billig Mello Carpes

**Participação da via NTS-PGI-LC-Hipocampo (Núcleo do Trato Solitário –  
Núcleo Paragigantocelular – *Locus Coeruleus* – Hipocampo) na  
consolidação da memória de reconhecimento de objetos**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor em Ciências Biológicas: Fisiologia.

Orientador: Dr. Iván Izquierdo

Porto Alegre, 2010.

## CATALOGAÇÃO NA FONTE

C297p Carpes, Pâmela Billig Mello  
Participação da via NTS-PGI-LC-Hipocampo (Núcleo do Trato Solitário – Núcleo Paragigantocelular – Locus Coeruleus – Hipocampo) na consolidação da memória de reconhecimento de objetos. / Pâmela Billig Mello Carpes. - Porto Alegre: Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

161 f.: il.

**Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Saúde: Fisiologia, Porto Alegre, BR-RS, 2010.**

1. Neurologia. 2. Memória declarativa. 3. Noradrenalina. 4. Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro. 5. Tarefa de reconhecimento de objeto. I. Título. II. Izquierdo, Ivan Antonio, orientador.

CDU: 616.8

Pâmela Billig Mello Carpes

**Participação da via NTS-PGI-LC-Hipocampo (Núcleo do Trato Solitário –  
Núcleo Paragigantocelular – *Locus Coeruleus* – Hipocampo) na  
consolidação da memória de reconhecimento de objetos**

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Dra. Wania Partata

---

Dr. Marino M. Bianchin

---

Dra. Janine Inez Rossato

---

Dra. Márcia L. F. Chaves (suplente)

## AGRADECIMENTOS

Existem pessoas que não estão na nossa vida à toa. Estas pessoas tornam a nossa vida mais alegre, são companheiras nos momentos felizes e também nos tristes e dividem conosco os mais variados tipos de (des)afinidades, além de compartilhar conosco segredos e angústias comuns. São assim as pessoas a quem não posso deixar de agradecer, pois tornaram este momento possível, e espero, sinceramente, que estejam presentes em minha vida sempre, independentemente da distância geográfica.

Agradeço ao meu marido **Felipe**, por entender e dividir comigo os sonhos de jovem pesquisador que almeja coisas talvez inalcançáveis dentro da ciência. Amo você por todas as coisas que temos em comum e também por aquelas que nos diferenciam. Agradeço meu filho **Vítor**, por compartilhar a mamãe com o laboratório e com os livros desde sempre. Você é uma criança adorável e meu amor por você não tem limites.

Agradeço meus pais, **Elena** e **Reynaldo**, por terem me dado o exemplo que impulsionou meus sonhos; e meu irmão **Reynaldo**, por todos os momentos de confidências e dúvidas compartilhados.

Agradeço a meus **familiares** que fazem parte de uma família única! Sua ajuda foi imprescindível para minha formação!

Agradeço ao mestre **Izquierdo** por tudo. Por me receber em seu laboratório e me ensinar tanto! Não há palavras para descrever a admiração que tenho por você.

Agradeço ao **Martín**, especialmente por esses anos de doutorado, nos quais você depositou confiança no meu trabalho e me fez assim pesquisadora de

fato.

Agradeço à minha amiga **Janine**, pelo exemplo, pela amizade e pelos ensinamentos compartilhados.

Agradeço à **Julia** e à **Siomara**, por dividirem os últimos meses de trabalho comigo e me auxiliarem tanto nesta última etapa. Muito obrigada, embora nossa relação de amizade e trabalho não tenha chegado ao fim!

Agradeço à **Cla**, à **Cris**, à **Andressa**, à **Gabi**, à **Dagi** e à **Nati** pelos inúmeros momentos de ajuda nos experimentos e pela deliciosa amizade que criamos.

Agradeço a constante presença, carinho e apoio da **Carol**, da **Jô**, da **Jú** e da **Lia**. Vocês são pessoas muito especiais!

Agradeço também a amizade dos meninos. Agradeço ao **Ramón** e ao **Lucas** pelos momentos de convivência e risadas, ao **Fernando**, colega de PPG, pelas angústias e dúvidas divididas, ao **Weber**, por comandar brilhantemente o “lado negro da força” e ao **Cristiano** por seu auxílio imprescindível nas minhas análises histológicas.

Agradeço também à **CAPES**, por permitir que eu desenvolvesse este trabalho através do auxílio financeiro fornecido.

Agradeço à **PUCRS**, por possibilitar a realização desta pesquisa nas dependências do Centro de Memória.

Agradeço ao **PPG Fisiologia**, pela vaga no programa e por toda a assistência dada pela coordenação, funcionários e professores.

Agradeço aos colegas da **UNIPAMPA Uruguiana**, pela compreensão da importância deste período e da necessidade de minha presença no laboratório em Porto Alegre.

## RESUMO

Existem crescentes evidências sobre a contribuição da liberação de noradrenalina (NA) central na consolidação das memórias. Teoricamente, o Núcleo do Trato Solitário (NTS) recebe informações e diversos estímulos periféricos, que são então projetados ao Núcleo Paragigantocelular (PGi). Este, por sua vez, utiliza neurotransmissores, predominantemente excitatórios, para influenciar a ativação do *Locus Coeruleus* (LC). Então, o LC envia projeções noradrenérgicas ao hipocampo e à amígdala, influenciando os processos mnemônicos. Aqui nós demonstramos que a inibição pelo muscimol do NTS, PGi ou LC até 3 horas após o treino na tarefa de reconhecimento de objetos (RO) impede a consolidação da memória medida 24 h após o treino. Adicionalmente, a infusão de timolol, um antagonista de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, na região CA1 do hipocampo também impede a consolidação deste tipo de memória. A infusão de NA na região CA1 do hipocampo não altera a retenção da memória, mas, reverte o prejuízo causado pela inibição do NTS, PGi ou LC. A infusão de NMDA no LC após a inibição do NTS ou PGi também reverte essa amnésia. Concomitantemente, verificamos que a inibição NTS, PGi ou LC bloqueia o aumento da expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, do inglês *brain-derived neurotrophic factor*) que ocorre 120 min após o treino na tarefa de reconhecimento de objetos na região CA1 do hipocampo. Também a infusão de NA na região CA1 do hipocampo após a inibição do NTS, PGi ou LC ou de NMDA no LC após a inibição do NTS ou PGi promovem novamente o aumento do BDNF 120 min após o treino no RO. Com isso conclui-se que a ativação da via

NTS-PGi-LC-Hipocampo é necessária para que ocorra consolidação da memória de RO, na qual desempenha um papel o BDNF hipocampal.

**Palavras-chave:** Memória declarativa. Retenção. BDNF. Noradrenalina. Tarefa de Reconhecimento de Objetos.



## ABSTRACT

There is evidence of the contribution of brain noradrenaline release (NA) to memory consolidation. The Nucleus of the Solitary Tract (NTS) receives information originated by peripheral stimuli and projects to the Paragigantocellularis Nucleus (PGi), which influences the *Locus Coeruleus* (LC) through excitatory neurotransmitters. The LC sends noradrenergic projections to the hippocampus and amygdala, influencing the memory processes. Here we show that inhibition by muscimol of NTS, PGi or LC up to 3 h after object recognition training impairs the consolidation of the memory measured 24 h later. Additionally, the infusion of timolol in the CA1 region of hippocampus also inhibits consolidation of this type of memory. The infusion of NA into the CA1 region of hippocampus does not alter memory consolidation of this task, but reverts the deleterious effect of NTS, PGi or LC inhibition. The infusion of NMDA in LC after inhibition of NTS or PGi also reverts the amnesia. Concomitantly, the inhibition of NTS, PGi or LC blocks the increase of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in CA1 that occurs 120 min after training in the object recognition task. Further, the infusion of NA in CA1 after inhibition of NTS, PGi or LC; or of NMDA in LC after inhibition of NTS or PGi promotes the BDNF increase seen 120 min after object recognition training. Thus, it is concluded that the activation of NTS-PGi-LC-Hippocampus pathway is necessary for consolidation of the object recognition memory, and hippocampal BDNF is involved in this process.

**Keywords:** Declarative memory. Retention. BDNF. Noradrenaline. Object Recognition task.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT .....	9
I INTRODUÇÃO .....	19
1.1 Memória.....	19
1.2 A memória de reconhecimento de objetos.....	23
1.3 O papel do hipocampo na consolidação das memórias .....	26
1.4 O sistema noradrenérgico e a memória.....	29
1.5 A via NTS-PGi-LC e seu papel na consolidação da memória.....	32
1.6 Hipótese.....	36
1.7 Objetivos.....	37
1.8 Justificativa .....	39
II MATERIAL E MÉTODOS .....	40
2.1 Desenho do estudo.....	40
2.2 Amostra e critérios de inclusão.....	40
2.3 Procedimentos.....	41
2.3.1 Cirurgia estereotáxica .....	41
2.3.2 Manipulação dos animais.....	42
2.3.3 Etapa I: Procedimentos farmacológicos/comportamentais:.....	43
2.3.3.1 O paradigma do reconhecimento de objetos (RO) .....	43
2.3.3.2 Tratamento farmacológico .....	45
2.3.3.3 Controle histológico da região estudada.....	46
2.3.3.4 Experimentos comportamentais .....	47
2.3.3.4.1 Experimento 1 – participação do NTS na consolidação da memória de RO.....	47
2.3.3.4.2 Experimento 2 – participação do PGi na consolidação da memória de RO.....	48
2.3.3.4.3 Experimento 3 – participação do LC na consolidação da memória de RO.....	49
2.3.3.4.4 Experimento 4 – necessidade de noradrenalina na região CA1 do hipocampo para a consolidação da memória de RO .....	50
2.3.3.4.5 Experimento 5 – necessidade de noradrenalina na amígdala central e basolateral para a consolidação da memória de RO.....	51
2.3.3.4.6 Experimento 6 – efeitos da noradrenalina na região CA1 do hipocampo para a consolidação da memória de RO .....	52
2.3.3.4.7 Experimento 7 – se a inibição do NTS provoca amnésia na tarefa de RO pela via aqui proposta, a injeção de noradrenalina na região CA1 do hipocampo seria capaz de reverter tal efeito.....	53
2.3.3.4.8 Experimento 8 – se a inibição do PGi provoca amnésia na tarefa de RO pela via aqui proposta, a injeção de noradrenalina na região CA1 do hipocampo seria capaz de reverter tal efeito.....	53
2.3.3.4.9 Experimento 9 – se a inibição do LC provoca amnésia na tarefa de RO pela via aqui proposta, a injeção de noradrenalina na região CA1 do hipocampo seria capaz de reverter tal efeito .....	54

2.3.3.4.10 Experimento 10 – se a injeção de noradrenalina na região CA1 do hipocampo melhora a persistência da memória de longa duração na tarefa de RO, a estimulação do LC deveria mimetizar esta ação. ....	55
2.3.3.4.11 Experimento 11 – se a inibição do NTS provoca amnésia na tarefa de RO pela via aqui proposta, a injeção de NMDA no LC seria capaz de reverter tal efeito.....	56
2.3.3.4.12 Experimento 12 – se a inibição do PGI provoca amnésia na tarefa de RO pela via aqui proposta, a injeção de NMDA no LC seria capaz de reverter tal efeito.....	57
2.3.3.5 Campo Aberto (CA) .....	58
2.3.3.6 Labirinto em Cruz Elevado (LCE) .....	59
2.3.3.7 Esquiva Inibitória (EI).....	60
2.3.4. Etapa II: Procedimentos bioquímicos .....	61
2.3.4.1 <i>Western blot</i> .....	62
2.3.4.2 Reagentes .....	63
2.4 Métodos estatísticos .....	64
2.5 Aspectos Éticos .....	65
III RESULTADOS .....	66
3.1 O NTS participa da consolidação da memória de RO .....	66
3.2 O PGI participa da consolidação da memória de RO .....	67
3.3 O LC participa da consolidação da memória de RO.....	70
3.4 A noradrenalina é necessária para a consolidação da memória .....	72
3.5 A infusão de noradrenalina na região CA1 do hipocampo promove a persistência da memória de RO .....	74
3.6 A infusão de NMDA no LC promove a persistência da memória de RO.....	76
3.7 As drogas que tiveram efeito amnésico não alteraram a ansiedade e a atividade exploratória dos animais nem a integridade funcional das estruturas que receberam a infusão .....	77
3.8 A infusão de noradrenalina na região CA1 do hipocampo reverte o efeito amnésico causado pela inibição do NTS, PGI e LC .....	79
3.9 A infusão de NMDA no LC reverte o efeito amnésico causado pela infusão de muscimol no NTS e PGI após o treino na tarefa de RO .....	82
3.10 As drogas ou combinações de drogas administradas não alteraram o tempo total de exploração dos objetos durante o teste na tarefa de RO .....	84
3.11 A inativação do NTS, PGI ou LC com muscimol imediatamente após o treino no RO impede que ocorra o aumento da expressão de BDNF decorrente do aprendizado 120 min após o mesmo.....	84
3.12 A inativação do NTS, PGI ou LC com muscimol imediatamente após o treino no RO não altera a expressão de tubulina 120 min após o aprendizado.87	
3.13 A infusão de noradrenalina na região CA1 do hipocampo imediatamente após a infusão de muscimol no NTS, PGI ou LC permite que ocorra o aumento da expressão de BDNF decorrente do aprendizado 120 min após este.....	89
3.14 A infusão de noradrenalina na região CA1 do hipocampo imediatamente após a infusão de muscimol no NTS, PGI ou LC não altera a expressão de tubulina 120 min após este.....	91
3.15 A infusão de NMDA no LC imediatamente após a infusão de muscimol no NTS ou PGI permite que ocorra o aumento da expressão de BDNF decorrente do aprendizado 120 min após este.....	93

3.16 A infusão de NMDA no LC imediatamente após a infusão de muscimol no NTS, ou PGI não altera a expressão de tubulina 120 min após este.....	94
IV DISCUSSÃO .....	96
V CONCLUSÕES.....	103
VI PERSPECTIVAS FUTURAS.....	105
REFERÊNCIAS .....	107
ANEXOS .....	124

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Classificação das memórias de longa duração de acordo com o conteúdo .....	21
Tabela 2. Infusões bilaterais de muscimol (MUS) intra-NTS/PGi/LC e intra-CA1 de timolol (TIM), não tem efeito sobre a atividade locomotora e exploratória, ansiedade ou integridade funcional do NTS, PGI, LC e CA1. ....	79
Tabela 3. A administração intra-estrutura de muscimol, timolol, noradrenalina, NMDA ou combinações destas drogas não afetou a exploração na tarefa de RO. ....	84

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fases de formação da memória e sua relação com os tipos de memória de acordo com o tempo de duração.....	19
Figura 2. (A) Principais áreas envolvidas na formação das memórias declarativas. (B) Localização principal dos neurônios dos diversos sistemas moduladores .....	23
Figura 3. Ratos Wistar machos são capazes de aprender na tarefa de RO (CONT), ratos privados da mãe não (DEP). O exercício físico crônico não altera a consolidação da memória (EXE; DEP+EXE). .....	26
Figura 4. Localização do hipocampo no cérebro humano.....	28
Figura 5. Formação hipocampal de um rato e esquema da circuitaria hipocampal. ....	29
Figura 6. Distribuição da inervação noradrenérgica no encéfalo de um rato (corte sagital).....	30
Figura 7. Localização do Núcleo do Trato Solitário (Sol) no encéfalo do rato (corte sagital).....	33
Figura 8. Localização do Núcleo Paragigatocelular (LPGi) no encéfalo do rato (corte sagital).....	34
Figura 9. Localização do Locus Coeruleus (LC) no encéfalo do rato (corte sagital). ....	35
Figura 10. Esquema da via neuronal estudada.....	36
Figura 11. Foto do animal sendo submetido à cirurgia estereotáxica para a implantação de cânulas de infusão na região CA1 do hipocampo dorsal. ....	42
Figura 12. Esquema da tarefa de RO.....	44
Figura 13. Locais de ação das drogas utilizadas na via estudada. ....	46
Figura 14. Esquema do experimento 1. ....	48
Figura 15. Esquema do experimento 2. ....	49
Figura 16. Esquema do experimento 3. ....	50
Figura 17. Esquema do experimento 4. ....	51
Figura 18. Esquema do experimento 5. ....	51
Figura 19. Esquema do experimento 6. ....	52
Figura 20. Esquema do experimento 7. ....	53
Figura 21. Esquema do experimento 8. ....	54
Figura 22. Esquema do experimento 9. ....	55
Figura 23. Esquema do experimento 10. ....	56
Figura 24. Esquema do experimento 11. ....	57
Figura 25. Esquema do experimento 12. ....	58
Figura 26. Aparato utilizado para a tarefa de Campo Aberto. ....	59
Figura 27. Aparato utilizado para a tarefa de Labirinto em Cruz Elevado. ....	60
Figura 28. Esquema da tarefa de Esquiva Inibitória. ....	61
Figura 29. A inibição do NTS com muscimol 0 min e 3 h, mas não 6 h após o treino prejudica a retenção da MLD de reconhecimento de objetos.....	67
Figura 30. A inibição do PGi com muscimol 0 min e 3 h, mas não 6 hs após o treino prejudica a retenção da MLD de reconhecimento de objetos.....	69
Figura 31. A inibição do LC com muscimol 0 min e 3 h, mas não 6 h após o treino prejudica a retenção da MLD de reconhecimento de objetos. ....	71

Figura 32. A infusão do antagonista $\beta$ -adrenérgico timolol na região CA1 do hipocampo dorsal (CA1; A), mas não na amígdala basolateral (BSL AMY; B) ou central (CNT AMY; C) 0 min após o treino prejudica a retenção da MLD de reconhecimento de objetos. ....	73
Figura 33. A infusão de noradrenalina na região CA1 do hipocampo 0 min após o treino não altera a retenção da MLD de reconhecimento de objetos testada 24 h após o aprendizado. ....	74
Figura 34. A infusão de noradrenalina na região CA1 do hipocampo 0 min após o treino promove persistência da MLD de reconhecimento de objetos testada 21 dias após o aprendizado. ....	76
Figura 35. A infusão de NMDA no LC 0 min após o treino promove persistência da MLD de reconhecimento de objetos testada 21 dias após o aprendizado. ....	77
Figura 36. A infusão de noradrenalina na região CA1 do hipocampo imediatamente após a infusão de muscimol no NTS (A), PGI (B) e LC (C) 0 min após o treino na tarefa de reconhecimento de objetos reverte a amnésia causada pelo muscimol. ....	81
Figura 37. A infusão de NMDA no LC imediatamente após a infusão de muscimol no NTS (A) e PGI (B) 0 min após o treino na tarefa de reconhecimento de objetos reverte a amnésia causada pelo muscimol. ....	83
Figura 38. O treino na tarefa de reconhecimento de objetos promove um aumento da expressão de BDNF 120 min após o aprendizado; este aumento é bloqueado pela infusão de muscimol no NTS (A), PGI (B) e LC (C). ....	86
Figura 39. A infusão de muscimol no NTS (A), PGI (B) e LC (C) após o treino na tarefa de RO não altera a expressão de tubulina 120 min após o aprendizado. ...	88
Figura 40. A infusão de NA na região CA1 do hipocampo imediatamente após a infusão de muscimol no NTS (A), PGI (B) ou LC (C) logo após o treino na tarefa de RO permite que ocorra o aumento da expressão de BDNF decorrente do aprendizado 120 min após o treino. ....	90
Figura 41. A infusão de NA na região CA1 do hipocampo imediatamente após a infusão de muscimol no NTS (A), PGI (B) ou LC (C) logo após o treino na tarefa de RO não altera a expressão de tubulina 120 min após o treino. ....	92
Figura 42. A infusão de NMDA no LC imediatamente após a infusão de muscimol no NTS (A) ou PGI (B) logo após o treino na tarefa de RO permite que ocorra o aumento da expressão de BDNF decorrente do aprendizado 120 min após o treino. ....	94
Figura 43. A infusão de NMDA no LC imediatamente após a infusão de muscimol no NTS (A) ou PGI (B) logo após o treino na tarefa de RO não altera a expressão de tubulina 120 min após o treino. ....	95
Figura 44. Esquema da via de sinalização intracelular na célula nervosa da região CA1 do hipocampo dorsal após a estimulação noradrenérgica. ....	102

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AMPC – Adenosina Monofosfato Cíclica

AMY – Amígdala

ANOVA – Análise de Variância

BCA – Ácido Bicinconínico , do inglês *Bicinchoninic Acid*

BDNF – Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro, do inglês *Brain-Derived Neurotrophic Factor*

BSL – Basolateral

CA – Campo Aberto

CA1 – Região CA1 do hipocampo dorsal, do latim *Cornu Ammonis* (Corno de Ammon), denominação usada antigamente para o Hipocampo.

CA3 – Região CA3 do hipocampo dorsal

CNT – Central

CREB – Elemento de Ligação à Proteína Responsivo ao AMPC, do inglês *cAMP-Response Element-Binding Protein*

DP – Desvio-Padrão

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético, do inglês *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*

EI – Esquiva Inibitória

EGTA – Ácido Glicol Tetra-Acético, do inglês *Ethylene Glycol Tetraacetic Acid*

GTP – Guanosina Trifosfato

Hab – Habitudo

HCl – Ácido Clorídrico



HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Performance ou Pressão, do inglês *High Performance Liquid Chromatography or High Pressure Liquid Chromatography*

h – Hora(s)

LC – *Locus Coeruleus*

LCE – Labirinto em Cruz Elevado

LTP – Potenciação de Longa Duração, do inglês *Long-Term Potentiation*

MCD – Memória de Curta Duração

min – Minuto(s)

MLD – Memória de Longa Duração

MT – Memória de Trabalho

MUS – Muscimol

NaCl – Cloreto de Sódio

NaF – Fluoreto de Sódio

NA – Noradrenalina

NMDA – N-metil D-aspartato

NTS – Núcleo do Trato Solitário

*P* – Significância Estatística

pCREB – CREB fosforilado

pH – Potencial Hidrogeniônico

PKA – Proteína kinase A

PMSF – Inibidor de proteases, do inglês *Phenylmethanesulfonylfluoride* PGi – Núcleo Paragigantocelular

PVDF – Material usado para confeccionar membranas utilizadas para imobilizar proteínas na técnica de *Western Blot*, do inglês *Polyvinylidene Fluoride*

RO – Reconhecimento de Objetos

s – Segundo(s)

RT-ECL – Eletroquimioluminescência em Tempo Real, do inglês *Real time Electrochemiluminescence*

Sal – Salina

SDS-PAGE – Gel de Poliacrilamida para Eletroforese, do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

SNC – Sistema Nervoso Central

TIM – Timolol

Tris - Abreviação do composto orgânico conhecido como tris(hidroximetil)aminometano, com a fórmula  $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$

TTBS – Tampão Salina Tween-Tris, do inglês *Tween-Tris Buffer Saline*

VEH – Veículo da droga

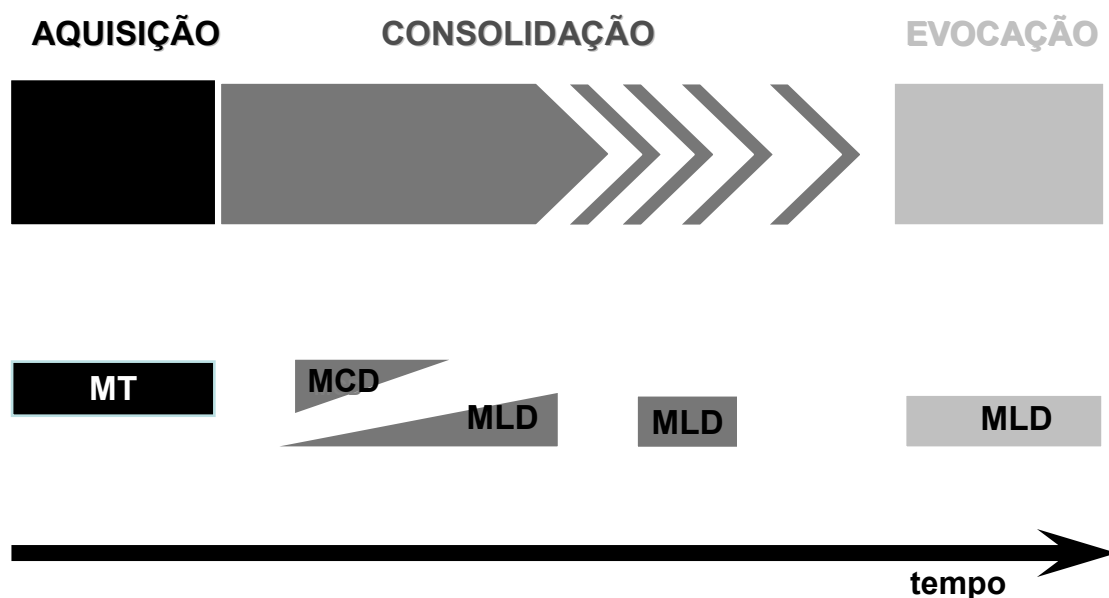
$\mu\text{g}$  – Micrograma

$\mu\text{l}$  – Microlitro

## I INTRODUÇÃO

### 1.1 Memória

O termo “memória” refere-se à capacidade de adquirir uma informação e retê-la ou consolidá-la, para que posteriormente, quando apropriado, possamos evocar a informação aprendida (Izquierdo, 2002). Assim, a memória pode ser dividida em fases: aquisição, consolidação e evocação (Figura 1).



**Figura 1. Fases de formação da memória e sua relação com os tipos de memória de acordo com o tempo de duração.** MT = Memória de Trabalho. MCD = Memória de Curta Duração. MLD = Memória de Longa Duração.

As memórias podem ser classificadas de acordo com o tempo de duração. Uma memória pode durar apenas alguns segundos, para que possamos executar uma ação determinada, isso ocorre, por exemplo, quando guardamos na memória o número de um telefone por um tempo suficiente para que possamos discar este número e, em seguida, não nos lembramos mais dele. Ou quando guardamos a terceira palavra da frase anterior, necessária em seu momento para que essa

frase faça sentido, mas inconveniente a partir desse instante. Esta é a memória de trabalho, que alguns denominam de curtíssima duração. Outras memórias podem durar alguns minutos, ou até algumas poucas horas, e em seu conjunto denominam-se memória(s) de curta duração, que serve(m) para manter uma conversa ou processar uma leitura ou outra atividade que dure esse tempo. A memória de trabalho às vezes é classificada dentro da(s) memória(s) de curta duração, mas sua função é específica. Ambas, memória de trabalho e de curta duração são processadas pela atividade elétrica de neurônios do córtex pré-frontal ântero-lateral e órbito-frontal (Izquierdo, 2002) e do sistema hipocampo-córtex entorrinal (Izquierdo et al., 1998) respectivamente. Não requerem, portanto, modificações na expressão gênica ou síntese protéica, e por isso não causam mudanças permanentes. Mas uma memória pode durar um tempo maior: horas, dias, até anos. São as memórias de longa duração. Estas sim requerem modificações na expressão gênica e síntese protéica para conservar estruturalmente a informação referente a elas em sinapses modificadas em diversas regiões cerebrais (Izquierdo, 2002; Izquierdo et al., 1998; Figura 1).

Quanto à sua natureza a memória pode ser classificada em explícita ou implícita. As memórias explícitas ou declarativas se referem a fatos ou eventos que podem ser relatados, explicitados; dizem respeito a acontecimentos da nossa vida, conhecimentos adquiridos, etc. Já as memórias implícitas ou procedimentais se referem a memórias de procedimentos, habilidades motoras, etc., difíceis de relatar (Bear et al., 2002). As memórias implícitas e explícitas podem, ainda, ser classificadas em subdivisões, conforme a tabela 1.

**Tabela 1. Classificação das memórias de longa duração de acordo com o conteúdo.** Izquierdo, 2002.

<i>Características</i>		<i>Subdivisões e características</i>	
<b>Explícitas/ Declarativas</b>	Informações que usualmente sabemos que possuímos e a qual temos acesso consciente.	<i>Episódicas</i>	Guardam informação acerca de nossas próprias vidas e eventos.
		<i>Semânticas</i>	Armazenam informações acerca do mundo que nos rodeia, mas que lembramos sem saber como, quando e onde as adquirimos.
<b>Implícitas/ Não-declarativas</b>	Informações às quais não temos acesso consciente, tal como a informação obtida a partir de aprendizados simples como aqueles derivados pelo treino em tarefas de condicionamento clássico e habituação.	<i>Representação perceptual</i>	Representações (imagens, sons) sem significado aparente conhecido, mas úteis como dicas facilitatórias da evocação de informações inerentes; memória pré-consciente ( <i>priming</i> ).
		<i>Procedimentos</i>	Hábitos, habilidades, regras.
		<i>Associativa</i>	Associa dois ou mais estímulos (condicionamento clássico), ou um estímulo a uma resposta (condicionamento operante).
		<i>Não associativa</i>	Atenua uma resposta (habituação) ou a aumenta (sensibilização) através da repetição de um mesmo estímulo.

As memórias explícitas e implícitas não se diferenciam apenas por sua natureza. A formação destes dois tipos de memória também depende de estruturas encefálicas distintas. De um modo geral, a estrutura cerebral mais relacionada à consolidação da memória é o hipocampo, mas, além da formação hipocampal, a formação de memórias declarativas requer a participação do giro denteado, subículo, córtex entorrinal, parahipocampal e perirrinal e vários sub-núcleos do complexo da amígdala; enquanto as memórias procedimentais requerem a participação dos gânglios da base e cerebelo, justamente por envolverem, além de outras coisas, habilidade e aprendizado motor (Figura 2A;

Izquierdo, 2002; Squire, Wixted e Clark, 2007). Nas suas fases iniciais, porém, várias delas utilizam o hipocampo e/ou a amígdala (Gruart et al., 2006).

A formação das memórias, no entanto, não depende somente da integridade funcional anatômica e bioquímica destas estruturas. Os processos mnemônicos estão sob modulação de diversos sistemas de neurotransmissores, como o sistema dopaminérgico, serotoninérgico, histaminérgico e o noradrenérgico (Figura 2B). Além disso, nos primeiros minutos ou horas após a aquisição, as memórias estão sujeitas à interferência no processo de sua consolidação por outras experiências vivenciadas, drogas ou tratamentos. Denomina-se justamente consolidação a fase em que as diversas informações adquiridas conformam efetivamente uma memória de longa duração (McGaugh, 2000; Izquierdo et al., 2002). Esta fase é lábil, justamente por ser sensível às interferências e modulações (McGaugh, 2000) e dura o mesmo tempo que a memória de curta duração (que supre a função mnemônica enquanto a memória de longa duração ainda não está formada), ou seja, 3 a 6 horas (Izquierdo e Medina, 1997; Izquierdo et al., 2006).

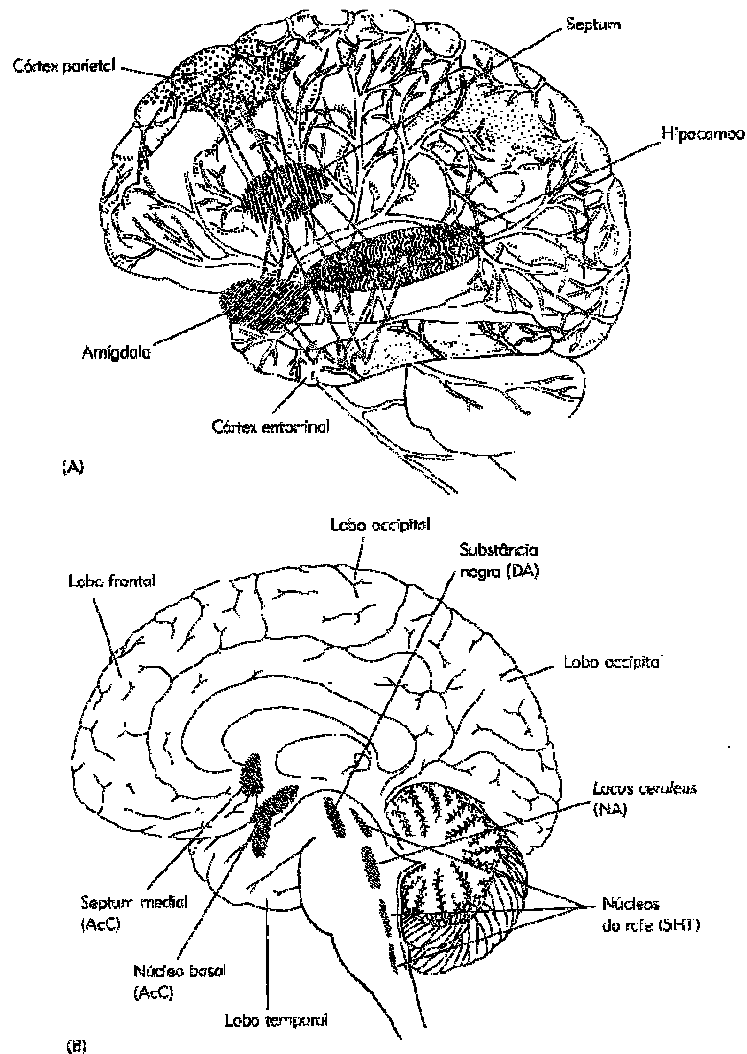


Figura 2. (A) Principais áreas envolvidas na formação das memórias declarativas. (B) Localização principal dos neurônios dos diversos sistemas moduladores. Izquierdo, 2002.

## 1.2 A memória de reconhecimento de objetos

A memória de reconhecimento caracteriza-se principalmente por conferir a habilidade de discriminar entre uma característica familiar e uma nova, uma capacidade obviamente significativa no que diz respeito á probabilidade de sobrevivência. No entanto, apesar da importância adaptativa da aquisição e retenção deste tipo de memória, ainda não está claro quais estruturas cerebrais estão envolvidas e quais são necessárias nos processos de consolidação do traço de reconhecimento.

Roedores são animais exploradores por natureza. Quando apresentados a objetos familiares e novos, eles despendem um tempo maior para explorar o objeto novo (Dere et al., 2007). Este comportamento típico tem sido utilizado no desenho de um paradigma comportamental conhecido como tarefa de reconhecimento de objetos (RO; Ennaceur e Delacour, 1988), o qual vem sendo amplamente utilizado para avaliar os mecanismos envolvidos na formação de memórias declarativas (Reed et al., 1999; Moses et al., 2005).

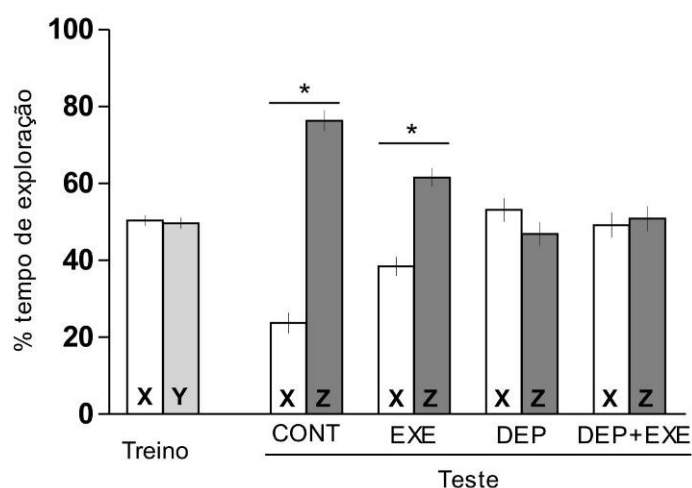
Diversos protocolos para estudar a memória de reconhecimento através da tarefa de RO vêm sendo estudados (Mansour et al., 2003; Forwood et al., 2005; Moses et al., 2005; Winters et al., 2009). É de extrema importância sabermos que o protocolo de teste mnemônico utilizado é efetivo, caso contrário, nossos resultados ganham discrebibilidade. Para utilizar o paradigma de reconhecimento de objetos como tarefa principal neste trabalho e afirmar que os animais são capazes de aprender com a utilização do protocolo selecionado no contexto apresentado no Centro de Memória (descritos na sessão Materiais e Métodos), utilizamos a tarefa de RO num estudo prévio, realizado nas mesmas condições laboratoriais. Neste estudo verificamos a capacidade de aprendizado de ratos normais e de animais que foram submetidos a procedimentos que alteram o processo de consolidação em outros tipos de memória, como a aversiva e a espacial, podendo assim comparar as diferentes tarefas mnemônicas (Mello et al., 2009, ANEXO 1).

Neste estudo prévio, para o qual utilizamos procedimentos aos quais estávamos familiarizados por tê-los empregados em trabalho anterior (Mello et al., 2008), dentre os procedimentos que utilizamos estão a deprivação maternal e o exercício físico (para detalhes ver Mello et al., 2008; Mello et al., 2009, ANEXO 1).



Para verificar se os animais são capazes de aprender no paradigma de memória de reconhecimento proposto foram utilizados ratos Wistar machos não operados (controles). Os animais foram habituados ao aparato de treino durante quatro dias. Após o período de habituação foram treinados na tarefa de RO, envolvendo a exposição a dois diferentes objetos (X e Y; Fig. 3). A MLD foi avaliada 24 h após o treino. Na sessão de teste, os animais foram expostos por 5 min a um dos objetos apresentados durante o treino (X) junto a um objeto novo (Y). Os animais controles exploraram significativamente mais tempo o objeto novo do que o familiar (Fig. 3), mostrando que haviam formado uma memória.

Ao contrário dos animais controles os animais que foram privados da mãe passaram o mesmo percentual de tempo explorando o objeto novo e o familiar (Fig. 3), o que mostrou que este procedimento, que impede a consolidação de outros tipos de memória (Benetti et al., 2009), também o faz na tarefa de RO. Além disso, o tratamento com exercício físico crônico não alterou a consolidação da memória de RO, em ratos normais ou privados da mãe. Estes resultados estão bem documentados e discutidos no ANEXO 1.



**Figura 3. Ratos Wistar machos são capazes de aprender na tarefa de RO (CONT), ratos privados da mãe não (DEP). O exercício físico crônico não altera a consolidação da memória (EXE; DEP+EXE).** Na sessão de treino (dia 1) os ratos foram expostos a dois diferentes objetos (X e Y) para livre exploração por 5 min. Na sessão de teste (dia 2), os animais foram expostos a um objeto familiar (X) e um objeto novo (Z) por cinco minutos para avaliar a retenção da memória de longa duração. Os dados (média ± DP) são apresentados como um percentual do tempo total de exploração. \*  $P \leq 0,01$  no teste t de Student com uma média teórica = 50;  $n = 10 - 12$  por grupo.

Através deste estudo prévio, pudemos perceber que os ratos controle aprenderam a tarefa de reconhecimento de objetos com o protocolo proposto, o que nos possibilita utilizar este protocolo sem receios no presente estudo.

### 1.3 O papel do hipocampo na consolidação das memórias

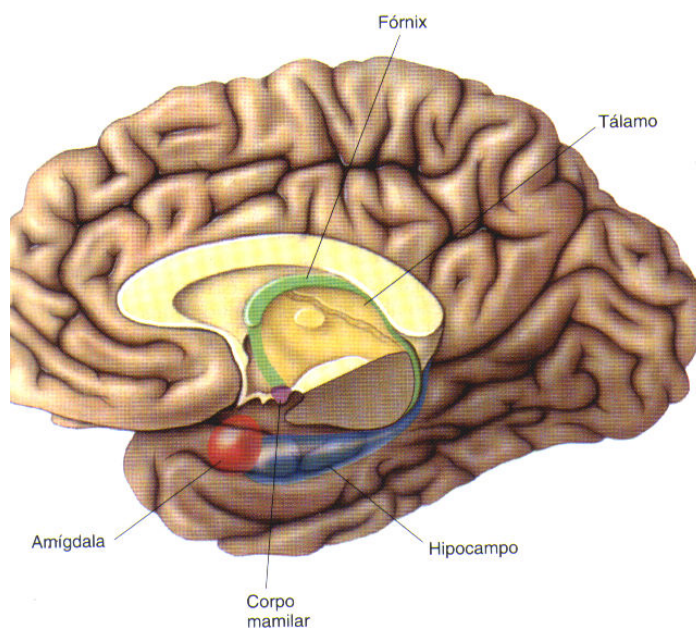
Conforme mencionado anteriormente, o hipocampo é a principal estrutura relacionada à formação das memórias declarativas (Izquierdo e Medina, 1997). Na figura 2A podemos observar que as principais áreas envolvidas no

processamento mnemônico têm conexão com o hipocampo direta ou indiretamente.

A formação da memória ocorre por meio de eventos plásticos, que geram uma modificação sináptica. Estes eventos plásticos subjacem à consolidação ou formação de vários tipos de memória (Izquierdo et al., 2006; Clarke et al., 2010), e incluem alterações na estrutura, na distribuição e no número de sinapses ou ainda alterações morfológicas (Rusakov et al., 1997; Woolf, 1998; Geinisman, 2000), conforme postulado inicialmente por Ramón y Cajal (1893).

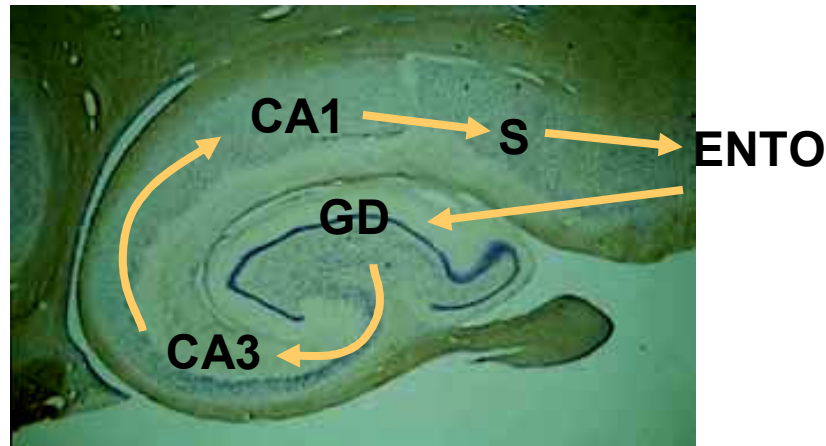
O hipocampo é uma estrutura na qual já foram evidenciadas formas de plasticidade sináptica, das quais a mais estudada é a potenciação de longa duração (LTP, do inglês *long-term potentiation*; Cammarota et al., 2002; Izquierdo et al., 2008; Prakash et al., 2009; Haegel et al., 2010). A LTP ocorre durante a consolidação de várias formas de memória (Gruart et al., 2006; Whitlock et al., 2006; Clarke et al., 2010) e na região CA1 sua base bioquímica é igual à da formação de memória (Izquierdo et al., 2006). Isto levou ao consenso entre alguns autores de que a LTP é a base celular/molecular da consolidação (Izquierdo et al., 2006).

O hipocampo está localizado bilateralmente, no lobo temporal, sendo um componente importante do sistema límbico (Figura 4). A palavra “hipocampo” deriva de seu formato curvado apresentado em secções coronais do cérebro humano, se assemelhando a um cavalo-marinho (Grego: hippos = cavalo, kampi = curva).



**Figura 4. Localização do hipocampo no cérebro humano.** Bear et al., 2002.

O hipocampo é internamente subdividido em diferentes regiões. Ramón y Cajal, em 1893, descreveu a circuitaria interna hipocampal: CA1 → Subículo → Córtex entorrinal → Giro dentado → CA3 → CA1 (Figura 5). Este circuito é funcionalmente ativo em condições fisiológicas (Izquierdo e Medina, 1997), estando envolvido na formação das memórias. Várias das estruturas internas do hipocampo são capazes de evidenciar plasticidade, porém a região CA1, cuja abreviatura CA vem do latim *Cornu Ammonis* (Corno de Ammon), denominação utilizada antigamente para hipocampo, tem a função relacionada ao aprendizado e memória melhor documentada.

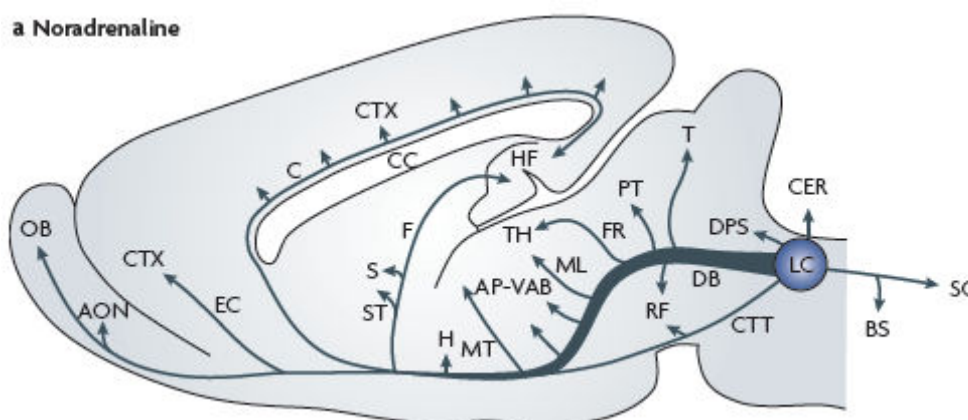


**Figura 5. Formação hipocampal de um rato e esquema da circuitaria hipocampal.** ENTO = córtex entorrinal. GD = Giro Denteado. S = Subículo.

#### 1.4 O sistema noradrenérgico e a memória

O sistema noradrenérgico tem um papel crucial na modulação da habilidade de concentração e performance mnemônica no rato (McGaugh, 1989, 2000; Izquierdo e Medina, 1997). Existem crescentes evidências da contribuição da liberação de noradrenalina (NA) no processo de consolidação das memórias (Clayton e Williams, 2000a). As representações neurais criadas a partir de eventos emocionais são atribuídas às consequências fisiológicas dessa experiência: secreção hormonal periférica e correspondente liberação de neurotransmissores específicos nas regiões límbicas ativadas (Kerfoot, Chattillion e Williams, 2008). Além disso, sabe-se que a NA no hipocampo e amígdala é essencial para a conversão de experiências emocionais em memória de longa duração (Miyashita e Williams, 2004). Estudos farmacológicos demonstraram que a NA, interagindo com outros neuromoduladores e hormônios, modula a formação da memória, principalmente por suas ações sobre a amígdala e o hipocampo (Cahill e McGaugh, 1996).

A NA tem efeitos diversos em neurônios-alvo, desde a produção de potenciais pós-sinápticos mediada por receptores  $\alpha_1$  e a modulação pré-sináptica de sua própria liberação mediada por receptores  $\alpha_2$  até efeitos metabotrópicos mediados por receptores  $\beta_1$  e  $\beta_2$ , com regulação de vias sinalizadoras ou cascatas intracelulares e alteração da excitabilidade celular e da plasticidade sináptica (Cammarota et al. 2008; Sara, 2009). Estudos *in vitro* sugerem que os efeitos da liberação de NA em qualquer região cerebral são complexos e dependem da concentração intracelular de NA e da disponibilidade e afinidade dos receptores na região-alvo (Madison e Nicoll, 1986). Além disso, a distribuição da inervação noradrenérgica no tronco encefálico também determina o impacto da ativação deste sistema sob os processos cognitivos (Figura 6).



**Figura 6. Distribuição da inervação noradrenérgica no encéfalo de um rato (corte sagital).** O Locus Coeruleus é o principal núcleo noradrenérgico, contendo cerca de 1.500 células que se projetam a outras regiões encefálicas, inclusive para o hipocampo. LC = Locus Coeruleus. SC = Medula Espinhal. BS = Núcleos do tronco encefálico. CTT = Trato Tegmental Central. CER = Cerebelo. DPS = Sistema Periventricular Dorsal. DB = Feixe Dorsal. RF = Formação Reticular. T = Tectum. PT = Área Pré-Tectal. FR = Fascículo Retroflexus. TH = Tálamo. ML = Lemnisco Medial. AP-VAB = Sistema Ansa Pendicular – Fascículo Amigdalóide Ventral. MT = Trato mamilotalâmico. H = Hipotálamo. ST = Estria Terminal. S = Septum. F = Fórnix. HF = Formação Hipocampal. CC = Corpo Caloso. C = Cíngulo. EC = Córtex Entorrinal. CTX = Córtex. AON = Núcleo Olfatório Anterior. OB = Bulbo Olfatório. Sara, 2009.

Os efeitos da NA interagem com os de outros neurotransmissores, neuromoduladores e hormônios na amígdala e no hipocampo para promover a formação da memória de longa duração (McGaugh, 2000; Izquierdo et al., 2006; Roozendaal et al., 2008). Assim, a NA afeta os processos cognitivos, facilitando a integração entre as regiões cerebrais envolvidas nestes processos (Sara, 2009).

O desenvolvimento de novas associações após o aprendizado é mediado, em parte, pelo aumento da fosforilação de CREB (Elemento de Ligação à Proteína Responsivo ao AMPc, do inglês *cAMP response element-binding protein*) e subsequente expressão gênica mediada por CRE (Alberini, 2009). O fator de transcrição CREB se liga à região promotora de vários genes associados à memória e plasticidade sináptica (Barco, Bailey e Kandel, 2006). Foi demonstrado que o bloqueio da atividade de CREB impede a formação da memória de longa duração, mostrando que CREB é crucial para a formação da memória (Bourtchuladze et. al., 1994). Foi demonstrado também que agentes que aumentam a atividade de CREB aceleram o processo de formação da memória (Tully et. al., 2003). A ativação de CREB promove alterações em vários genes e proteínas-chaves envolvidas na plasticidade neuronal, incluindo BDNF (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro, do inglês *brain-derived neurotrophic factor*; Tao et. al., 1998).

O BDNF é parte da família de neurotrofinas essencial para o crescimento, sobrevivência e diferenciação neuronal (Allen e Dawbarn, 2006). Além deste papel no sistema nervoso central o BDNF também participa, devido a seus efeitos tróficos sobre sinapses, nos processos de memória e aprendizado, incluindo a memória de reconhecimento (Tyler et al., 2002; Alonso et al., 2002; Bekinschtein et al., 2007; Heldt et al., 2007).

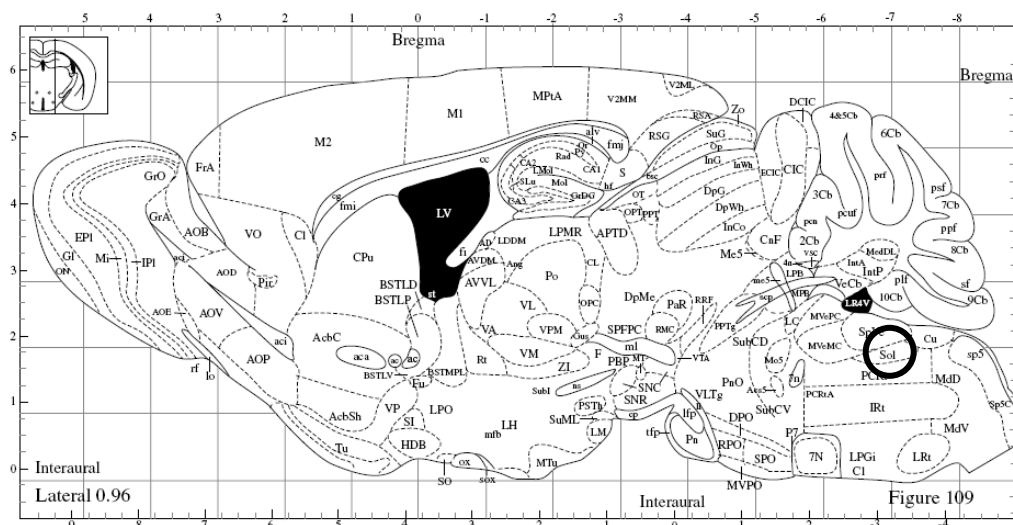
A descoberta de novidades, como ocorre na tarefa de reconhecimento de objetos, aumenta a liberação hipocampal de NA (Ihalainen, Riekkinen e Feenstra 1999) e esta catecolamina modula a expressão de proteínas relevantes para a memória (Kobayashi e Yasoshima, 2001), entre elas o BDNF (Hutter et al., 1996; Haenisch et al., 2008). Recentemente demonstramos que o treino na tarefa do reconhecimento de objetos induz um aumento nos níveis de BDNF na região CA1 hipocampal, apresentando um pico de expressão 120 min após o treino (Furini et al., 2010). Ainda mais, quando treinamos animais na tarefa do Reconhecimento de Objetos (RO) e os submetemos à infusão bilateral na região CA1 do hipocampo dorsal com o anticorpo anti-BDNF (0,5 µg/lado) imediatamente após o treino observamos um claro prejuízo na retenção da memória de RO (Furini et. al., 2010).

### **1.5 A via NTS-PGi-LC e seu papel na consolidação da memória**

A ação modulatória de diversos hormônios e drogas periféricos sob a consolidação da memória é bem conhecida, e é mediada por ações reflexas com ponto de partida periférico sobre sistemas catecolaminérgicos, serotoninérgicos ou colinérgicos centrais (Izquierdo e Medina, 1997; McGaugh, 2000; Izquierdo et al., 2006). Muitos destes hormônios ou drogas de ação periférica não atravessam a barreira hemato-encefálica (Williams e McGaugh, 1992).

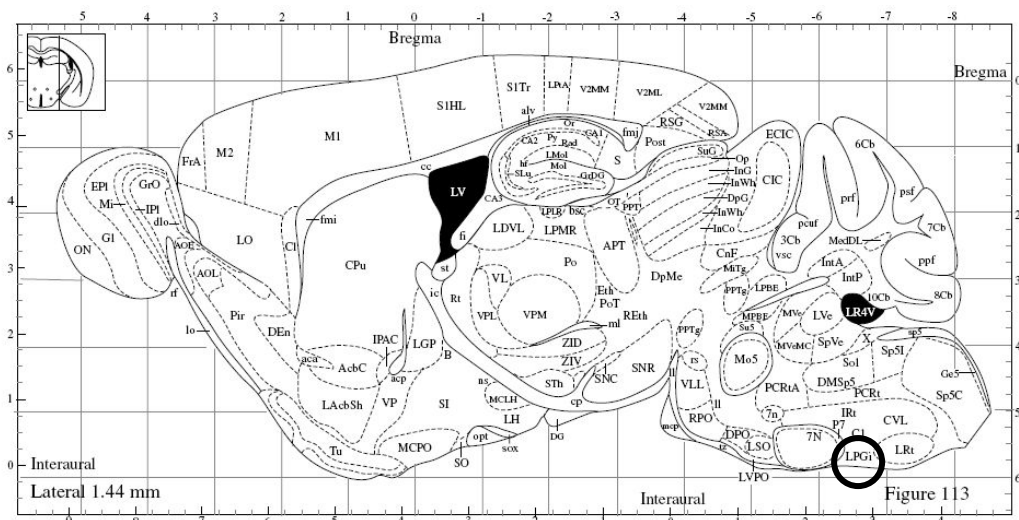
O Núcleo do Trato Solitário (NTS), localizado no tronco encefálico (Figura 7), recebe as informações periféricas e os estímulos diversos (contém receptores glicocorticóides) da periferia. Acredita-se que, desta forma, o NTS desempenha um papel vital ao transmitir estas informações às estruturas límbicas que participam dos processos mnemônicos (Clayton e Williams, 2000a).





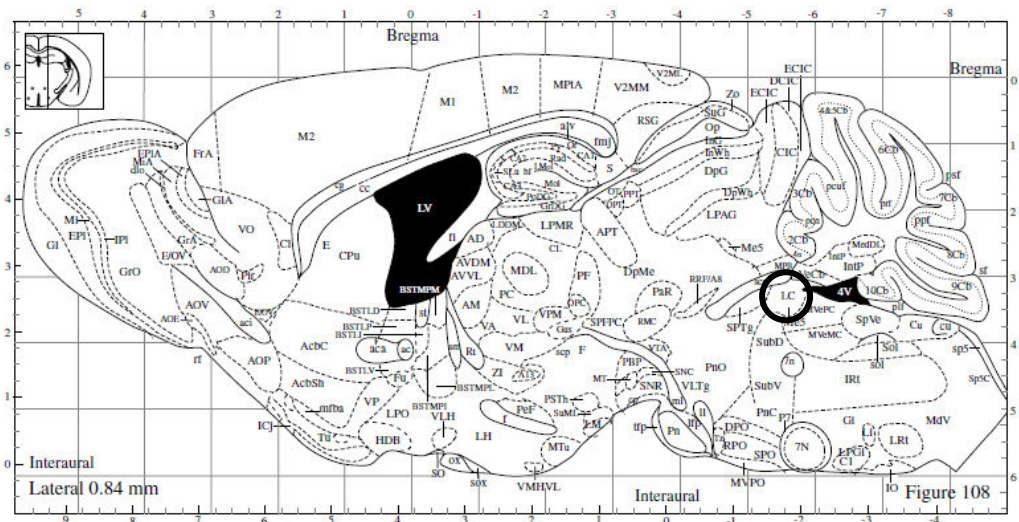
**Figura 7. Localização do Núcleo do Trato Solitário (Sol) no encéfalo do rato (corte sagital).** Paxinos e Watson, 1986.

Projeções do NTS se dirigem ao Núcleo Paragigantocelular (PGi), também localizado no tronco encefálico (Figura 8). O PGi é formado por neurônios glutamatergicos e colinérgicos (Ennis e Aston-Jones, 1988), libera glutamato e outros neurotransmissores, e envia projeções densas ao Locus Coeruleus (Guyenet and Young, 1987), sendo o maior *input* glutamatergico excitatório ao LC (Babstock e Harley, 1992). Desta forma as vias do PGi mediam o incremento da ativação neuronal do LC em resposta a uma variedade de estímulos (Clayton e Williams, 2000b).



**Figura 8. Localização do Núcleo Paragigatocelular (LPGi) no encéfalo do rato (corte sagital).** Paxinos e Watson, 1986.

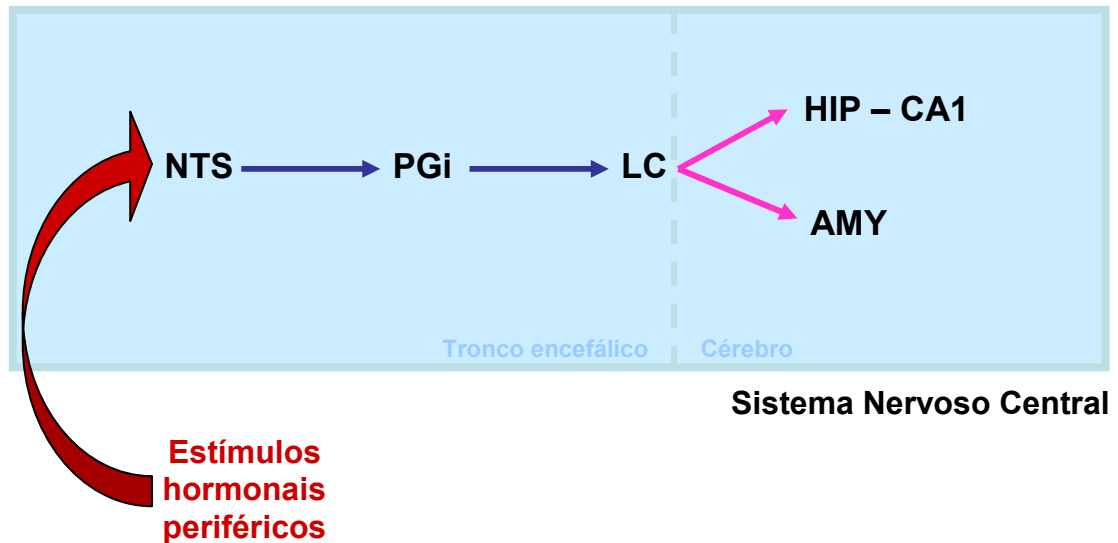
O LC é o núcleo que contém o maior número de corpos neuronais noradrenérgicos do SNC (Figura 9), tem receptores sensíveis a vários neurotransmissores e envia projeções noradrenérgicas a diversas regiões cerebrais, sendo que as projeções noradrenérgicas dirigidas ao hipocampo e ao córtex são exclusivamente procedentes do LC (Lehnert, Schulz e Dieterich, 1998). O sistema noradrenérgico do LC facilita a atenção, a cognição e a adaptação do comportamento diante das mudanças do ambiente (Devauges e Sara, 1990; Sara e Segal, 1991; Bouret e Sara, 2004, 2005; Izquierdo et al., 2006), além de facilitar as respostas comportamentais resultantes de processos decisivos em tarefas específicas (Aston-Jones e Cohen, 2005).



**Figura 9.** Localização do Locus Coeruleus (LC) no encéfalo do rato (corte sagital). Paxinos e Watson, 1986.

Harley et al. (1989) demonstraram que a ativação glutamatérgica do LC gera potenciais pós-sinápticos hipocámpais dependentes de NA, uma vez que a injeção de propanolol, antagonista beta-adrenérgico, bloqueia estes potenciais. Os autores, no entanto, sugerem que existam dois sistemas, uma vez que a injeção de propanolol não impede a potenciação de longa duração quando esta ocorre por estimulação elétrica do LC.

Considerando as eferências de cada um dos núcleos acima descritos, podemos delinear uma via neuronal: NTS-PGi-LC-Hipocampo, conforme esquematizado na figura 10.



**Figura 10. Esquema da via neuronal estudada.** O NTS, no tronco encefálico, recebe estímulos periféricos, repassa ao PGi, que manda projeções ao LC. Este, por sua vez envia eferências noradrenérgicas à região CA1 do hipocampo dorsal e à amígdala. As setas em azul representam neurônios glutamatérgicos. As setas em rosa representam neurônios noradrenérgicos. NTS = Núcleo do Trato Solitário. PGi = Núcleo Paragigantocelular. LC = Locus Coeruleus. HIP - CA1 = Região CA1 do hipocampo. AMY = Amígdala.

## 1.6 Hipótese

Já foi demonstrado que as estruturas NTS, PGi, LC, Hipocampo e Amígdala participam e são essenciais para a consolidação de memórias aversivas. Clayton e Williams (2000a) demonstraram que a ativação adrenérgica do NTS potencializa a liberação de NA na amígdala, melhorando a retenção da memória aversiva na tarefa de esquia inibitória. Roozendaal et al. (1999) demonstraram que a ativação dos receptores de glicocorticóides no NTS facilita a consolidação da memória aversiva. Williams, Men e Clayton (2000) verificaram que a inativação da via excitatória aferente do LC (PGi) prejudica a retenção da memória nesta tarefa.

A memória declarativa de reconhecimento, foco de estudo deste trabalho, caracteriza-se pela capacidade de reconhecer algo novo, discriminando o que é novo do que é familiar. Permite com que reconheçamos um lugar, alguém ou um

objeto e possamos atribuir-lhe um nome e/ou uma função. Nossa hipótese de trabalho é que no aprendizado da tarefa de reconhecimento de objetos, quando o animal é exposto a dois objetos novos, esta novidade ativa a via NTS-PGi-LC-Hipocampo, sendo a ativação sequencial de todas estas estruturas, que culmina na liberação de NA no hipocampo, necessária para que ocorra consolidação desta memória. Assim, se algum ponto desta via estiver bloqueado ou inativado a consolidação mnemônica não pode ocorrer.

### 1.7 Objetivos

O objetivo principal desta pesquisa foi verificar a participação da via NTS-PGi-LC-Hipocampo na consolidação da memória de reconhecimento de objetos.

Nossos objetivos específicos foram:

- Verificar se a inibição do NTS impede a consolidação da memória na tarefa de reconhecimento de objetos;
- Verificar se a inibição do PGi impede a consolidação da memória na tarefa de reconhecimento de objetos;
- Verificar se a inibição do LC impede a consolidação da memória na tarefa de reconhecimento de objetos;
- Verificar se a inibição dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos hipocampais impede a consolidação da memória na tarefa de reconhecimento de objetos;
- Verificar se a inibição dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos na amígdala basolateral ou central impede a consolidação da memória na tarefa de reconhecimento de objetos;

- Verificar se a injeção de NA na região CA1 do hipocampo influencia a consolidação da memória de reconhecimento de objetos;
- Verificar se a injeção de NA na região CA1 do hipocampo reverte a possível amnésia causada pela inibição do NTS na tarefa de reconhecimento de objetos;
- Verificar se a injeção de NA na região CA1 do hipocampo reverte a possível amnésia causada pela inibição do PGI na tarefa de reconhecimento de objetos;
- Verificar se a injeção de NA na região CA1 do hipocampo reverte a possível amnésia causada pela inibição do LC na tarefa de reconhecimento de objetos;
- Verificar se a injeção de NMDA no LC reverte a possível amnésia causada pela inibição do NTS na tarefa de reconhecimento de objetos;
- Verificar se a injeção de NMDA no LC reverte a possível amnésia causada pela inibição do PGI na tarefa de reconhecimento de objetos;
- Verificar se a inibição das diferentes regiões estudadas (NTS, PGI e/ou LC) após o treino na tarefa de reconhecimento de objetos altera a expressão protéica de BDNF na região CA1 do hipocampo;
- Verificar se a injeção de NA na região CA1 do hipocampo ou de NMDA no LC revertem a possível alteração na expressão protéica de BDNF na região CA1 do hipocampo causada pela inibição das diferentes regiões estudadas (NTS, PGI e/ou LC) após o treino na tarefa de reconhecimento de objetos.

## 1.8 Justificativa

Conforme relatado anteriormente, já foi descrito o papel do NTS, do PGI e do LC atuando isoladamente na consolidação das memórias aversivas. No entanto, nada se sabe sobre a participação destes núcleos na consolidação da memória declarativa de reconhecimento de objetos.

Apesar da memória de reconhecimento ser um tipo de memória bastante distinto da memória aversiva, acreditamos que, por envolver a apresentação de uma “novidade” ao animal, a ativação destes núcleos pode não somente estar envolvida, como também ser essencial para a consolidação deste tipo de memória. Além disso, considerando as conexões entre estas estruturas, cremos que elas formam uma via neuronal que desempenha papel importante na consolidação da memória.

O papel do sistema noradrenérgico na consolidação mnemônica vem sendo bastante estudado, porém, segundo Sara (2009) está faltando um *link* entre as ações bem estabelecidas da NA em suas células-alvo e seu real efeito nas funções cognitivas. Apesar do papel do sistema noradrenérgico na modulação da consolidação das memórias ser bem documentado (ver McGaugh, 2000), poucos estudos descrevem como as diferentes estruturas, como o NTS, suprem o sistema mnemônico com NA (Williams, Men e Clayton, 2000).

## II MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Desenho do estudo

Tratou-se de um estudo experimental randomizado cego, que objetivou realizar uma análise farmacológico-comportamental e bioquímica da participação da via NTS-PGi-LC-Hipocampo/Amígdala na consolidação da memória de reconhecimento de objetos.

### 2.2 Amostra e critérios de inclusão

Em todos os experimentos utilizamos ratos Wistar machos de 3 meses de idade, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação Animal (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Tratou-se de um estudo com animais experimentais, desta forma o tamanho amostral (número de animais por grupo) foi definido com base nos estudos da área publicada em revistas científicas *qualis* A1, totalizando 575 animais, sendo 440 para os experimentos farmacológico-comportamentais (em torno de 10 por grupo) e 135 para os experimentos bioquímicos (5 animais por grupo).

Os animais foram mantidos em caixas plásticas especiais com capacidade para 5 animais, forradas com maravalha. Foram submetidos a um ciclo claro/escuro de 12 h (luz a partir das 7 h e escuro a partir das 19 h), com água e ração à vontade e uma temperatura ambiente constante de 23°C. As caixas foram trocadas e limpas a cada 2 dias.

O máximo de precaução foi tomado com o intuito de minimizar o sofrimento dos animais e de reduzir o número de animais utilizados. Todos os experimentos



estão de acordo com as normas dos “*Principles of laboratory animal care*” (NIH publication N° 85-23, revised 1996).

## 2.3 Procedimentos

### 2.3.1 Cirurgia estereotáxica

Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas guia de 0,2 mm de calibre, posicionadas nas diferentes regiões de estudo (Figura 11).

Seguindo o Atlas de Paxinos e Watson (1986), as coordenadas para as diferentes regiões do estudo foram (em relação ao Bregma):

NTS: Antero-posterior -13,3 mm, látero-lateral  $\pm 1,0$  mm, dorso-ventral -7,9 mm.

PGi: Antero-posterior -12,8 mm, látero-lateral  $\pm 1,6$  mm, dorso-ventral -12 mm.

LC: Antero-posterior -9,7 mm, látero-lateral  $\pm 1,3$  mm, dorso-ventral -7,1 mm.

Região CA1 do hipocampo: ântero-anterior -4,2 mm, látero-lateral  $\pm 3,0$  mm, dorso-ventral -3,0 mm.

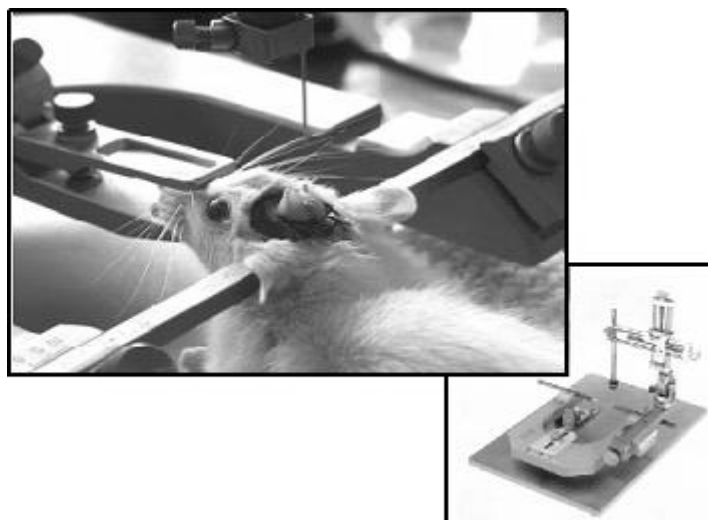
Amígdala basolateral: ântero-posterior -2,4 mm, látero-lateral  $\pm 5,1$  mm, dorso-ventral -8,1mm.

Amígdala central: ântero-posterior -2,4 mm, látero-lateral  $\pm 4,2$  mm, dorso-ventral -8,3mm.

Todo o procedimento cirúrgico foi realizado com os animais previamente anestesiados com ketamina e xilazina, administrados intra-peritonealmente (*i.p.*),

nas doses de 75 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente.

Uma vez recuperados da anestesia, os animais foram recolocados em suas caixas-moradia, e não houve troca entre os animais em cada caixa ao longo de todo o experimento.



**Figura 11. Foto do animal sendo submetido à cirurgia estereotáxica para a implantação de cânulas de infusão na região CA1 do hipocampo dorsal. No detalhe, vista geral do equipamento estereotáxico.**

### **2.3.2 Manipulação dos animais**

Quatro dias após a cirurgia, os animais passaram por duas sessões de manuseio ou manipulação, para se familiarizarem com o pesquisador, seu contato e seus cheiros. Durante cada sessão os animais foram levados do biotério até a sala onde os experimentos foram conduzidos, retirados da gaiola e manuseados durante 5 minutos.

### **2.3.3 Etapa I: Procedimentos farmacológicos/comportamentais:**

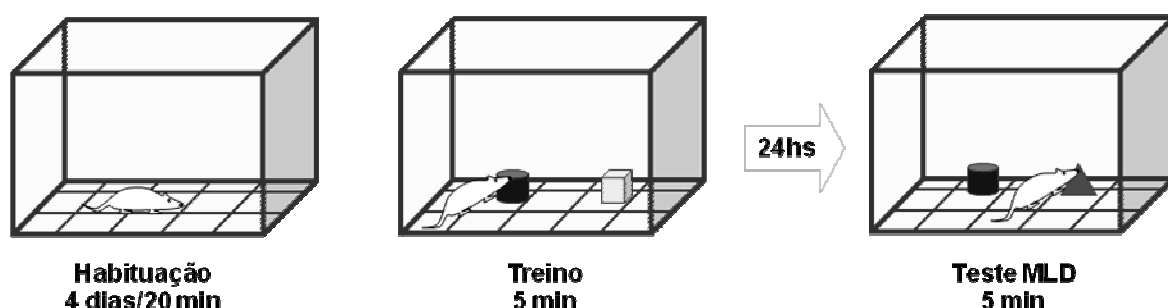
Para a realização dos experimentos farmacológicos/comportamentais foram utilizados 440 animais, sendo que cada grupo foi composto por 9 a 12 animais.

#### **2.3.3.1 O paradigma do reconhecimento de objetos (RO)**

O aparato para estudar reconhecimento de objetos utilizado consiste de um campo aberto retangular com 60 cm de comprimento por 40 cm de profundidade e 50 cm de altura, o qual se encontra em uma sala com baixa luminosidade e isolada acusticamente. A parte frontal do campo aberto é construída de vidro, para a melhor observação do animal. Antes de ser submetidos à tarefa de reconhecimento, o animal passa por um processo de habituação ao dispositivo experimental que tem duração de 4 dias e é constituído de uma sessão comportamental diária de 20 minutos, na qual o animal é colocado individualmente no campo aberto para livre exploração (Figura 12; Akirav e Maroun, 2006; Kelly, Laroche e Davis, 2003).

Os objetos-estímulo utilizados na tarefa de reconhecimento foram confeccionados em metal, vidro ou cerâmica. Nenhum dos objetos possui significância comportamental para os animais experimentais, os quais não demonstraram preferência por nenhum deles (Clarke et al., 2010; Furini et al., 2010, Mello et al., 2009; Myskiw et al., 2008; Rossato et al., 2007). Cada objeto foi preso ao assoalho do campo aberto pela base. A arena do campo aberto, assim como os objetos-estímulo foram limpos com uma solução de etanol 30% entre a passagem de cada animal para garantir a ausência de pistas olfativas. Foram

considerados como comportamentos exploratórios os atos de cheirar ou tocar os objetos de estímulo com o focinho ou as patas dianteiras. Sentar-se no objeto, usá-lo como apoio para explorar o ambiente ou permanecer ao redor dele não foram considerados comportamentos exploratórios. O tempo gasto explorando cada objeto foi medido por um observador e os dados expressos como percentual do tempo total de exploração.



**Figura 12. Esquema da tarefa de RO.** Os animais são submetidos a 4 dias de habituação ao aparato experimental (20 min por dia). No dia do treino são apresentados dois objetos para livre exploração por 5 min; 24 h após é realizado o teste de memória de longa duração (MLD).

No dia 1 (sessão de treino), os ratos foram individualmente colocados no campo aberto contendo dois objetos diferentes (X e Y) para explorar livremente durante 5 min. O teste de retenção foi realizado 24 h após a sessão de treino (para verificar a memória de longa duração). Nesta sessão de teste de 5 min de duração, os ratos foram individualmente re-introduzidos no campo aberto onde um dos objetos apresentados durante o treino foi aleatoriamente substituído por um objeto novo (Z; Figura 12).

A infusão dos fármacos estudados ocorreu em diferentes tempos após a sessão de treino.

### 2.3.3.2 Tratamento farmacológico

Os compostos farmacológicos testados ou os veículos utilizados na diluição dos mesmos foram infundidos bilateralmente na região de interesse em diferentes tempos após o treino na tarefa do RO (no dia 1) com auxílio de uma bomba de infusão (KDScientific) e micro-seringas Hamilton. O volume administrado foi 1  $\mu$ l/lado para a região CA1 do hipocampo, 0,5  $\mu$ l/lado para o NTS, PGI e amígdala e 0,25  $\mu$ l/lado para o LC (considerando o tamanho das estruturas). As cânulas de infusão foram mantidas dentro das cânulas-guia por pelo menos 60 s após o fim da administração da droga, a fim de evitar o refluxo de líquido.

Para a realização das tarefas-controle descritas posteriormente (Campo Aberto, Labirinto em Cruz Elevado e Esquiva Inibitória) os compostos ou os veículos utilizados foram infundido 24 h antes do treino.

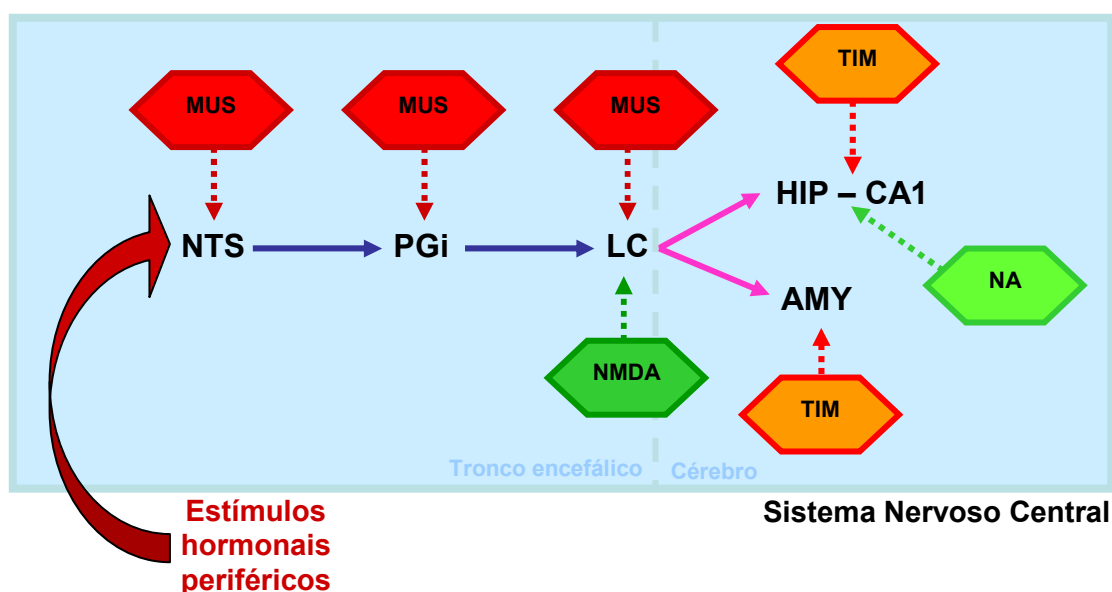
Os fármacos foram dissolvidos em solução salina 0,9% (veículo) e guardados protegidos da luz a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o uso. A infusão dos compostos foi realizada à temperatura ambiente e em uma sala com baixa luminosidade. As doses utilizadas foram determinadas com base em experimentos pilotos e em estudos prévios que mostraram o efeito destes fármacos sobre o aprendizado e a memória de ratos, e em outras variáveis comportamentais e fisiológicas.

Os compostos farmacológicos utilizados neste estudo foram:

- Muscimol: ligante do sítio do GABA dos receptores GABAérgicos tipo A, e portanto mimético daquele, o principal neurotransmissor inibitório do cérebro.
- Timolol: antagonista dos receptores  $\beta$ 1 e  $\beta$ 2 noradrenérgicos.
- NMDA (N-metil D-aspartato): Aminoácido excitatório, agonista específico do receptor NMDA do glutamato.

- Noradrenalina: Neutotransmissor do Sistema Nervoso Central.

O muscimol foi utilizado em infusão no NTS, PGi e LC. O timolol em infusão na região CA1 do hipocampo, na amígdala central e na amígdala basolateral. A NA em infusão na região CA1 do hipocampo. E, o NMDA em infusão no LC, conforme a figura 13.



**Figura 13. Locais de ação das drogas utilizadas na via estudada.** O muscimol tem ação inibitória sobre o NTS, PGi e LC. O timolol, antagonista beta-adrenérgico, atua bloqueando estes receptores na região CA1 do hipocampo e na amígdala. O NMDA, agonista glutamatérgico dos receptores NMDA, atua estimulando estes receptores na membrana das células nervosas do LC. A noradrenalina, agonista dos receptores noradrenérgicos, atua sobre estes receptores na membrana das células nervosas da região CA1 do hipocampo. NTS = Núcleo do Trato Solitário. PGi = Núcleo Paragigantocelular. LC = Lócus Coeruleus. HIP – CA1 = Região CA1 do hipocampo. AMY = Amígdala. MUS = Muscimol. TIM = Timolol. NA = Noradrenalina.

### 2.3.3.3 Controle histológico da região estudada

A verificação do posicionamento anatômico das cânulas implantadas e do local atingido pela infusão foi realizada *post mortem*. Para isso, depois dos procedimentos comportamentais aos quais os animais foram submetidos, estes receberam a infusão de 1, 0,5 ou 0,25  $\mu$ l (dependendo da estrutura) de uma

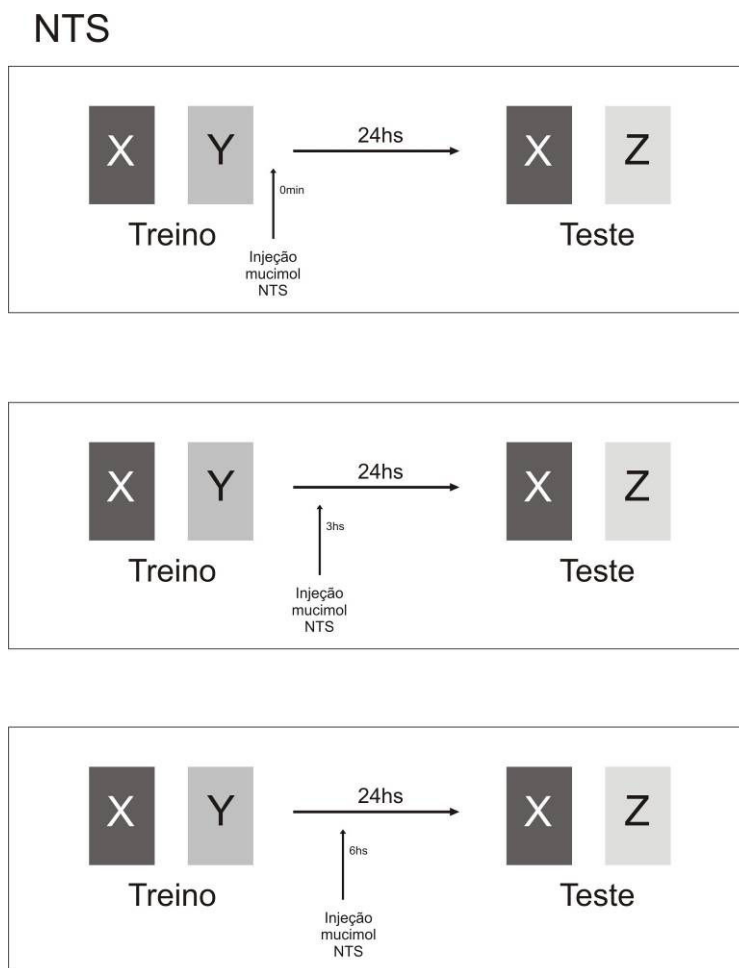
solução de azul de metileno 0,1% através das mesmas cânulas utilizadas para aplicação das drogas. Quinze minutos depois da infusão, os animais foram sacrificados por decapitação, seus encéfalos removidos e colocados em uma solução de formol 4% por um período de quatro dias. Posteriormente, foi realizada a análise histológica da área à qual difundiu-se o corante, que supõe-se ser a mesma à qual se difundira(m) a(s) droga(s) previamente administradas *in vivo*.

Os animais que receberam infusão na amígdala ou LC (estruturas muito pequenas) tiveram seus encéfalos congelados em isopentano logo após a decapitação e foram cortados no criostato para confecção de lâminas histológicas e verificação do posicionamento correto das cânulas. Somente animais com a localização correta das cânulas foram considerados na análise estatística dos dados. Considerou-se correta essa localização quando esteve dentro de  $1 \text{ mm}^3$  do ponto estabelecido pelas coordenadas estereotáticas mencionadas acima, em 2.3.1.

### **2.3.3.4 Experimentos comportamentais**

#### **2.3.3.4.1 Experimento 1 – participação do NTS na consolidação da memória de RO**

Os animais foram treinados na tarefa de RO e tiveram o NTS inibido a diferentes tempos após o treino (imediatamente após, 3 h e 6 h) para verificar a participação desta estrutura na consolidação da memória de RO (Figura 14). A inibição foi feita através da injeção de muscimol na concentração de  $0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ;  $0,5 \mu\text{l}/\text{lado}$ . Respeitando 24 h após o treino, foi testada a memória de longa duração.

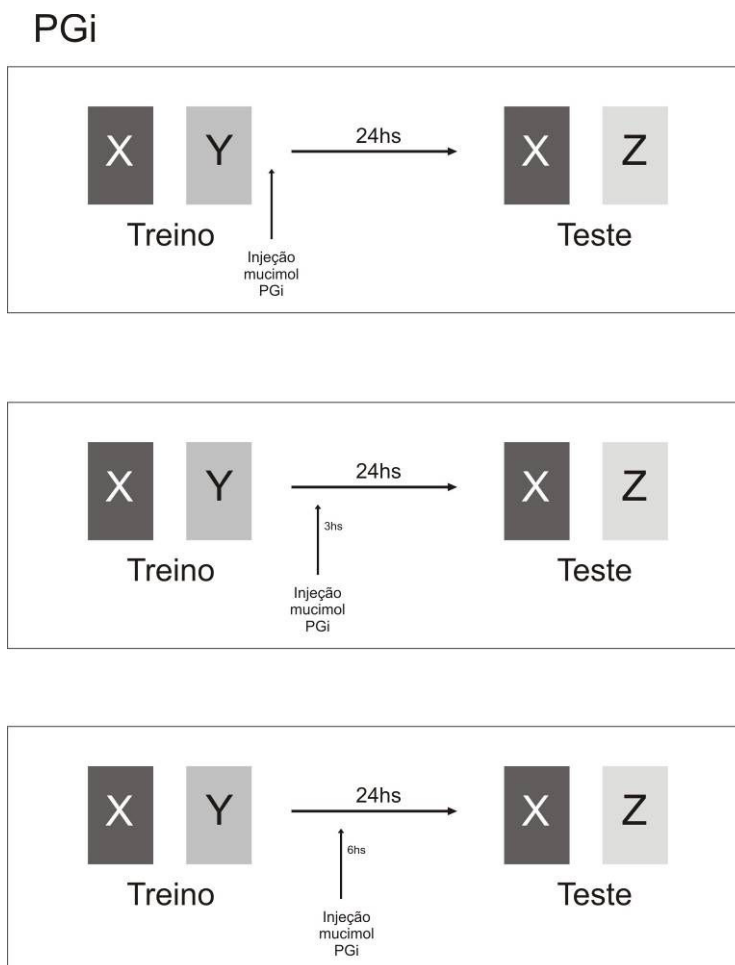


**Figura 14. Esquema do experimento 1.** Os animais foram treinados na tarefa de RO, sendo-lhes apresentados dois novos objetos (X e Y) para livre exploração. Diferentes tempos após o treino os animais receberam injeção de muscimol no NTS. 24 h após o treino foram testados, sendo-lhes apresentados um objeto familiar (X) e um objeto novo (Z) para livre exploração.

#### 2.3.3.4.2 Experimento 2 – participação do PGI na consolidação da memória de RO

Os animais foram treinados na tarefa de RO e tiveram o PGI inibido a diferentes tempos após o treino (imediatamente após, 3 h e 6 h) para verificar a participação desta estrutura na consolidação da memória de RO (Figura 15). A inibição foi feita através da injeção de muscimol na concentração de 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 0,5  $\mu\text{l}/\text{lado}$ . Vinte e quatro horas após o treino foi testada a memória de longa duração.

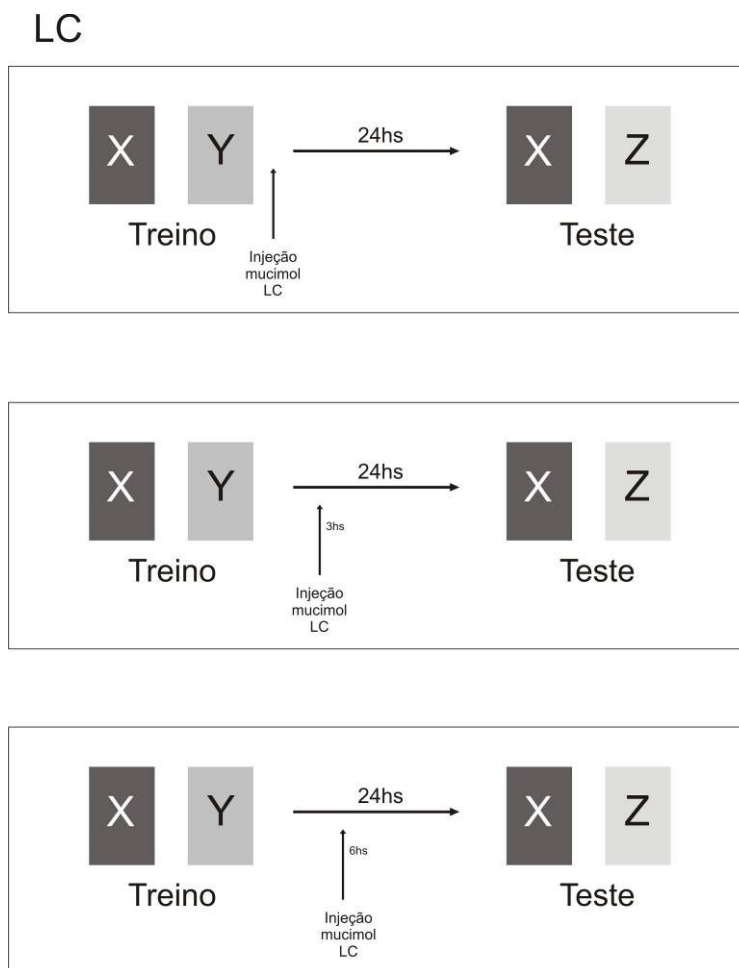




**Figura 15. Esquema do experimento 2.** Os animais foram treinados na tarefa de RO, sendo-lhes apresentados dois novos objetos (X e Y) para livre exploração. Diferentes tempos após o treino os animais receberam injeção de muscimol no PGI. 24 h após o treino foram testados, sendo-lhes apresentados um objeto familiar (X) e um objeto novo (Z) para livre exploração.

### 2.3.3.4.3 Experimento 3 – participação do LC na consolidação da memória de RO

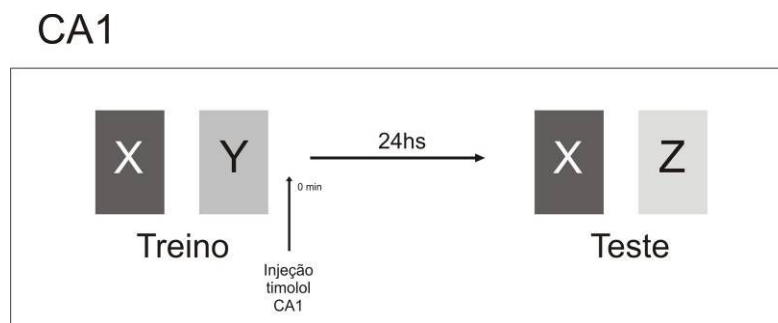
Os animais foram treinados na tarefa de RO e tiveram o LC inibido a diferentes tempos após o treino (imediatamente após, 3 h e 6 h) para verificar a participação desta estrutura na consolidação da memória de RO (Figura 16). A inibição foi feita através da injeção de muscimol na concentração de 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Passadas 24 h do treino foi testada a memória de longa duração.



**Figura 16. Esquema do experimento 3.** Os animais foram treinados na tarefa de RO, sendo-lhes apresentados dois novos objetos (X e Y) para livre exploração. Diferentes tempos após o treino os animais receberam injeção de muscimol no LC. 24 h após o treino foram testados, sendo-lhes apresentados um objeto familiar (X) e um objeto novo (Z) para livre exploração.

#### 2.3.3.4.4 Experimento 4 – necessidade de noradrenalina na região CA1 do hipocampo para a consolidação da memória de RO

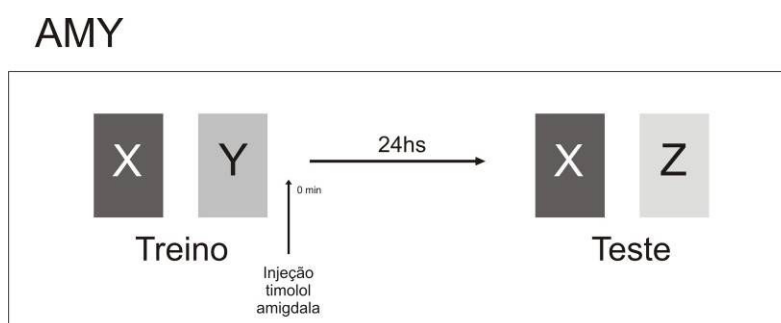
Os animais foram treinados na tarefa de RO e foi infundido timolol (inibidor dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos) imediatamente depois, para verificar a necessidade da noradrenalina na região CA1 do hipocampo para a consolidação da memória de RO. O timolol foi infundido na concentração de  $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ;  $1 \mu\text{l}/\text{lado}$ . Completadas 24 h após o treino, foi testada a memória de longa duração (Figura 17).



**Figura 17. Esquema do experimento 4.** Os animais foram treinados na tarefa de RO, sendo-lhes apresentados dois novos objetos (X e Y) para livre exploração. Imediatamente após o treino os animais receberam injeção de timolol em CA1. 24 h após o treino foram testados, sendo-lhes apresentados um objeto familiar (X) e um objeto novo (Z) para livre exploração.

#### 2.3.3.4.5 Experimento 5 – necessidade de noradrenalina na amígdala central e basolateral para a consolidação da memória de RO

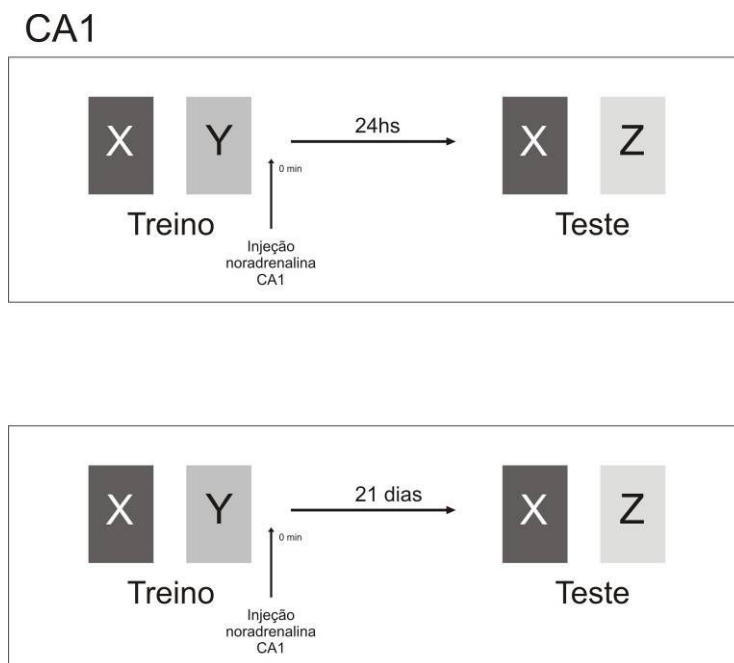
Os animais foram treinados na tarefa de RO e foi infundido timolol (antagonista dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos) imediatamente depois para verificar a necessidade da noradrenalina na amígdala central ou na basolateral para a consolidação da memória de RO (Figura 18). O timolol foi infundido na concentração de 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 0,5  $\mu\text{l}/\text{lado}$ . Corridas 24 h após o treino foi testada a memória de longa duração.



**Figura 18. Esquema do experimento 5.** Os animais foram treinados na tarefa de RO, sendo-lhes apresentados dois novos objetos (X e Y) para livre exploração. Imediatamente após o treino os animais receberam injeção de timolol na amígdala central ou basolateral. 24 h após o treino foram testados, sendo-lhes apresentados um objeto familiar (X) e um objeto novo (Z) para livre exploração.

### 2.3.3.4.6 Experimento 6 – efeitos da noradrenalina na região CA1 do hipocampo para a consolidação da memória de RO

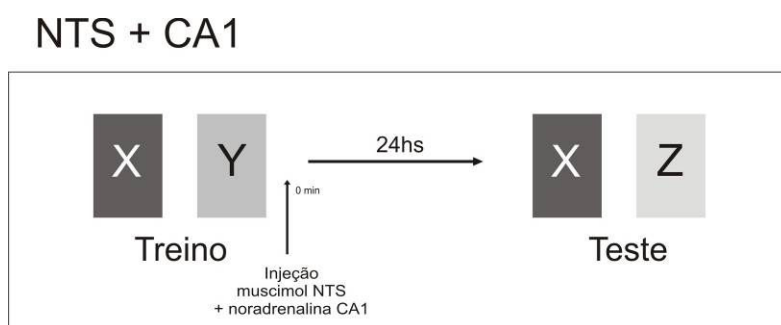
Os animais foram treinados na tarefa de RO e foi infundida noradrenalina na região CA1 do hipocampo imediatamente depois do treino para verificar os efeitos da noradrenalina sobre a consolidação da memória de RO. A NA foi infundida na concentração de  $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ;  $1 \mu\text{l}/\text{lado}$ . Em um grupo de animais a memória de longa duração foi testada 24 h após o treino, em outro o teste foi realizado 21 dias após o treino (Figura 19).



**Figura 19. Esquema do experimento 6.** Os animais foram treinados na tarefa de RO, sendo-lhes apresentados dois novos objetos (X e Y) para livre exploração. Imediatamente após o treino os animais receberam injeção de noradrenalina em CA1. 24 h ou 21 dias após o treino foram testados, sendo-lhes apresentados um objeto familiar (X) e um objeto novo (Z) para livre exploração.

**2.3.3.4.7 Experimento 7 – se a inibição do NTS provoca amnésia na tarefa de RO pela via aqui proposta, a injeção de noradrenalina na região CA1 do hipocampo seria capaz de reverter tal efeito**

Os animais foram treinados na tarefa de RO e foi infundido muscimol no NTS imediatamente pós-treino seguido pela infusão de noradrenalina na região CA1 do hipocampo imediatamente após o treino para verificar se a NA é capaz de reverter a possível amnésia na memória de RO causada pela inibição do NTS (Figura 20). A inibição foi feita através da injeção de muscimol na concentração de 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 0,5  $\mu\text{l}/\text{lado}$ . A NA foi infundida na concentração de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 1  $\mu\text{l}/\text{lado}$ . Vinte e quatro horas após o treino foi testada a memória de longa duração.

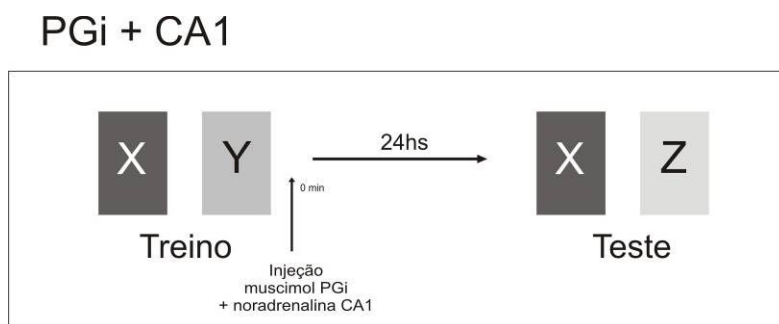


**Figura 20. Esquema do experimento 7.** Os animais foram treinados na tarefa de RO, sendo-lhes apresentados dois novos objetos (X e Y) para livre exploração. Imediatamente após o treino os animais receberam injeção de muscimol no NTS e noradrenalina em CA1. 24 h após o treino foram testados, sendo-lhes apresentados um objeto familiar (X) e um objeto novo (Z) para livre exploração.

**2.3.3.4.8 Experimento 8 – se a inibição do PGI provoca amnésia na tarefa de RO pela via aqui proposta, a injeção de noradrenalina na região CA1 do hipocampo seria capaz de reverter tal efeito**

Os animais foram treinados na tarefa de RO e foi infundido muscimol no PGI imediatamente após o treino seguido pela infusão de noradrenalina na região

CA1 do hipocampo imediatamente após o treino para verificar se a NA é capaz de reverter a possível amnésia na memória de RO causada pela inibição do PGI (Figura 21). A inibição foi feita através da injeção de muscimol na concentração de 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 0,5  $\mu\text{l}/\text{lado}$ . A NA foi infundida na concentração de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 1  $\mu\text{l}/\text{lado}$ . Vinte e quatro horas após o treino foi testada a memória de longa duração.

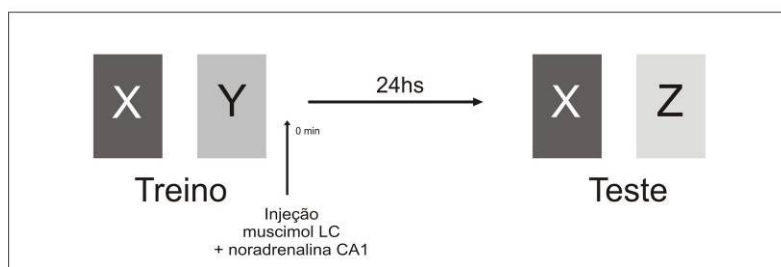


**Figura 21. Esquema do experimento 8.** Os animais foram treinados na tarefa de RO, sendo-lhes apresentados dois novos objetos (X e Y) para livre exploração. Imediatamente após o treino os animais receberam injeção de muscimol no PGI e noradrenalina em CA1. 24 h após o treino foram testados, sendo-lhes apresentados um objeto familiar (X) e um objeto novo (Z) para livre exploração.

#### **2.3.3.4.9 Experimento 9 – se a inibição do LC provoca amnésia na tarefa de RO pela via aqui proposta, a injeção de noradrenalina na região CA1 do hipocampo seria capaz de reverter tal efeito**

Os animais foram treinados na tarefa de RO e foi infundido muscimol no LC imediatamente pós-treino seguido pela infusão de noradrenalina na região CA1 do hipocampo imediatamente após o treino para verificar se a NA é capaz de reverter a possível amnésia na memória de RO causada pela inibição do LC (Figura 22). A inibição foi feita através da injeção de muscimol na concentração de 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 0,5  $\mu\text{l}/\text{lado}$ . A NA foi infundida na concentração de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 1  $\mu\text{l}/\text{lado}$ . Vinte e quatro horas após o treino foi testada a memória de longa duração.

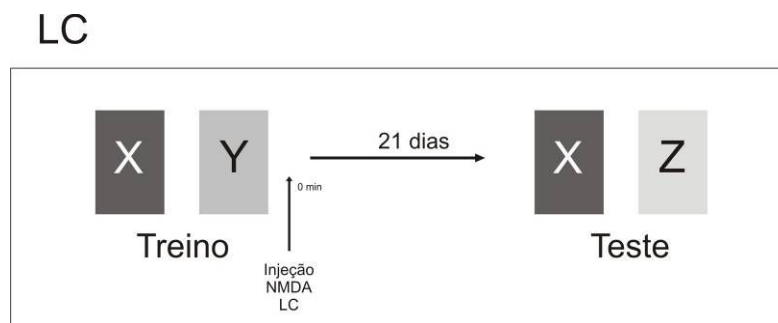
## LC + CA1



**Figura 22. Esquema do experimento 9.** Os animais foram treinados na tarefa de RO, sendo-lhes apresentados dois novos objetos (X e Y) para livre exploração. Imediatamente após o treino os animais receberam injeção de muscimol no LC e noradrenalina em CA1. 24 h após o treino foram testados, sendo-lhes apresentados um objeto familiar (X) e um objeto novo (Z) para livre exploração.

**2.3.3.4.10 Experimento 10 – se a injeção de noradrenalina na região CA1 do hipocampo melhora a persistência da memória de longa duração na tarefa de RO, a estimulação do LC deveria mimetizar esta ação.**

Os animais foram treinados na tarefa de RO e foi infundido NMDA no LC imediatamente após o treino para verificar se o NMDA, ao estimular o LC a liberar noradrenalina na região CA1 do hipocampo, é capaz de mimetizar os efeitos da injeção de noradrenalina exógena em CA1 (Figura 23). A estimulação do LC foi feita através da injeção de NMDA na concentração de 0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 0,25  $\mu\text{l}/\text{lado}$ . Vinte e um dias após o treino foi testada a memória de longa duração.



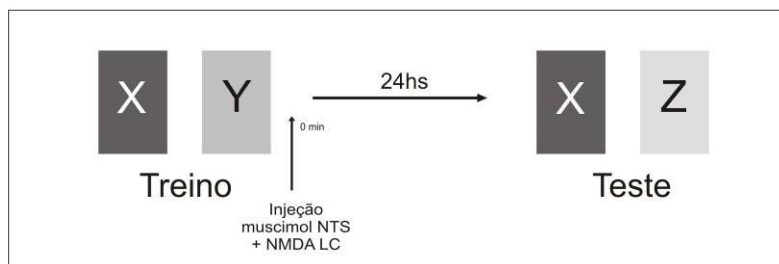
**Figura 23. Esquema do experimento 10.** Os animais foram treinados na tarefa de RO, sendo-lhes apresentados dois novos objetos (X e Y) para livre exploração. Imediatamente após o treino os animais receberam injeção de NMDA no LC. 21 dias após o treino foram testados, sendo-lhes apresentados um objeto familiar (X) e um objeto novo (Z) para livre exploração.

#### **2.3.3.4.11 Experimento 11 – se a inibição do NTS provoca amnésia na tarefa de RO pela via aqui proposta, a injeção de NMDA no LC seria capaz de reverter tal efeito**

Os animais foram treinados na tarefa de RO e foi infundido muscimol no NTS seguido pela infusão de NMDA em LC imediatamente após o treino para verificar se o NMDA, uma vez que estimula a liberação de NA em CA1, é capaz de reverter a possível amnésia na memória de RO causada pela inibição do NTS (Figura 24). A inibição foi feita através da injeção de muscimol na concentração de 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 0,5  $\mu\text{l}/\text{lado}$ . O NMDA foi infundido na concentração de 0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 0,25  $\mu\text{l}/\text{lado}$ . Vinte e quatro horas após o treino foi testada a memória de longa duração.



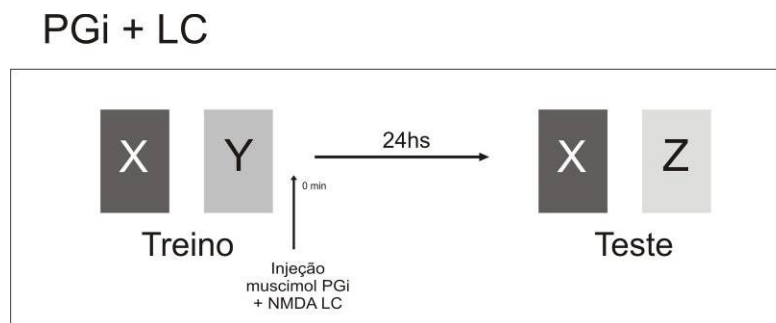
## NTS + LC



**Figura 24. Esquema do experimento 11.** Os animais foram treinados na tarefa de RO, sendo-lhes apresentados dois novos objetos (X e Y) para livre exploração. Imediatamente após o treino os animais receberam injeção de muscimol em NTS seguida da injeção de NMDA no LC. 24 h após o treino foram testados, sendo-lhes apresentados um objeto familiar (X) e um objeto novo (Z) para livre exploração.

**2.3.3.4.12 Experimento 12 – se a inibição do PGI provoca amnésia na tarefa de RO pela via aqui proposta, a injeção de NMDA no LC seria capaz de reverter tal efeito**

Os animais foram treinados na tarefa de RO e foi infundido muscimol no PGI seguido pela infusão de NMDA em LC imediatamente após o treino para verificar se o NMDA, uma vez que estimula a liberação de NA em CA1, é capaz de reverter a possível amnésia na memória de RO causada pela inibição do PGI (Figura 25). A inibição foi feita através da injeção de muscimol na concentração de 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 0,5  $\mu\text{l}/\text{lado}$ . O NMDA foi infundido na concentração de 0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 0,25  $\mu\text{l}/\text{lado}$ . Vinte e quatro horas após o treino foi testada a memória de longa duração.



**Figura 25. Esquema do experimento 12.** Os animais foram treinados na tarefa de RO, sendo-lhes apresentados dois novos objetos (X e Y) para livre exploração. Imediatamente após o treino receberam injeção de muscimol em PGi seguida da injeção de NMDA no LC. 24 h após o treino foram testados, sendo-lhes apresentados um objeto familiar (X) e um objeto novo (Z) para livre exploração.

### 2.3.3.5 Campo Aberto (CA)

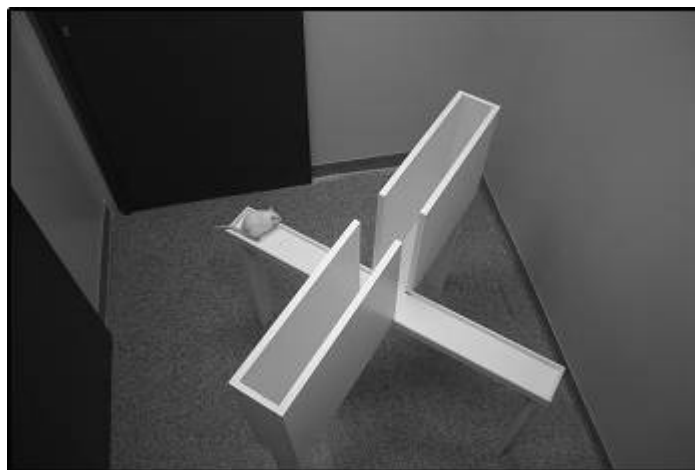
Para avaliar se a infusão das diferentes drogas não afetou a atividade locomotora e o comportamento exploratório dos animais no dia do teste utilizou-se um paradigma conhecido como campo aberto. O aparelho empregado para tal fim consiste em uma caixa de madeira com dimensões de 60 x 40 x 50 cm (comprimento x profundidade x altura) com a sua parede frontal de vidro transparente. O assoalho da caixa estava dividido por linhas pretas em 12 quadrantes com igual superfície (Figura 26). No dia seguinte à infusão da droga na região específica, o animal foi gentilmente colocado na arena do campo aberto, a qual ele pode explorar livremente por 5 min. Durante este tempo registrou-se o número de linhas cruzadas e o número de elevações sobre as patas traseiras, comportamentos que nos roedores denotam exploração (Bonini et al., 2006; da Silva et al., 2006).



**Figura 26. Aparato utilizado para a tarefa de Campo Aberto.**

### **2.3.3.6 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)**

Para avaliar se a infusão das diferentes drogas não afetou o estado de ansiedade dos animais no dia do teste, utilizou-se a tarefa do labirinto em cruz elevado. Este labirinto consiste em uma plataforma em cruz com 40 centímetros de comprimento em cada braço, posicionada a 1 metro de altura; dois braços contralaterais do labirinto possuem paredes elevadas, sendo denominados fechados, e os outros dois não possuem paredes, sendo denominados abertos (Figura 27). O aparelho é de madeira pintada de branco. No dia seguinte à infusão da droga na região específica, o animal foi colocado no centro do labirinto e deixado livre para explorá-lo por 5 min. Registrou-se o tempo de permanência e o número de entradas nos braços abertos e fechados. Quanto mais ansioso estiver o animal, maior o tempo de permanência nos braços fechados e o número de entradas nestes braços (Bevilaqua et al., 2003; Kerr et al., 2005; da Silva et al., 2006).



**Figura 27. Aparato utilizado para a tarefa de Labirinto em Cruz Elevado.**

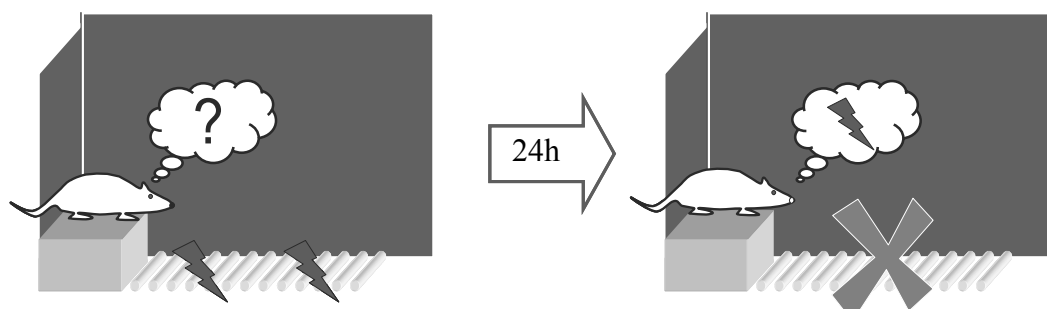
### **2.3.3.7 Esquiva Inibitória (EI)**

Para verificar se as intervenções farmacológicas realizadas durante os experimentos no RO poderiam afetar de forma duradoura a funcionalidade das estruturas infundidas (NTS, PGI, LC e hipocampo), em lugar de agir especificamente sobre o processo de consolidação da memória, animais previamente tratados com estas substâncias foram submetidos à tarefa de esquiva inibitória, paradigma no qual, para ser formada, a memória depende destas estruturas (Izquierdo e Medina, 1997 Izquierdo et al., 2006; Rossato et al., 2006; da Silva et al., 2008, Williams, Men e Clayton, 2000).

O aparelho utilizado para o treino na tarefa de esquiva inibitória de uma única sessão consistiu de uma caixa de madeira pintada de branco de 50,0 x 25,0 x 50,0 cm, com a parte frontal feita de acrílico transparente. O assoalho do aparelho é formado por barras de bronze paralelas de 1 mm de calibre, e no lado esquerdo da caixa, há uma plataforma de 5,0 cm de altura por 7,0 cm de largura.

Na sessão de treino, o animal foi cuidadosamente colocado sobre a plataforma elevada. Quando desceu desta e colocou as quatro patas na grade de barras de bronze eletrificáveis, recebeu um choque elétrico de 0,4 mA por 2 s

(Camarota *et al.*, 2003) sendo imediatamente recolocado na sua caixa-moradia. Para avaliar a retenção da memória de esquiva de longa duração, o animal foi submetido a uma sessão de teste comportamental 24 h após o treino (Figura 28). O procedimento utilizado na sessão de teste foi idêntico àquele empregado na sessão de treino, exceto que ao descer da plataforma o animal não recebeu choque. Para ambas as sessões, foram adotados tempos limite para a descida, sendo 30 s para a sessão de treino e 300 s para a sessão de teste. Aqueles animais que durante a sessão de treino não desceram da plataforma antes de transcorridos 30 s foram eliminados do estudo.



**Figura 28. Esquema da tarefa de Esquiva Inibitória.** Os animais são treinados e a memória de longa duração é testada 24 h após o treino.

#### 2.3.4. Etapa II: Procedimentos bioquímicos

Para os procedimentos bioquímicos propostos utilizamos 135 animais, sendo que em cada experimento cada grupo foi composto por 5 animais.

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais: i) grupo naive, grupo de controle absoluto total, estes animais não receberam nenhum estímulo experimental e foram utilizados como referência para as quantificações protéicas; ii) grupo habituado, cujos animais foram habituados os 4 dias (20min por dia) no

aparato da tarefa de RO; iii) grupo veículo, cujos os animais foram habituados, treinados na tarefa de RO e receberam a injeção de veículo da droga (salina) na região específica; e, iv) grupo droga, cujos animais foram habituados, treinados e receberam a injeção de droga na região específica.

Os mesmos procedimentos de inibição das diferentes regiões (NTS, PGI e LC) imediatamente após o treino no RO realizados nos experimentos comportamentais foram utilizados. Os animais foram sacrificados por decapitação 120 min após o treino (tempo após o treino no RO no qual nosso grupo já havia verificado que ocorria aumento da expressão protéica de BDNF – Furini et al., 2010) e foi retirada a região CA1 do hipocampo (ponto final da via estudada) para a realização dos experimentos descritos a seguir, com a finalidade de verificar as alterações na expressão protéica de BDNF em decorrência das inibições realizadas.

#### **2.3.4.1 Western blot**

Os animais foram mortos por decapitação e a região CA1 do hipocampo dorsal foi rapidamente dissecada, congelada e homogeneizada em tampão (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.32 M sacarose, 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM PMSF, 10 µg/ml aprotinina, 15 µg/ml leupeptina, 10 µg/ml bacitracina, 10 µg/ml pepstatina, 15 µg/ml inibidor da tripsina, 50 mM NaF, e 1 mM ortovanadato de sódio). A concentração de proteínas foi determinada utilizando o método de Bradford (1976) modificado, e quantidades iguais de proteínas foram fracionadas por SDS-PAGE antes de serem eletrotransferidas para membranas de difluoreto polivilideno (PVDF; Immobilon-P, Millipore, MS). Após a verificação do

carregamento das proteínas com coloração Ponceou S, as membranas foram bloqueadas em tampão salina Tween-Tris (TTBS; 100 mM Tris-HCl, pH 7,5, contendo 0,9 % NaCl e 0,1 % Tween 20) e incubadas por uma noite com anticorpo anti-BDNF (N20, 1:5,000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, Estados Unidos) ou anticorpo anti-tubulina (1:1,000, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos). As membranas foram lavadas em TTBS e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG, lavadas novamente, e a imunoreatividade foi detectada usando West-Pico enhanced kit de luminescência (Pierce, IL, Estados Unidos). A análise densitométrica foi realizada através do sistema ImageQuant RT-ECL (GE, Piscataway, NJ, Estados Unidos).

#### **2.3.4.2 Reagentes**

O muscimol, o timolol, o NMDA e a noradrenalina utilizados, e o anticorpo anti-tubulina foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, Estados Unidos). O anticorpo anti-BDNF foi adquirido da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, Estados Unidos). As drogas foram dissolvidas em salina e estocadas protegidas da luz a uma temperatura de -20°C até o uso. Imediatamente antes do uso as drogas foram divididas em alíquotas e diluídas para as concentrações de trabalho em salina 0,9 % (pH 7,2; veículo). As doses utilizadas foram determinadas com base em estudos pilotos e trabalhos prévios que apresentaram efeitos desses componentes no aprendizado e performance comportamental (Furini et al., 2010; Roozendaal et al., 2008; Clayton e Williams, 2000; Lemon et al., 2009).

Verificou-se a expressão protéica de BDNF na região CA1 do hipocampo após a infusão de diferentes drogas e/ou seus veículos em diferentes regiões encefálicas. Hipotetizamos que a inibição das diferentes áreas estudadas (NTS, PGI e LC), uma vez que cause amnésia na tarefa de RO, resulte em um bloqueio do aumento na expressão protéica de BDNF que ocorre 120 min após o treino no RO. Assim, verificamos também, se a infusão de noradrenalina na região CA1 do hipocampo e de NMDA no LC reverte esta possível amnésia, se ela reverte também o possível bloqueio do aumento da expressão de BDNF.

#### **2.4 Métodos estatísticos**

A análise estatística foi conduzida com o auxílio do programa Excel for Windows<sup>®</sup> e Prism version 5 (GraphPad Software<sup>®</sup>, San Diego, CA, Estados Unidos).

Inicialmente foi testada a normalidade dos dados; posterior a essa análise, foi adotado um teste estatístico paramétrico ou não-paramétrico, conforme os dados observados com a análise da curva de normalidade. O nível de significância considerado em todas as análises foi de  $P < 0,05$ .

Para a análise dos resultados da tarefa de RO foi utilizado o Teste t de Student de uma amostra. Para os resultados das tarefas de controle utilizou-se, para o Campo Aberto, Labirinto em Cruz Elevado e Esquiva Inibitória, ANOVA de uma via.

Os dados dos experimentos bioquímicos foram analisados utilizando ANOVA seguida de teste de Dunn *post-hoc*.



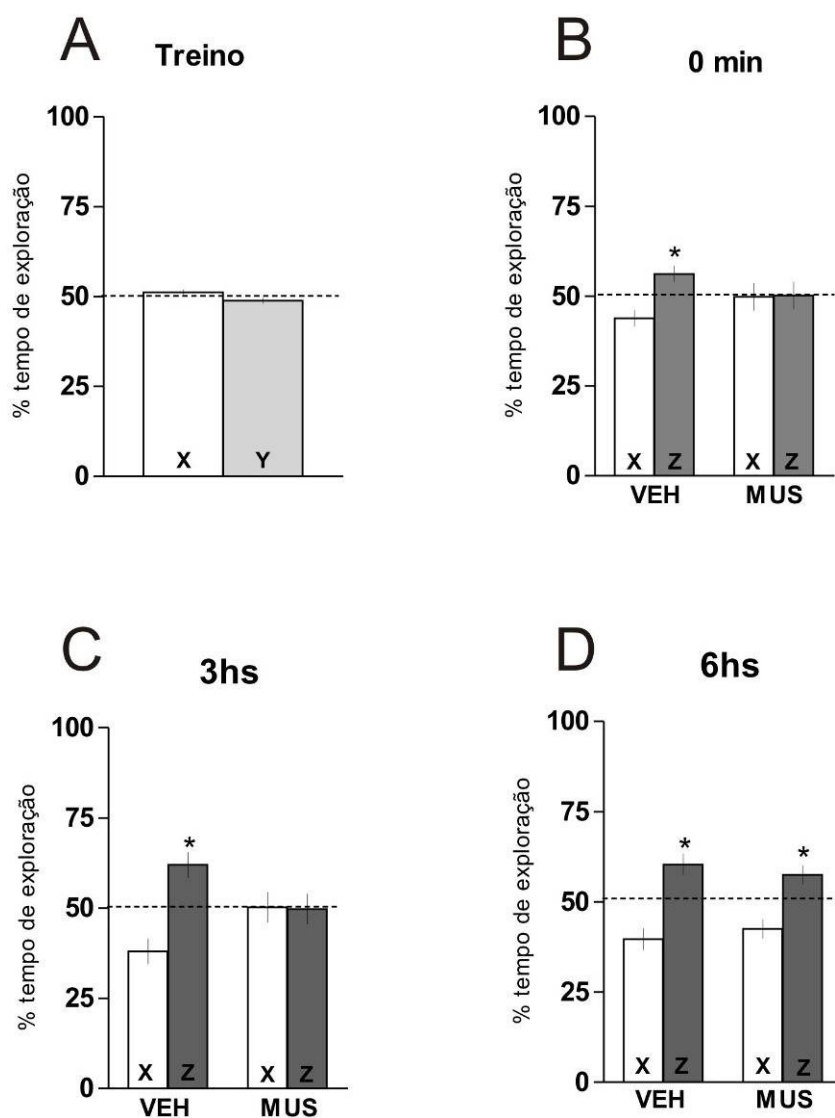
## **2.5 Aspectos Éticos**

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob o número 2008076, no dia 23 de junho de 2009 (ANEXO 2).

### III RESULTADOS

#### 3.1 O NTS participa da consolidação da memória de RO

Para analisar os efeitos da inibição do NTS na consolidação da memória de RO, ratos Wistar machos foram treinados na tarefa de RO, envolvendo a exposição a dois diferentes objetos (Fig. 29A). Imediatamente, 3 h ou 6 h após o treino, os animais receberam infusão bilateral intra-NTS de veículo (VEH; salina) ou muscimol (MUS; 0,1 µg/µl; 0,5 µl/lado). A MLD foi avaliada 24 h após o treino. Na sessão de teste, os animais foram expostos por 5 min a um dos objetos apresentados durante o treino junto a um objeto novo. Os ratos que receberam VEH ou MUS 6 h após o treino exploraram significativamente mais tempo o objeto novo do que o familiar (Fig. 29D). Ao contrário, os animais que receberam MUS imediatamente ou 3 h após a sessão de treino passaram o mesmo percentual de tempo explorando o objeto novo e o familiar (Fig. 29B, C), sugerindo que a ativação do NTS é necessária por pelo menos 3 h após o aprendizado para que ocorra retenção da memória de RO.

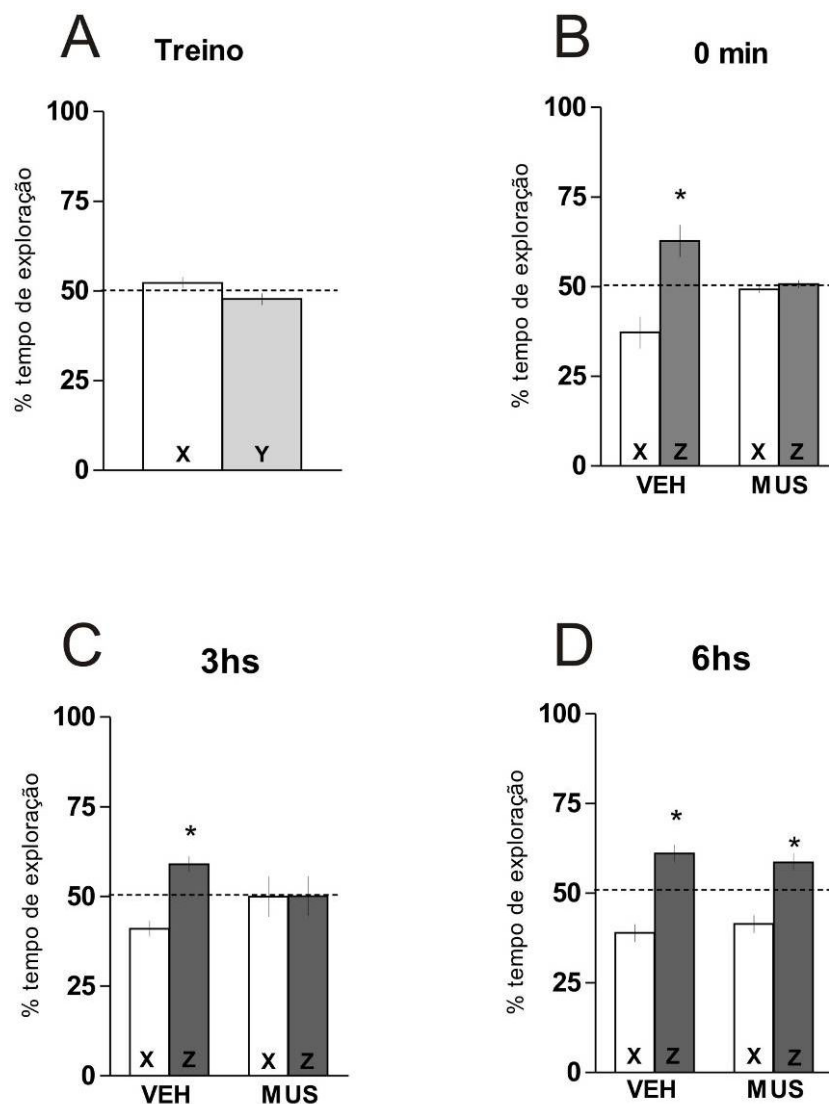


**Figura 29. A inibição do NTS com muscimol 0 min e 3 h, mas não 6 h após o treino prejudica a retenção da MLD de reconhecimento de objetos.** A: Na sessão de treino (dia 1) os ratos foram expostos a dois diferentes objetos (X e Y) por 5 min e imediatamente, 3 ou 6 h após o treino receberam infusão bilateral (0,5  $\mu$ l/lado) de veículo (VEH; salina) ou muscimol (MUS; 0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l) no NTS. Na sessão de teste (dia 2), os animais que receberam MUS 0 min (B), 3 h (C) and 6 h (D) após o treino foram expostos a um objeto familiar (X) e um objeto novo (Z) por cinco minutos para avaliar a retenção da memória de longa duração. Os dados (média  $\pm$  DP) são apresentados como um percentual do tempo total de exploração. \*  $P \leq 0,01$  no teste t de Student de uma via com uma média teórica = 50; n = 9 – 12 por grupo.

### 3.2 O PGI participa da consolidação da memória de RO

Para analisar os efeitos da inibição do PGI na consolidação da memória de RO fizemos os mesmos procedimentos. Imediatamente, 3 h ou 6 h após o treino

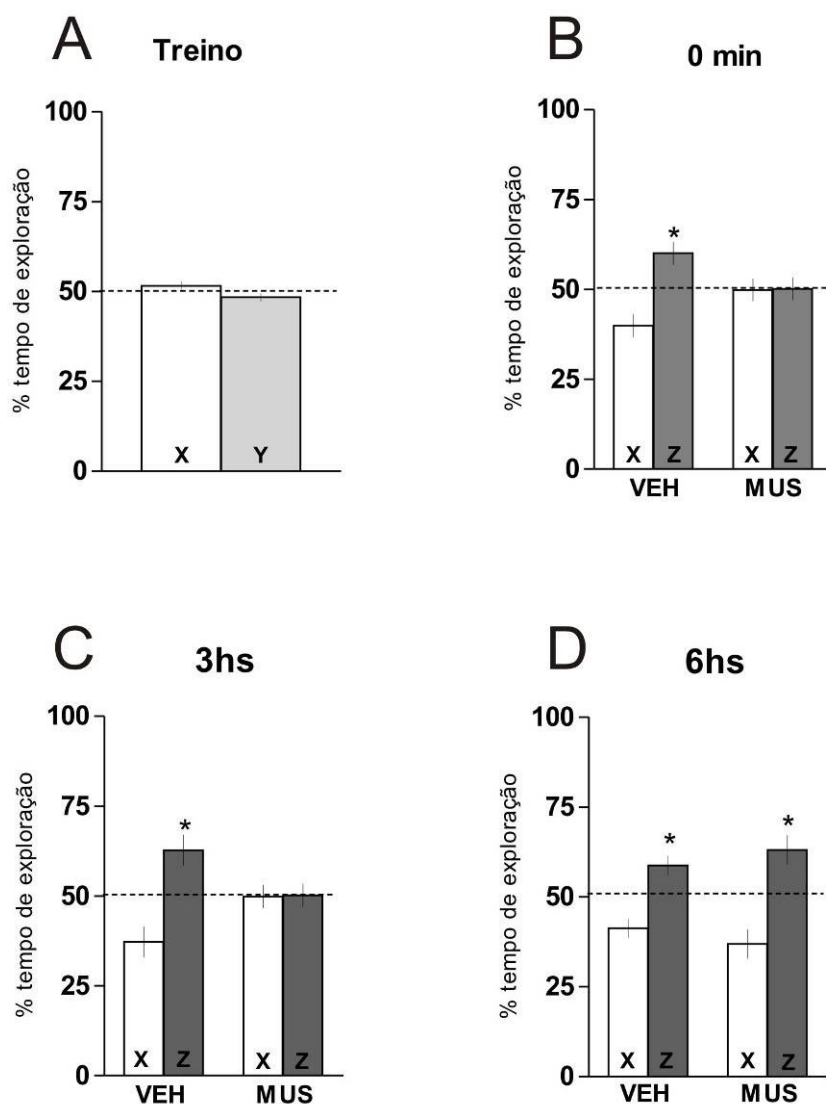
os animais receberam infusão bilateral intra-PGi de VEH ou MUS (0,1 µg/µl; 0,5 µl/lado). No teste de retenção da MLD, os ratos que receberam VEH ou MUS 6 h após o treino exploraram o objeto novo por um tempo significativamente maior que o objeto familiar (Fig. 30D). Ao contrário, os animais que receberam MUS imediatamente ou 3 h após a sessão de treino utilizaram um percentual de tempo semelhante explorando o objeto novo e o familiar (Fig. 30B, C), sugerindo que a ativação do PGi também é necessária, ao menos até 3 h após o treino no RO, para a retenção desta memória.



**Figura 30. A inibição do PGI com muscimol 0 min e 3 h, mas não 6 hs após o treino prejudica a retenção da MLD de reconhecimento de objetos.** A: Na sessão de treino (dia 1) os ratos foram expostos a dois diferentes objetos (X e Y) por 5 min e imediatamente, 3 ou 6 h após o treino receberam infusão bilateral (0,5  $\mu$ l/lado) de veículo (VEH; salina) ou muscimol (MUS; 0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l) no PGI. Na sessão de teste (dia 2), os animais que receberam MUS 0 min (B), 3 h (C) e 6 h (D) após o treino foram expostos a um objeto familiar (X) e um objeto novo (Z) por cinco minutos para avaliar a retenção da memória de longa duração. Os dados (média  $\pm$  DP) são apresentados como um percentual do tempo total de exploração. \*  $P \leq 0,01$  no teste t de Student de uma via com uma média teórica = 50; n = 9 – 12 por grupo.

### **3.3 O LC participa da consolidação da memória de RO**

Analisamos também os efeitos da inibição do LC na consolidação da memória de RO. Os animais receberam infusões bilaterais intra-LC de VEH ou MUS (0,2 µg/µl; 0,25 µl/lado) imediatamente, 3 ou 6 h após a sessão de treino. No teste de retenção da MLD, os ratos que receberam VEH ou MUS 6 h após o treino exploraram o novo objeto por um tempo significativamente maior que o objeto familiar (Fig. 31D). Ao contrário, os animais que receberam MUS imediatamente ou 3 h após a sessão de treino gastaram um tempo semelhante explorando o objeto novo e o familiar (Fig. 31B, C), sugerindo que a ativação do LC é necessária ao menos até 3 h após o aprendizado para que ocorra retenção da MLD.

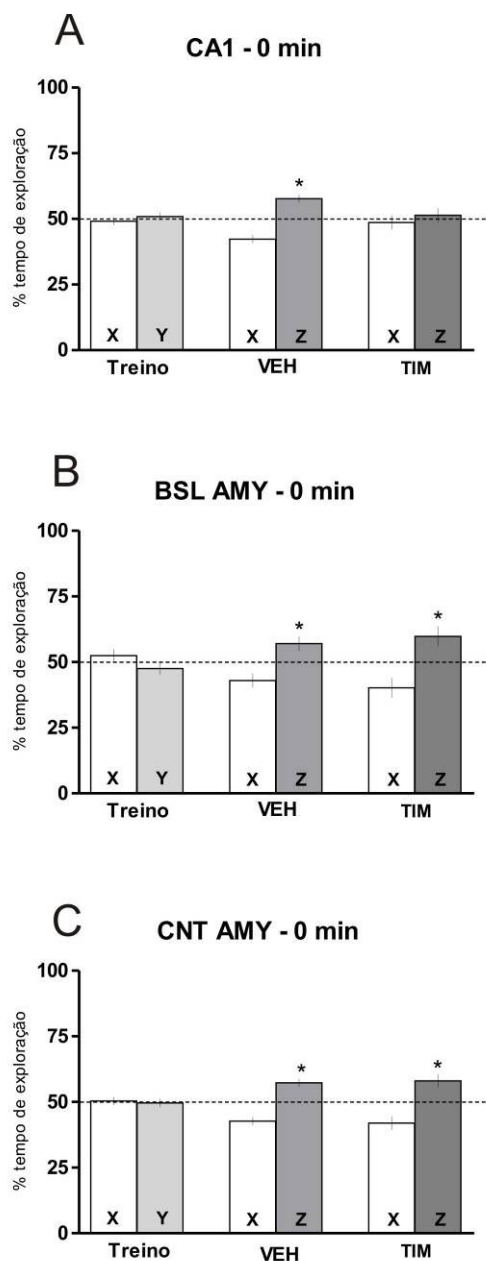


**Figura 31. A inibição do LC com muscimol 0 min e 3 h, mas não 6 h após o treino prejudica a retenção da MLD de reconhecimento de objetos.** A: Na sessão de treino (dia 1) os ratos foram expostos a dois diferentes objetos (X e Y) por 5 min e imediatamente, 3 ou 6 h após o treino receberam infusão bilateral (0,25  $\mu$ l/lado) de veículo (VEH; salina) ou muscimol (MUS; 0,2  $\mu$ g/ $\mu$ l) no LC. Na sessão de teste (dia 2), os animais que receberam MUS 0 min (B), 3 h (C) and 6 h (D) após o treino foram expostos a um objeto familiar (X) e um objeto novo (Z) por cinco minutos para avaliar a retenção da memória de longa duração. Os dados (média  $\pm$  DP) são apresentados como um percentual do tempo total de exploração. \*  $P \leq 0,01$  no teste t de uma via de Student, com uma média teórica = 50; n = 9 – 12 por grupo.

### **3.4 A noradrenalina é necessária para a consolidação da memória**

Para avaliar a necessidade de noradrenalina (NA) na região CA1 do hipocampo dorsal (CA1), na amígdala basolateral (AMY BSL) e na amígdala central (AMY CNT), treinamos ratos na tarefa de RO. Imediatamente após o treino os animais receberam infusão bilateral intra-CA1, intra-AMY BSL ou intra-AMY CNT de VEH ou timolol (TIM; 1 µg/µl; 1µl/lado para CA1 e 2 µg/µl; 0,5 µl/lado para AMY BSL e AMY CNT). A MLD foi avaliada 24 h depois. No teste de retenção da MLD, os ratos que receberam VEH ou TIM na AMY BSL e AMY CNT após o treino exploraram o objeto novo por um tempo significativamente maior que o familiar (Fig. 32B, C). Ao contrário, os animais que receberam TIM em CA1 gastaram um percentual de tempo semelhante explorando o objeto novo e o familiar (Fig. 32A), sugerindo que a atividade noradrenérgica na região CA1 do hipocampo dorsal é necessária para que ocorra consolidação da MLD.

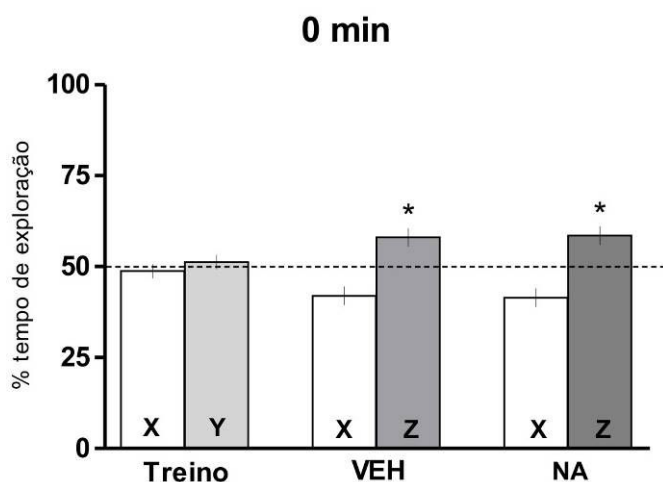




**Figura 32.** A infusão do antagonista  $\beta$ -adrenérgico timolol na região CA1 do hipocampo dorsal (CA1; A), mas não na amígdala basolateral (BSL AMY; B) ou central (CNT AMY; C) 0 min após o treino prejudica a retenção da MLD de reconhecimento de objetos. Na sessão de treino (dia 1) os ratos foram expostos a dois objetos diferentes (X e Y) por 5 min e imediatamente após receberam infusão bilateral (1  $\mu$ l/lado em CA1 e 0,5  $\mu$ l/lado em AMY BSL e AMY CNT) de veículo (VEH; salina) ou timolol (TIM; 1  $\mu$ g/ $\mu$ l para CA1 e 2  $\mu$ g/ $\mu$ l para AMY BSL e CNT). Na sessão de teste (dia 2), os animais foram expostos a um objeto (X) e um objeto novo (Z) por cinco minutos para avaliar a retenção da memória de longa duração. Os dados (média  $\pm$  DP) estão apresentados como percentual do tempo total de exploração. \*  $P \leq 0,01$  no teste t de uma via de Student com média teórica = 50; n = 9 – 12 por grupo.

### 3.5 A infusão de noradrenalina na região CA1 do hipocampo promove a persistência da memória de RO

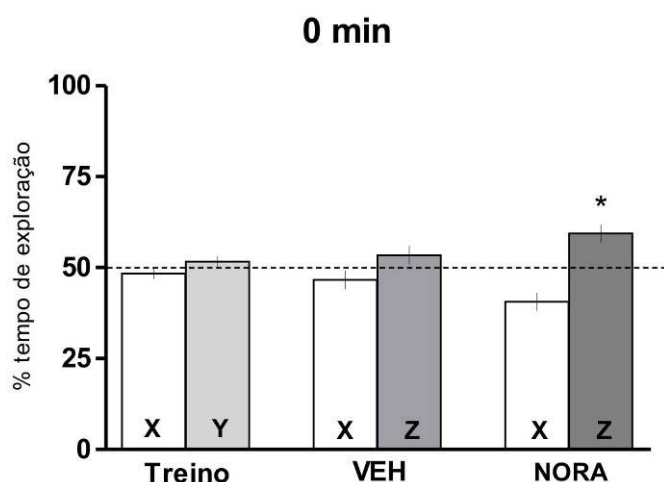
Para verificar os efeitos da noradrenalina na região CA1 do hipocampo dorsal ratos foram treinados na tarefa de RO. Imediatamente após o treino os animais receberam infusão bilateral intra-CA1 infusão de VEH ou NA (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 1  $\mu\text{l}/\text{lado}$ ). A MLD foi avaliada 24 h após o treino. No teste de retenção da MLD, os ratos que receberam VEH ou NA após o treino tiveram um comportamento semelhante, explorando o objeto novo por um tempo significativamente maior que o objeto familiar (Fig. 33), sugerindo que a NA não altera a consolidação deste tipo de memória.



**Figura 33. A infusão de noradrenalina na região CA1 do hipocampo 0 min após o treino não altera a retenção da MLD de reconhecimento de objetos testada 24 h após o aprendizado.** Na sessão de treino (dia 1) os ratos foram expostos a dois diferentes objetos (X e Y) por 5 min e imediatamente após receberam infusão bilateral (1  $\mu\text{l}/\text{lado}$ ) de veículo (VEH; salina) ou noradrenalina (NA; 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Na sessão de teste (dia 2), os animais foram expostos a um objeto familiar (X) e um objeto novo (Z) por cinco minutos para avaliar a retenção da memória de longa duração. Os dados (média  $\pm$  DP) estão apresentados como percentual do tempo total de exploração. \*  $P \leq 0,01$  no teste t de uma via de Student com média teórica = 50;  $n = 9 - 12$  por grupo.

Como no teste realizado 24 h após o aprendizado os ratos não tratados (VEH) apresentaram uma memória normal e na tarefa de RO é difícil perceber uma melhora de uma memória que já está funcionando bem, ao menos com o protocolo aqui utilizado, optamos por testar um grupo de animais 21 dias após o aprendizado (Fig. 34) para ver se o tratamento com NA pós-treino no hipocampo poderia afetar a persistência (Bekinschtein et al., 2007 Rossato et al., 2009), já que não a consolidação dessa tarefa.

Para isto, os animais foram treinados na tarefa de RO e, imediatamente após o treino receberam infusão bilateral intra-CA1 de VEH ou NA (1 µg/µl; 1µl/lado). A persistência da MLD foi avaliada 21 dias após o treino. Neste teste, os ratos que receberam VEH já não se lembravam do objeto familiar, explorando por um percentual de tempo similar os dois objetos (Fig. 34). Ao contrário, o grupo de animais que recebeu NA após o treino explorou o objeto novo por um tempo significativamente maior que o objeto familiar, sugerindo que a NA melhora a persistência da MLD na tarefa de RO.

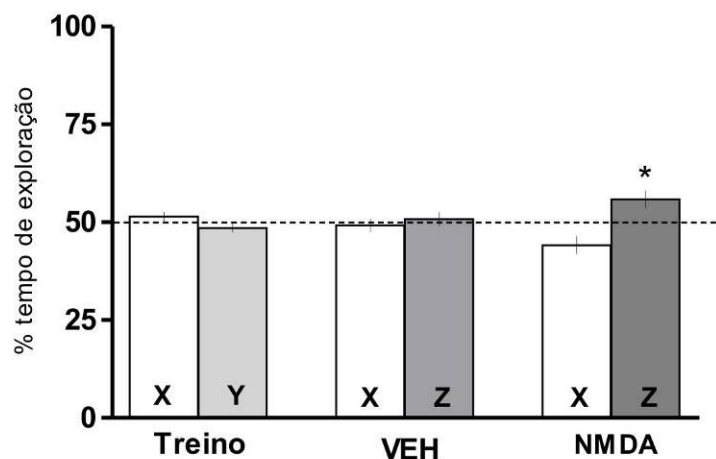


**Figura 34. A infusão de noradrenalina na região CA1 do hipocampo 0 min após o treino promove persistência da MLD de reconhecimento de objetos testada 21 dias após o aprendizado.** Na sessão de treino (dia 1) os ratos foram expostos a dois diferentes objetos (X e Y) por 5 min e imediatamente após receberam infusão bilateral (1  $\mu$ l/lado) de veículo (VEH; salina) ou noradrenalina (NA; 1  $\mu$ g/ $\mu$ l). Na sessão de teste (dia 21), os animais foram expostos a um objeto familiar (X) e um objeto novo (Z) por cinco minutos para avaliar a retenção da memória de longa duração. Os dados (média  $\pm$  DP) estão apresentados como percentual do tempo total de exploração. \*  $P \leq 0,01$  no teste t de uma via de Student com média teórica = 50; n = 9 – 12 por grupo.

### 3.6 A infusão de NMDA no LC promove a persistência da memória de RO

Os receptores NMDA estão localizados na membrana plasmática dos neurônios noradrenérgicos do LC (Grilli et al., 2009). Considerando que as projeções noradrenérgicas ao hipocampo provêm exclusivamente do LC, treinamos animais na tarefa de RO e, imediatamente após o treino infundimos bilateralmente intra-LC VEH ou NMDA (0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l; 0,25  $\mu$ l/lado). A persistência da MLD foi avaliada 21 dias após o treino. Neste teste, os ratos que receberam VEH já não se lembravam do objeto familiar, explorando por um percentual de tempo similar os dois objetos (Fig. 35). Ao contrário, o grupo de animais que recebeu NMDA após o treino explorou o objeto novo por um tempo significativamente maior que o objeto familiar, sugerindo que a ativação do LC promove a liberação

endógena de NA no hipocampo, melhorando a persistência da MLD na tarefa de RO, assim como a injeção exógena de NA promoveu.



**Figura 35. A infusão de NMDA no LC 0 min após o treino promove persistência da MLD de reconhecimento de objetos testada 21 dias após o aprendizado.** Na sessão de treino (dia 1) os ratos foram expostos a dois diferentes objetos (X e Y) por 5 min e imediatamente após receberam infusão bilateral (0,25 µl/lado) de veículo (VEH; salina) ou NMDA (0,1 µg/µl). Na sessão de teste (dia 21), os animais foram expostos a um objeto familiar (X) e um objeto novo (Z) por cinco minutos para avaliar a retenção da memória de longa duração. Os dados (média ± DP) estão apresentados como percentual do tempo total de exploração. \*  $P \leq 0,01$  no teste t de uma via de Student com média teórica = 50; n = 9 – 12 por grupo.

### **3.7 As drogas que tiveram efeito amnésico não alteraram a ansiedade e a atividade exploratória dos animais nem a integridade funcional das estruturas que receberam a infusão**

Para verificar se a amnésia causada pela inibição do NTS, PGI e LC com MUS e pela infusão de TIM na região CA1 do hipocampo foi causada realmente por um prejuízo no processo de consolidação da memória, e não induzida por um prejuízo das funções destas estruturas (como uma lesão das mesmas durante a injeção das drogas causada pela própria infusão ou pela ação das drogas), a

ansiedade, a atividade exploratória e a memória aversiva, dependente destas estruturas, foram testadas.

Os ratos receberam infusão bilateral da droga dentro de cada uma das estruturas mencionadas no parágrafo anterior 24 h antes de serem expostos ao Labirinto em Cruz Elevado (LCE) ou ao Campo Aberto (CA). O MUS no NTS, PGi e LC e o TIM em CA1 não tiveram efeito sobre o número total de entradas ou o percentual de tempo gasto nos braços abertos durante a sessão do LCE (Tabela 2 – LCE).

Similarmente, as drogas não tiveram nenhum efeito sobre o número de cruzamentos ou elevações durante uma sessão de 5 min de livre exploração no CA (Tabela 2 – CA).

Também, quando as drogas foram infundidas 24 h antes do treino na tarefa de Esquiva Inibitória (EI), elas não afetaram a aquisição ou a retenção da MLD testada 24 h após o treino (Tabela 2 – EI), uma tarefa que requer a integridade funcional do NTS (Kerfoot et al., 2008; Roozental et al., 1999), PGi (Clayton and Williams, 2000; Annis and Aston-Jones, 1988), LC (Clayton and Williams, 2000) e da formação hipocampal (Izquierdo et al., 2006).

**Tabela 2. Infusões bilaterais de muscimol (MUS) intra-NTS/PGi/LC e intra-CA1 de timolol (TIM), não tem efeito sobre a atividade locomotora e exploratória, ansiedade ou integridade funcional do NTS, PGi, LC e CA1.**

	<i>VEH</i>	<i>MUS NTS</i>	<i>MUS PGi</i>	<i>MUS LC</i>	<i>TIM CA1</i>
Labirinto em Cruz Elevado					
Total de entradas	16,55 ± 1,63	14,78 ± 1,34	11,87 ± 1,86	14,1 ± 0,76	13,7 ± 1,00
Tempo nos braços abertos (s)	154,0 ± 7,28	178,8 ± 15,11	121,00 ± 12,51	180,7 ± 6,74	150,0 ± 20,00
Campo Aberto					
Cruzamentos	39,33 ± 6,04	42,08 ± 4,63	39,50 ± 6,95	45,33 ± 7,66	51,25 ± 7,63
Elevações	9,00 ± 1,51	8,92 ± 1,86	6,89 ± 2,17	8,36 ± 1,55	7,77 ± 2,60
Esquiva Inibitória					
Latência de descida da plataforma no treino (s)	14,39 ± 7,53	18,34 ± 6,66	15,89 ± 5,67	10,87 ± 4,44	10,18 ± 3,18
Latência de descida da plataforma no teste (s)	256,9 ± 79,76	250,3 ± 72,07	239,78 ± 49,97	221,8 ± 36,7	226,70 ± 43,79

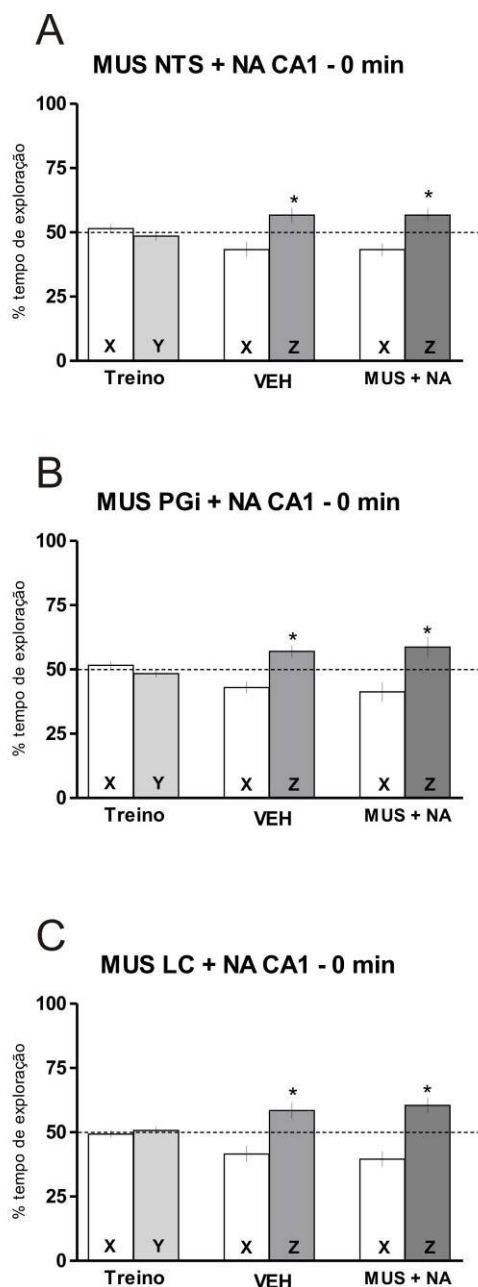
MUS (0,5 µg/lado no NTS e PGi; 0,25 µg/lado no LC) e TIM (1 µg/lado no CA1) foram infundidas 24 h antes do LCE, CA ou sessão de treino na EI. Dados estão expressos como média (± EP) do número total d entradas e tempo gasto nos braços abertos (LCE; n = 8 por grupo), número de cruzamentos e elevações (CA; n = 8 por grupo) e latência de descida da plataforma na sessão de treino e teste (s; EI; n = 8 por grupo). VEH = veículo. MUS = muscimol. TIM = timolol.

### **3.8 A infusão de noradrenalina na região CA1 do hipocampo reverte o efeito amnésico causado pela inibição do NTS, PGi e LC**

Considerando que a via NTS-PGi-LC inerva a região CA1 do hipocampo dorsal (desconsideramos nesta parte do trabalho a amígdala porque não encontramos efeito amnésico na tarefa de RO diante da inibição dos receptores β-noradrenérgicos desta estrutura), nós investigamos se a amnésia causada pela infusão MUS no NTS, PGi e LC pode ser revertida pela injeção de noradrenalina na região CA1 do hipocampo. Os ratos foram treinados na tarefa de RO e imediatamente após receberam infusão bilateral intra-NTS, -PGi ou -LC de VEH ou MUS (0,1 µg/µl; 0,5 µl/lado para NTS e PGi ou 0,2 µg/µl; 0,25 µl/lado para LC) seguida pela infusão bilateral intra-CA1 de VEH ou NA (1 µg/µl; 1µl/lado). A MLD foi avaliada 24 h após o treino. No teste de retenção da MLD, os ratos que

receberam VEH ou MUS + NA após o treino exploraram o objeto novo por um tempo significativamente maior que o objeto familiar (Fig. 36), sugerindo que a amnésia causada pela inibição do NTS, PGI e LC na tarefa de RO ocorre porque com a inibição das diferentes etapas desta via deixa de haver liberação de noradrenalina na região CA1 do hipocampo.

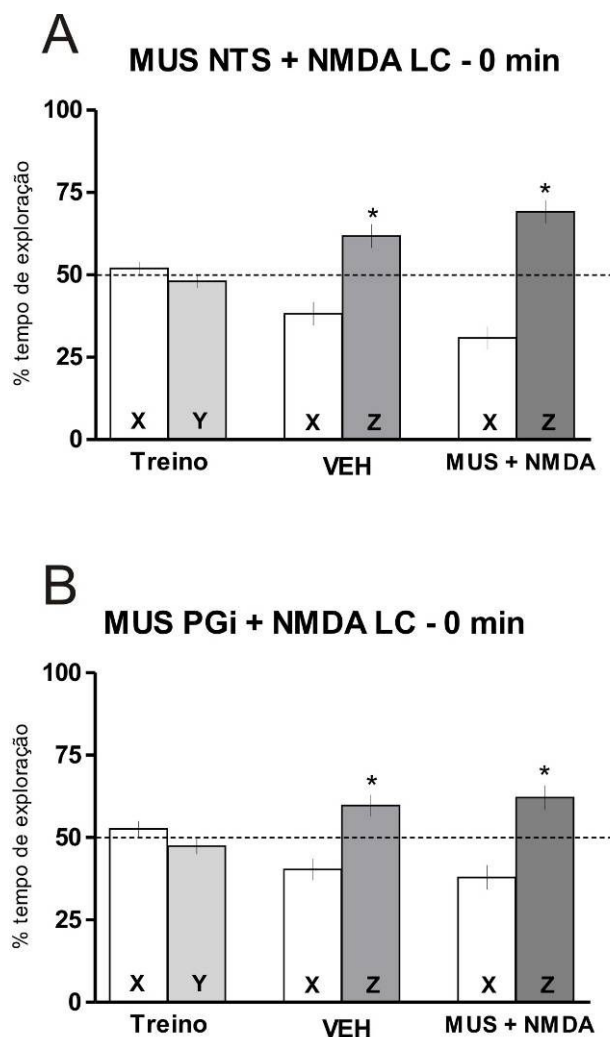




**Figura 36.** A infusão de noradrenalina na região CA1 do hipocampo imediatamente após a infusão de muscimol no NTS (A), PGI (B) e LC (C) 0 min após o treino na tarefa de reconhecimento de objetos reverte a amnésia causada pelo muscimol. Na sessão de treino (dia 1) os ratos foram expostos a dois objetos diferentes (X e Y) por 5 min e imediatamente após receberam a infusão bilateral de veículo (VEH; salina) ou muscimol no NTS, PGI ou LC + noradrenalina em CA1 (MUS: 0,1 µg/µl, 0,5 µl/lado para NTS e PGI; 0,2 µg/µl, 0,25 µl/lado para LC; NA: 1 µg/µl, 1 µl/lado para CA1). Na sessão de teste (dia 2), os animais foram expostos a um objeto familiar (X) e um objeto novo (Z) por cinco minutos para avaliar a retenção da memória de longa duração. Os dados (média ± DP) estão apresentados como percentual do tempo total de exploração. \*  $P \leq 0,01$  no teste t de uma via de Student com média teórica = 50;  $n = 9 - 12$  por grupo.

### **3.9 A infusão de NMDA no LC reverte o efeito amnésico causado pela infusão de muscimol no NTS e PGI após o treino na tarefa de RO**

Para investigar se a amnésia causada pela infusão de MUS no NTS e PGI pode ser revertida pela estimulação de um ponto subsequente da via, nós estimulamos o LC com NMDA após a inibição dos pontos anteriores da via. Ratos foram treinados na tarefa de RO e, imediatamente após o treino receberam infusão bilateral intra-NTS ou -PGI de VEH ou MUS (0,1 µg/µl; 0,5 µl/lado) e infusão bilateral intra-LC de VEH ou NMDA (0,1 µg/µl; 0,25 µl/lado). A MLD foi avaliada 24 h após o treino. No teste de retenção da MLD os ratos que receberam VEH ou MUS + NMDA após o treino exploraram o novo objeto por um tempo significativamente maior que o familiar (Fig. 37), sugerindo que a infusão de NMDA no LC pode reverter o déficit de memória causado pela inibição do NTS (Fig. 37A) e do PGI (Fig. 37B) na tarefa de RO.



**Figura 37. A** infusão de NMDA no LC imediatamente após a infusão de muscimol no NTS (A) e PGi (B) 0 min após o treino na tarefa de reconhecimento de objetos reverte a amnésia causada pelo muscimol. Na sessão de treino (dia 1) os ratos foram expostos a dois objetos diferentes (X e Y) por 5 min e imediatamente após receberam a infusão bilateral de veículo (VEH; salina) ou muscimol no NTS ou PGi + NMDA em LC (MUS: 0,1 µg/µl, 0,5 µl/lado para NTS e PGi; NMDA: 0,1 µg/µl, 0,25 µl/lado para CA1). Na sessão de teste (dia 2), os animais foram expostos a um objeto familiar (X) e um objeto novo (Z) por cinco minutos para avaliar a retenção da memória de longa duração. Os dados (média ± DP) estão apresentados como percentual do tempo total de exploração. \*  $P \leq 0,01$  no teste t de uma via de Student com média teórica = 50; n = 9 – 12 por grupo.

### 3.10 As drogas ou combinações de drogas administradas não alteraram o tempo total de exploração dos objetos durante o teste na tarefa de RO

Nenhuma das drogas ou combinação de drogas utilizadas afetou o tempo total de exploração durante a sessão de teste no RO (Tabela 3).

**Tabela 3. A administração intra-estrutura de muscimol, timolol, noradrenalina, NMDA ou combinações destas drogas não afetou a exploração na tarefa de RO.**

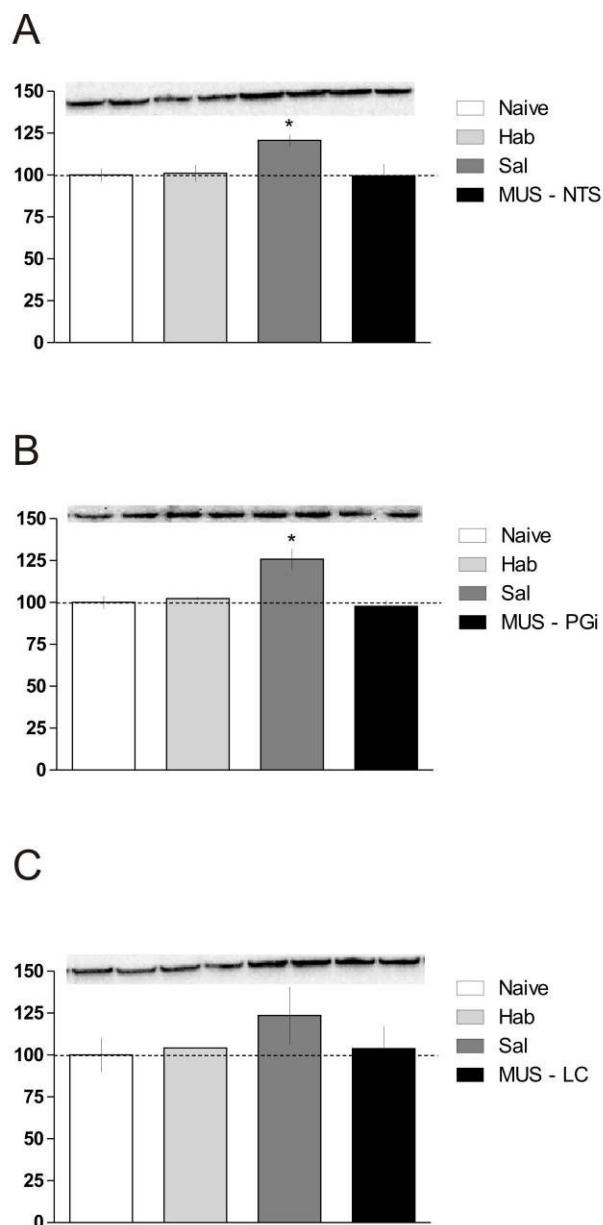
	Tempo total de exploração (s)
Sessão de treino	48,38 ± 9,72
Sessão de teste	
VEH	47,95 ± 4,14
MUS NTS (0,5 µg/lado; 0,1 µg/µl)	48,57 ± 4,71
MUS PGi (0,5 µg/lado; 0,1 µg/µl)	37,99 ± 5,71
MUS LC (0,25 µg/lado; 0,2 µg/µl)	43,31 ± 3,77
TIM CA1 (1 µg/lado; 1 µg/µl)	44,28 ± 4,77
NA CA1 (1 µg/lado; 1 µg/µl)	47,28 ± 6,8
TIM AMY BSL (0,5 µg/lado; 2 µg/µl)	35,92 ± 6,37
TIM AMY CNT (0,5 µg/lado; 2 µg/µl)	49,33 ± 5,93
MUS NTS + NA CA1 (0,5 µg/lado; 0,1 µg/µl + 1 µg/lado; 1 µg/µl)	52,32 ± 11,83
MUS PGi + NA CA1 (0,5 µg/lado; 0,1 µg/µl + 1 µg/lado; 1 µg/µl)	49,66 ± 8,38
MUS LC + NA CA1 (0,25 µg/lado; 0,2 µg/µl + 1 µg/lado; 1 µg/µl)	42,1 ± 8,52
MUS NTS + NMDA LC (0,5 µg/lado; 0,1 µg/µl + 0,25 µg/lado; 0,1 µg/µl)	38,59 ± 6,4
MUS PGi + NMDA LC (0,5 µg/lado; 0,1 µg/µl + 0,25 µg/lado; 0,1 µg/µl)	37,71 ± 8,48

Tempo total de exploração (s; média ± DP) durante a sessão de treino e teste para os animais apresentados nos experimentos anteriores. VEH = veículo. MUS = muscimol. TIM = timolol. NA = noradrenalina.

### 3.11 A inativação do NTS, PGi ou LC com muscimol imediatamente após o treino no RO impede que ocorra o aumento da expressão de BDNF decorrente do aprendizado 120 min após o mesmo.

Achados recentes indicaram que 120 min após o treino no RO ocorre um aumento na expressão de BDNF na região CA1 do hipocampo dorsal (Furini et al., 2010). O BDNF tem um papel essencial na formação e persistência da memória (Bekinschtein et al., 2008; Romero-Granados et al., 2009). Assim, nós estudamos um possível *link* entre a ativação da via NTS–PGi–LC–CA1 e a expressão protéica de BDNF durante a consolidação da memória de RO. Nós

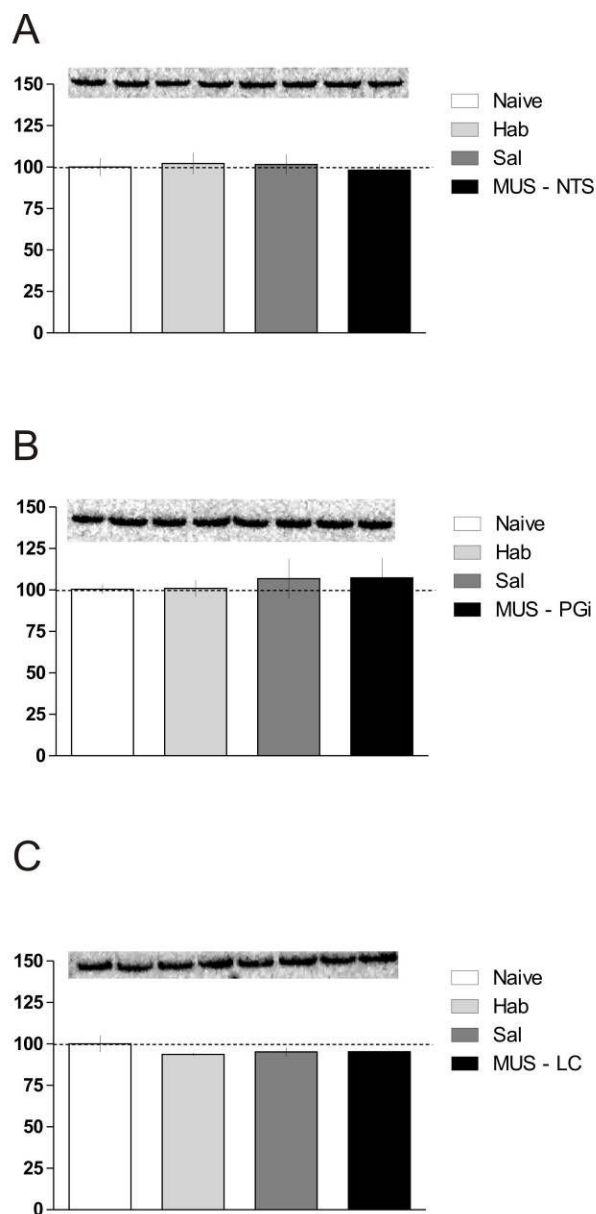
verificamos que a inativação do NTS (Fig. 38A), PGi (Fig. 38B) ou LC (Fig. 38C) com MUS impede o aumento do BDNF que ocorre 120 min após o treino na tarefa de RO.



**Figura 38.** O treino na tarefa de reconhecimento de objetos promove um aumento da expressão de BDNF 120 min após o aprendizado; este aumento é bloqueado pela infusão de muscimol no NTS (A), PGI (B) e LC (C). Os animais receberam implantação cirúrgica de cânulas (Naive), foram habituados por 4 dias (Hab) e/ou treinados na tarefa de RO (Sal e MUS). Os ratos treinados foram expostos a dois objetos diferentes por 5 min e imediatamente após o treino receberam infusão bilateral de salina (Sal) ou muscimol (MUS) no NTS, PGI (0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 0,5  $\mu\text{l}/\text{lado}$ ) ou LC (0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 0,25  $\mu\text{l}/\text{lado}$ ). 120 min após, os animais foram mortos por decapitação, a região CA1 do hipocampo dissecada e o homogeneizado total submetido ao SDS-PAGE seguido por análise de *immunoblot* com anticorpos contra o BDNF. As barras representam os níveis percentuais de BDNF em relação ao grupo controle (Naive). Os dados estão apresentados como média  $\pm$  DP. \*  $P \leq 0,05$  no teste de *Dunnnett* após ANOVA;  $n = 5$  por grupo.

**3.12 A inativação do NTS, PGI ou LC com muscimol imediatamente após o treino no RO não altera a expressão de tubulina 120 min após o aprendizado.**

Como experimento controle medimos a expressão de tubulina utilizando as mesmas amostras. A expressão de tubulina, ao contrário da de BDNF, foi igual em todos os grupos (Fig. 39).

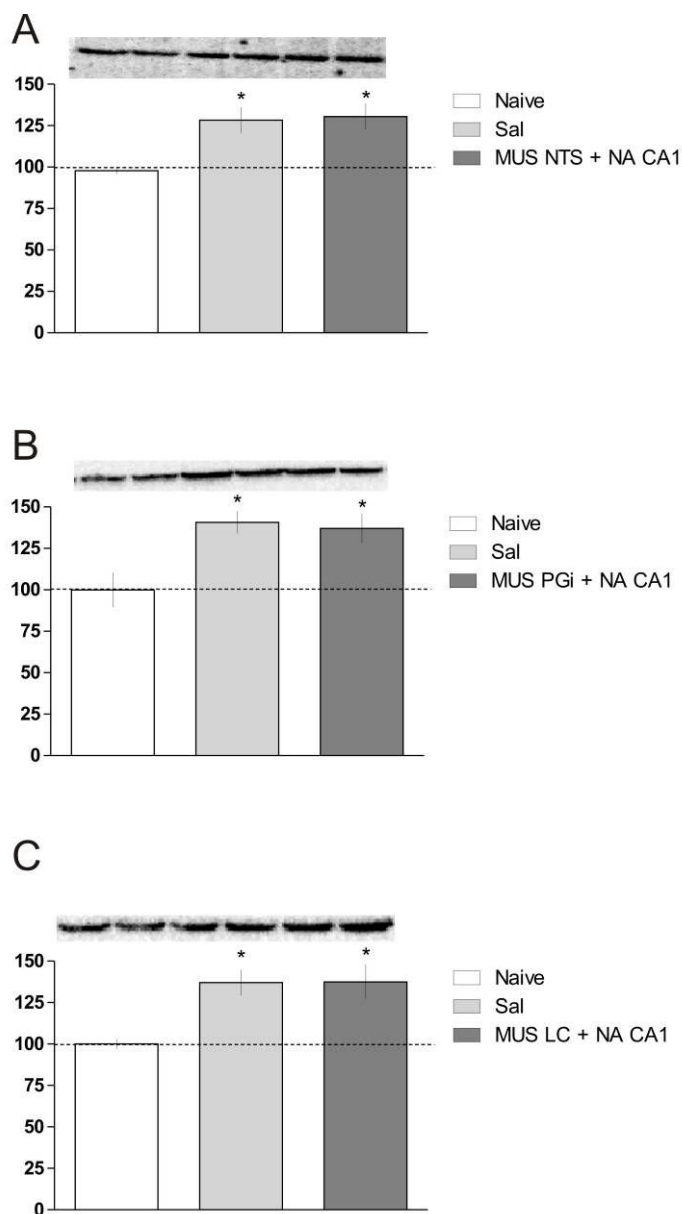


**Figura 39. A** infusão de muscimol no NTS (A), PGI (B) e LC (C) após o treino na tarefa de RO não altera a expressão de tubulina 120 min após o aprendizado. Os animais receberam implantação cirúrgica de cânulas (Naive), foram habituados por 4 dias (Hab) e/ou treinados na tarefa de RO (Sal e MUS). Os ratos treinados foram expostos a dois objetos diferentes por 5 min e imediatamente após o treino receberam infusão bilateral de salina (Sal) ou muscimol (MUS) no NTS, PGI (0,1 µg/µl; 0,5 µl/lado) ou LC (0,2 µg/µl; 0,25 µl/lado). 120 min após, os animais foram mortos por decapitação, a região CA1 do hipocampo dissecado e o homogeneizado total submetido ao SDS-PAGE seguido por análise de *immunoblot* com anticorpos contra a tubulina. As barras representam os níveis percentuais de tubulina em relação ao grupo controle (Naive). Os dados estão apresentados como média ± DP. \*  $P \leq 0,05$  no teste de *Dunnnett* após ANOVA;  $n = 5$  por grupo.



**3.13 A infusão de noradrenalina na região CA1 do hipocampo imediatamente após a infusão de muscimol no NTS, PGI ou LC permite que ocorra o aumento da expressão de BDNF decorrente do aprendizado 120 min após este**

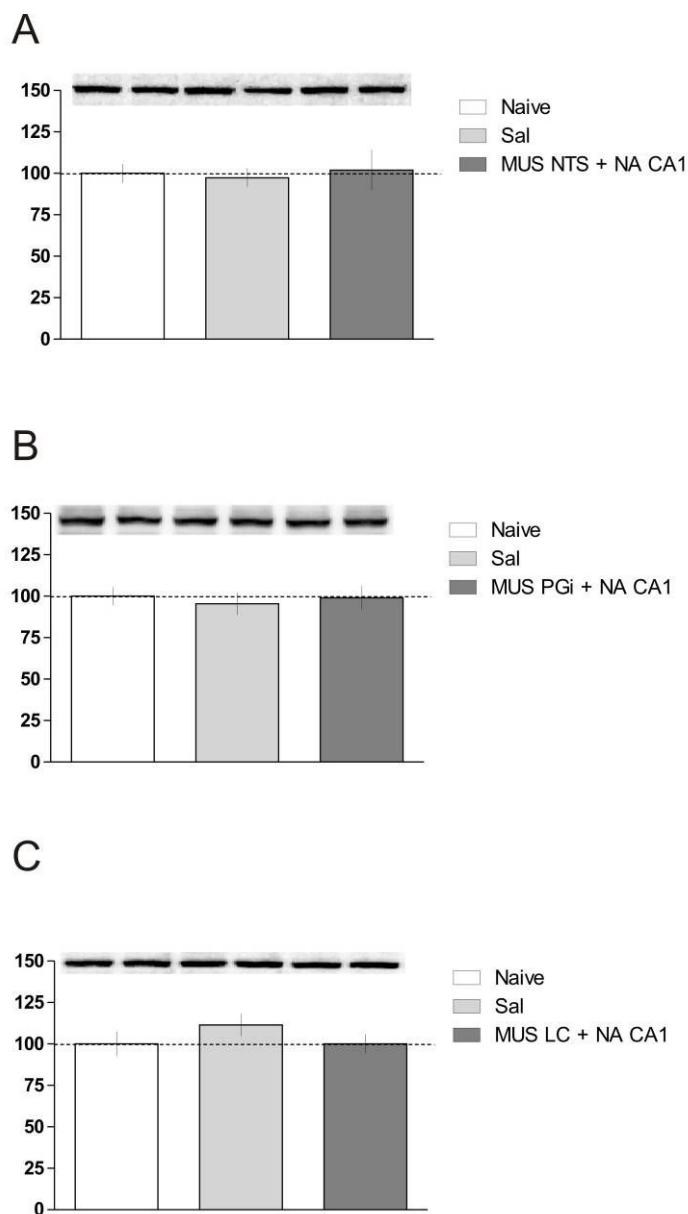
A infusão de noradrenalina na região CA1 do hipocampo imediatamente após a infusão de MUS no NTS (Fig. 40A), PGI (Fig. 40B) ou LC (Fig. 40C) reverte o efeito do muscimol e permite que o aumento da expressão de BDNF que ocorre 120 min após o treino no RO volte a ocorrer.



**Figura 40.** A infusão de NA na região CA1 do hipocampo imediatamente após a infusão de muscimol no NTS (A), PGI (B) ou LC (C) logo após o treino na tarefa de RO permite que ocorra o aumento da expressão de BDNF decorrente do aprendizado 120 min após o treino. Os animais receberam implantação cirúrgica de cânulas (Naive) e/ou treinados na tarefa de RO (Sal e MUS+NA). Os ratos treinados foram expostos a dois objetos diferentes por 5 min e imediatamente após o treino receberam infusão bilateral de salina (Sal) ou muscimol + noradrenalina (MUS+NA); MUS no NTS, PGI (0,1 µg/µl; 0,5 µl/lado) ou LC (0,2 µg/µl; 0,25 µl/lado) e NA em CA1 (1 µg/µl; 1 µl/lado). 120 min após, os animais foram mortos por decapitação, a região CA1 do hipocampo dissecada e o homogeneizado total submetido ao SDS-PAGE seguido por análise de *immunoblot* com anticorpos contra o BDNF. As barras representam os níveis percentuais de BDNF em relação ao grupo controle (Naive). Os dados estão apresentados como média ± DP. \*  $P \leq 0,05$  no teste de *Dunnnett* após ANOVA; n = 5 por grupo.

**3.14 A infusão de noradrenalina na região CA1 do hipocampo imediatamente após a infusão de muscimol no NTS, PGI ou LC não altera a expressão de tubulina 120 min após este**

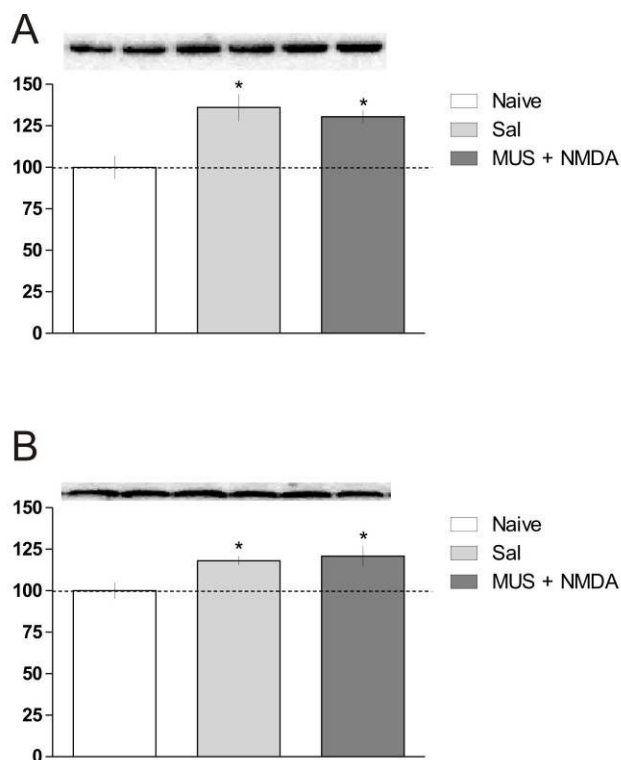
Como experimento controle medimos a expressão de tubulina utilizando as mesmas amostras do experimento anterior. A expressão de tubulina, ao contrário da de BDNF, foi igual em todos os grupos (Fig. 41).



**Figura 41. A** infusão de NA na região CA1 do hipocampo imediatamente após a infusão de muscimol no NTS (A), PGi (B) ou LC (C) logo após o treino na tarefa de RO não altera a expressão de tubulina 120 min após o treino. Os animais receberam implantação cirúrgica de cânulas (Naive) e/ou treinados na tarefa de RO (Sal e MUS+NA). Os ratos treinados foram expostos a dois objetos diferentes por 5 min e imediatamente após o treino receberam infusão bilateral de salina (Sal) ou muscimol + noradrenalina (MUS+NA); MUS no NTS, PGi (0,1 µg/µl; 0,5 µl/lado) ou LC (0,2 µg/µl; 0,25 µl/lado) e NA em CA1 (1 µg/µl; 1 µl/lado). 120 min após, os animais foram mortos por decapitação, a região CA1 do hipocampo dissecada e o homogeneizado total submetido ao SDS-PAGE seguido por análise de *immunoblot* com anticorpos contra a tubulina. As barras representam os níveis percentuais de tubulina em relação ao grupo controle (Naive). Os dados estão apresentados como média ± DP. \*  $P \leq 0,05$  no teste de *Dunnnett* após ANOVA; n = 5 por grupo.

**3.15 A infusão de NMDA no LC imediatamente após a infusão de muscimol no NTS ou PGi permite que ocorra o aumento da expressão de BDNF decorrente do aprendizado 120 min após este**

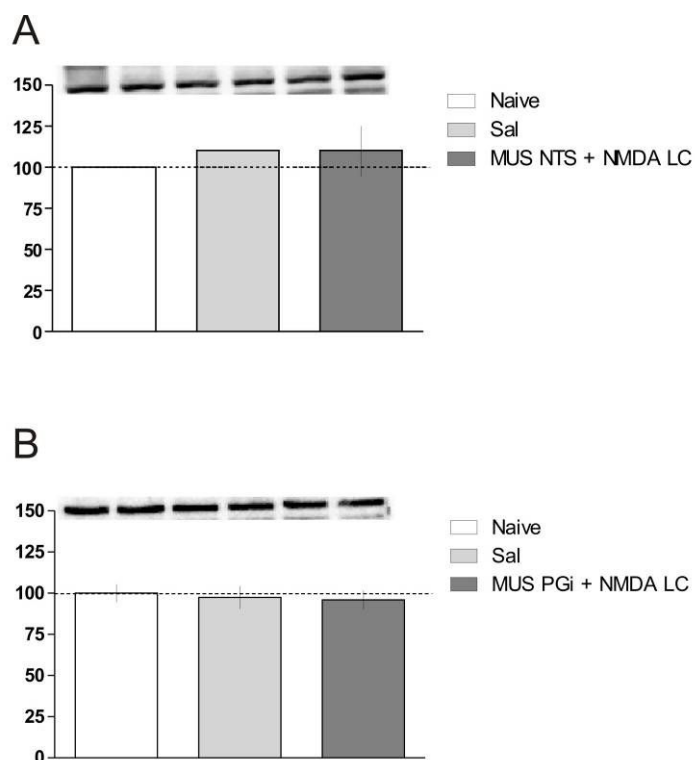
A infusão de NMDA no LC após a infusão de MUS no NTS (Fig. 42A) ou PGi (Fig. 42B) permite que o aumento da expressão de BDNF decorrente do aprendizado 120 min após o treino no RO volte a ocorrer, revertendo o efeito amnésico da injeção de muscimol.



**Figura 42. A** infusão de NMDA no LC imediatamente após a infusão de muscimol no NTS (A) ou PGI (B) logo após o treino na tarefa de RO permite que ocorra o aumento da expressão de BDNF decorrente do aprendizado 120 min após o treino. Os animais receberam implantação cirúrgica de cânulas (Naive) e/ou treinados na tarefa de RO (Sal e MUS+NMDA). Os ratos treinados foram expostos a dois objetos diferentes por 5 min e imediatamente após o treino receberam infusão bilateral de salina (Sal) ou muscimol + NMDA (MUS+NMDA); MUS no NTS ou PGI (0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 0,5  $\mu\text{l}/\text{lado}$ ) e NMDA em LC (0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 0,25  $\mu\text{l}/\text{lado}$ ). 120 min após, os animais foram mortos por decapitação, a região CA1 do hipocampo dissecada e o homogeneizado total submetido ao SDS-PAGE seguido por análise de *immunoblot* com anticorpos contra o BDNF. As barras representam os níveis percentuais de BDNF em relação ao grupo controle (Naive). Os dados estão apresentados como média  $\pm$  DP. \*  $P \leq 0,05$  no teste de *Dunnett* após ANOVA;  $n = 5$  por grupo.

### 3.16 A infusão de NMDA no LC imediatamente após a infusão de muscimol no NTS, ou PGI não altera a expressão de tubulina 120 min após este

Como experimento controle medimos a expressão de tubulina utilizando as mesmas amostras. A expressão de tubulina, ao contrário da de BDNF, foi igual em todos os grupos (Fig. 43).



**Figura 43. A** infusão de NMDA no LC imediatamente após a infusão de muscimol no NTS **(A)** ou PGI **(B)** logo após o treino na tarefa de RO não altera a expressão de tubulina 120 min após o treino. Os animais receberam implantação cirúrgica de cânulas (Naive) e/ou treinados na tarefa de RO (Sal e MUS+NMDA). Os ratos treinados foram expostos a dois objetos diferentes por 5 min e imediatamente após o treino receberam infusão bilateral de salina (Sal) ou muscimol + NMDA (MUS+NMDA); MUS no NTS ou PGI (0,1 µg/µl; 0,5 µl/lado) e NMDA em LC (0,1 µg/µl; 0,25 µl/lado). 120 min após, os animais foram mortos por decapitação, a região CA1 do hipocampo dissecada e o homogeneizado total submetido ao SDS-PAGE seguido por análise de *immunoblot* com anticorpos contra a tubulina. As barras representam os níveis percentuais de tubulina em relação ao grupo controle (Naive). Os dados estão apresentados como média ± DP. \*  $P \leq 0,05$  no teste de *Dunnnett* após ANOVA; n = 5 por grupo.

## IV DISCUSSÃO

Os resultados dos experimentos descritos confirmam a participação da via NTS-PGi-LC-CA1 na consolidação da memória de reconhecimento de objetos. Já é sabido que estas estruturas têm uma importante contribuição na retenção da memória aversiva na tarefa de esquiva inibitória (Clayton e Williams, 2000; Khakpour-Taleghari et al., 2008; Miyashita e Williams, 2004; Roozendaal et al., 1999), mas, de acordo com a literatura revisada, esta é a primeira vez que a participação destas estruturas nos processos mnemônicos e na memória de longa duração de RO é investigada.

Vários estudos investigaram o papel do NTS na consolidação da memória aversiva, mostrando que a inativação reversível do NTS prejudica a retenção da memória aversiva (Williams e McGaugh, 1992; 1993) e que a ativação adrenérgica do NTS potencializa a liberação de noradrenalina na amígdala e melhora a retenção na memória emocional (Clayton e Williams, 2000b). Outros estudos investigaram a participação do PGi neste processo. Clayton e Williams (2000c) verificaram que a inibição do PGi prejudica a retenção na tarefa de esquiva. Os mesmos autores mostraram que a ativação do PGi com glutamato após o treino na esquiva inibitória melhora a retenção desta memória (Clayton e Williams, 2000a). Também, Khakpour-Taleghari et al. (2008) mostraram que o LC está envolvido na consolidação e evocação, mas não na aquisição deste tipo de memória. A participação da formação hipocampal no aprendizado aversivo é conhecida há longo tempo (Izquierdo e Medina, 1997; Izquierdo et al., 2006; Qi e Gold, 2009). Porém, muito pouco se sabe sobre a participação do NTS, PGi e LC na consolidação de memórias declarativas não-aversivas de longa duração.



Nossos resultados mostram que a inibição destas estruturas (NTS, PGI e LC) até 3 h após o aprendizado na tarefa de RO prejudica a formação da memória declarativa de reconhecimento. Ainda, confirmamos a organização destas estruturas como uma via, já que o efeito amnésico da injeção de MUS em NTS e PGI é revertido com a estimulação do LC com NMDA, ou seja, a inibição de um ponto da via, que causou amnésia, é revertida pela estimulação de um ponto subsequente desta. Os receptores NMDA localizados na membrana plasmática dos neurônios noradrenérgicos do LC, alvo preferencial dos *inputs* glutamatérgicos (Grilli et al., 2009), quando ativados, causam uma despolarização da membrana, pois cargas iônicas positivas entram através dos canais iônicos abertos e, por sua vez, geram a abertura de canais de cálcio; o cálcio entra na célula e então, ocorre exocitose das vesículas de neurotransmissores (Malva et al, 1994; Sershen et al., 1997).

Estes achados confirmam hipóteses de outros estudos que sugeriram a organização destas estruturas como uma via. Williams e Miyashita (2004) observaram que 180 min após a injeção periférica de adrenalina ocorre um aumento da concentração de NA no hipocampo; porém; diante da inibição do NTS este aumento deixa de ocorrer, sugerindo que a inibição da atividade do NTS interrompe a transmissão de informações advindas da periferia ao hipocampo e influencia a liberação de neurotransmissores. A informação advinda da periferia é carregada pelo nervo vago ao NTS (Kalia e Sullivan, 1982) e, então enviada a outras regiões, como o LC (Takigawa e Mogenson, 1977). Holdefer e Jensen (1987) demonstraram, através de estudos eletrofisiológicos, que a administração de adrenalina produz um aumento crescente na ativação dos neurônios do LC, que representa o maior *input* noradrenérgico ao hipocampo (Haring e Davies,

1985; Loy et al., 1980; Loughlin, Foote e Grazanna, 1986). Ainda, Babstock e Harley (1992) verificaram que a ativação elétrica do PGI desencadeia potenciação de longa duração (LTP, do inglês *Long-Term Potentiation*) da via perfurante e giro denteado na formação hipocampal. Os referidos autores concluíram que este efeito resulta da ativação endógena do LC, principal entrada noradrenérgica ao hipocampo, diante da estimulação do PGI, uma vez que o propranolol (antagonista beta-adrenérgico) bloqueou a LTP.

King e Williams (2009) concluíram que a exposição à novidade induz um estado de alerta que afeta os processos relacionados à memória pela influência de hormônios periféricos, principalmente adrenalina, e promove a ativação do nervo vago e do NTS, de forma que a consolidação da memória que envolve uma novidade requer algum mecanismo glutamatérgico no NTS que medeia as consequências mnemônicas das alterações hormonais causadas pela exposição à novidade, reforçando nossa hipótese do envolvimento destas estruturas na memória de reconhecimento de objetos.

Nós demonstramos, ainda, que a ativação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos na região CA1 do hipocampo imediatamente após o treino é necessária para que ocorra consolidação da memória de RO. Quando timolol, um antagonista dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos é infundido nesta região após o treino os ratos tornam-se amnésicos, o que concorda com os achados de Straube et al., (2003), que bloquearam os receptores noradrenérgicos através da infusão intracerebroventricular de propranolol previamente à exposição a um contexto não-familiar e verificaram que a melhora da LTP normalmente induzida pelo contexto novo deixou de ocorrer.

McGaugh e seus colaboradores (Williams e McGaugh, 1993; McGaugh, 2000) demonstraram que a injeção periférica de adrenalina melhora a retenção da memória aversiva. Entretanto, a infusão de noradrenalina na região CA1 imediatamente após o treino não afeta a consolidação da memória de reconhecimento. Isto era esperado, uma vez que os animais do grupo controle têm um aprendizado normal, e para se diferenciar do grupo que recebeu NA deveriam apresentar uma melhora da memória, o que é difícil ou até impossível de se verificar ao menos nesta tarefa. Entretanto, a infusão de noradrenalina na região CA1 do hipocampo reverte o efeito amnésico causado pela inibição do NTS, PGI e LC. Isto confirma nossa hipótese de que os receptores  $\beta$ -adrenérgicos de CA1 atuam no ponto final da via NTS – PGI – LC – CA1. O estudo de Williams e McGaugh (1993) também corrobora a nossa hipótese de estudo, de que o NTS recebe *inputs* periféricos e então influencia a ação das catecolaminas sobre a memória. Os pesquisadores verificaram que, diante da inibição do NTS, a injeção periférica de adrenalina deixa de causar a anteriormente observada melhora da retenção mnemônica.

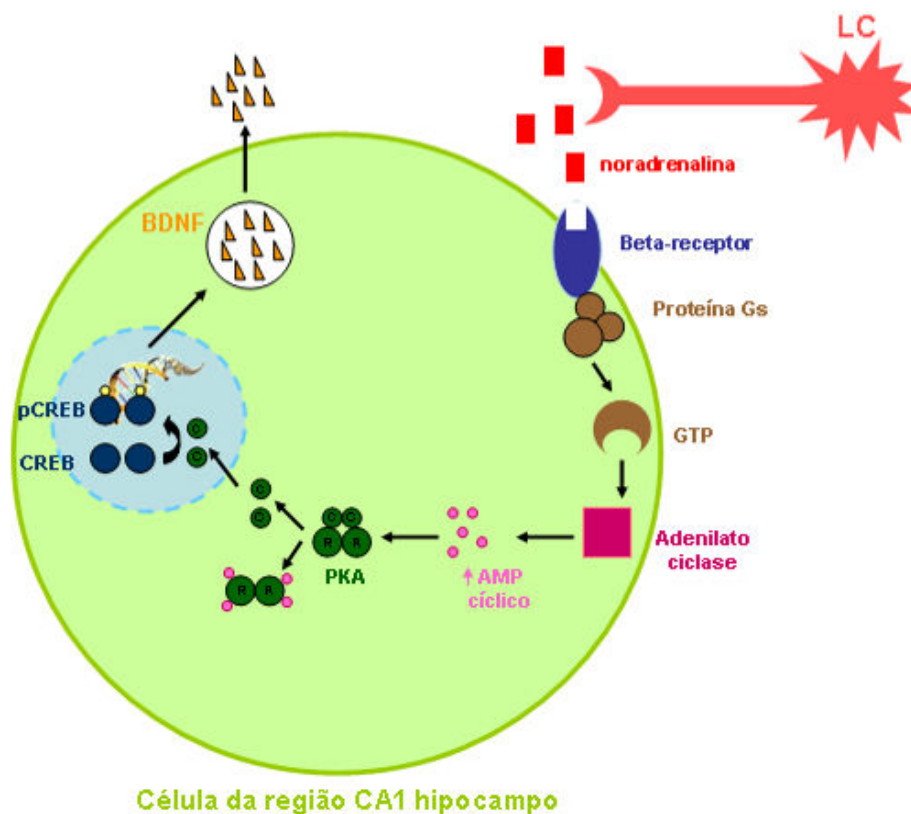
São abundantes as evidências da participação do BDNF na consolidação e persistência das memórias (Bekinschtein et al., 2007; Bekinschtein et al., 2008; Romero-Granados et al., 2009; Slipczuk et al., 2009). Foi demonstrado recentemente que 120 min após o treino na tarefa de reconhecimento de objetos ocorre um aumento na expressão de BDNF na região CA1 do hipocampo dorsal (Furini et al., 2010). Nossos resultados confirmam esses achados; demonstram que a inibição do NTS, PGI ou LC impede este aumento da expressão de BDNF, e que a co-infusão de NA em CA1 após a inibição destas estruturas reverte este efeito e o aumento de BDNF 120 min após o aprendizado no RO volta a ocorrer.

Também, a estimulação do LC com NMDA após a inibição do NTS ou PGI permite que o aumento do BDNF volte a ocorrer.

O papel da NA na modulação da memória já é reconhecido a longo tempo, porém, poucos estudos procuram descrever como as demais estruturas do SNC, como o NTS, contribuem para entregar NA ao sistema mnemônico (Williams, Men e Clayton, 2000). Nossos resultados demonstram que a liberação de NA na região CA1 do hipocampo, além de necessária para a consolidação da memória de RO, é modulada pela via NTS-PGI-LC. O NTS é ativado por estímulos periféricos diante da novidade, o que ocorre, por exemplo, quando o rato é exposto a dois objetos novos no treino na tarefa em questão. O NTS manda projeções ao PGI, e este ao LC; e, o LC controla a liberação de NA na região CA1 do hipocampo. Já foi demonstrado que, no aprendizado aversivo, o LC também controla a liberação de NA na amígdala (Roosendaal et al., 2009); Williams e Miashita (2004) verificaram que os efeitos do sistema noradrenérgico sobre a memória aversiva, porém, não dependem só da liberação de NA na amígdala, mas também da co-ativação do sistema noradrenérgico hipocampal. No caso da memória declarativa de RO nossos resultados não evidenciam a participação do sistema noradrenérgico da amígdala central ou basolateral no processo de consolidação.

A descoberta de novidades estimula a liberação noradrenérgica na região CA1 do hipocampo (Inalainen, Riekkinen e Feenstra, 1999) e esta modula a expressão de proteínas relevantes para a memória (Kobayashi e Yasoshima, 2001). A ligação desta catecolamina aos beta-receptores da membrana celular das células hipocampais deve ativar CREB (Sara, 2009) e, de acordo com nossos resultados, aumentar a expressão de BDNF, conforme ilustrado na figura 44. O BDNF tem se mostrado necessário para a formação de diferentes tipos de

aprendizados, estando relacionado com a plasticidade sináptica e processos mnemônicos (Bekinschtein et al., 2007, 2008). Nossos resultados e os de pesquisa prévia realizada em nosso laboratório (Furini et al., 2010), demonstram que a expressão protéica de BDNF aumenta 120 min após o aprendizado no RO. Além disso, nós confirmamos que a estimulação noradrenérgica endógena é dada pelo LC, uma vez que a inativação de qualquer ponto da via NTS-PGi-LC-CA1 impede o aumento do BDNF, e que a inativação de um ponto seguido pela ativação de um ponto subsequente da via reverte este efeito e permite que volte a ocorrer o aumento do BDNF.



**Figura 44. Esquema da via de sinalização intracelular na célula nervosa da região CA1 do hipocampo dorsal após a estimulação noradrenérgica.** A NA se liga aos receptores beta-adrenérgicos na membrana das células nervosas da região CA1 do hipocampo. Esta ligação ativa a proteína G estimulatória, que ativa a adenilato ciclase, gerando aumento da concentração intracelular de AMP cíclico, este ativa a PKA, se ligando as suas subunidades regulatórias e liberando as catalíticas. As subunidades catalíticas, quando liberadas entram no núcleo e promovem a fosforilação de CREB. O CREB fosforilado estimula a transcrição gênica que, neste caso, promove a expressão protéica de BDNF. LC = Lócus Coeruleus. Proteína Gs = Proteína G Estimulatória. GTP = Guanosina Tri-Fosfatada. AMP = Adenosina Mono-Fosfatada. PKA = Proteína Kinase A (Ativadora). R = Subunidade Regulatória da PKA . C = Subunidade C da PKA (de ligação ao CREB). CREB = Elemento de Ligação à Proteína Responsivo ao AMPc, do inglês *cAMP Response Element Binding Protein*. BDNF = Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro, do inglês *Brain Derived Neurotrophic Factor*.

## v CONCLUSÕES

Com base em nossos resultados, podemos concluir que:

- 1) A ativação do NTS é necessária para a consolidação na memória de longa duração de RO ao menos até 3 h após o aprendizado;
- 2) A ativação do PGI é necessária para a consolidação na memória de longa duração de RO ao menos até 3 h após o aprendizado;
- 3) A ativação do LC é necessária para a consolidação na memória de longa duração de RO ao menos até 3 h após o aprendizado;
- 4) A ativação noradrenérgica da região CA1 do hipocampo dorsal imediatamente após o treino na tarefa de RO é necessária para que ocorra a consolidação desta memória;
- 5) A ativação noradrenérgica da amígdala central e da amígdala basolateral não é necessária para que ocorra consolidação da memória de RO;
- 6) A injeção exógena de NA na região CA1 do hipocampo permite que a memória de RO persista por mais tempo (21 dias);
- 7) A injeção de NMDA no LC estimula o LC, via eferente noradrenérgica ao hipocampo, e permite que a memória de RO persista por mais tempo (21 dias);
- 8) A injeção de NA na região CA1 do hipocampo reverte o efeito amnésico da inibição do NTS, PGI ou LC após o treino na tarefa de RO permite que ocorra a consolidação desta memória, o que permite concluir que a ativação subsequente destas estruturas culmina da liberação de NA em CA1;

- 9) A injeção de NMDA no LC após a inativação do NTS ou PGI após o treino na tarefa de RO permite que ocorra a consolidação desta memória, o que permite concluir que o LC é responsável pela liberação endógena de NA em CA1;
- 10) O aprendizado na tarefa de RO gera um aumento na expressão protéica de BDNF na região CA1 do hipocampo 120 min após o treino;
- 11) A inibição do NTS, do PGI ou do LC imediatamente após o treino na tarefa de RO bloqueia o aumento na expressão protéica de BDNF na região CA1 do hipocampo que ocorre 120 min após o treino;
- 12) A infusão de NA na região CA1 do hipocampo imediatamente após a inibição do NTS, do PGI ou do LC logo após o treino na tarefa de RO permite o aumento na expressão protéica de BDNF na região CA1 do hipocampo que ocorre 120 min após o treino;
- 13) A infusão de NMDA no LC imediatamente após a inibição do NTS ou do PGI logo após o treino na tarefa de RO permite o aumento na expressão protéica de BDNF na região CA1 do hipocampo que ocorre 120 min após o treino.

Por fim, podemos concluir que a via NTS-PGI-LC-CA1 participa e sua ativação é essencial para a consolidação da memória declarativa de longa duração de reconhecimento de objetos. Esta via integra as informações periféricas recebidas diante deste aprendizado novo e culmina na liberação de NA no hipocampo.



## VI PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados desta pesquisa permitiram confirmar algumas hipóteses levantadas pela literatura e por estudos prévios do grupo de pesquisa do Centro de Memória que ainda não haviam sido testadas. Porém, com a demonstração da participação da via NTS-PGi-LC-Hipocampo na consolidação da memória de reconhecimento de objetos, novas perguntas surgiram no intuito de melhor compreender os mecanismos envolvidos na retenção da memória de longa duração no paradigma de RO.

Assim, minhas perspectivas futuras envolvem o trabalho em colaboração com o Centro de Memória para que possam ser investigadas questões como:

- 1) Verificar diretamente no hipocampo as alterações na concentração de NA decorrentes do aprendizado na tarefa de RO, medindo a concentração basal de NA na região CA1 do hipocampo e em diferentes tempos após o aprendizado na tarefa de RO, utilizando, para isto, o HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Performance ou Pressão, sigla do inglês *High performance liquid chromatography (or high pressure liquid chromatography)*), técnica que estou começando a estudar e conhecer.
- 2) Verificar se ocorrem alterações na concentração de NA diretamente na região CA1 do hipocampo após os procedimentos farmacológicos utilizados nesta tese (inibição do NTS, PGi e LC; inibição, seguida pela estimulação noradrenérgica de CA1 ou estimulação do LC com NMDA) utilizando o HPLC;
- 3) Relacionar os resultados apresentados com resultados de outro trabalho no qual estou envolvida junto ao Centro de Memória, que inclui a

participação de outros tipos de receptores hipocampais modulados pela noradrenalina na consolidação da memória de RO.

## REFERÊNCIAS

Akirav, I., Maroun, M. (2006). Ventromedial prefrontal cortex is obligatory for consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Cereb Cortex*. 16(12): 1759-1765.

Alberini, C.M. (2009). Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiol Rev*. 89: 121-145.

Allen, S.J., Dawbarn, D. (2006). Clinical relevance of the neurotrophins and their receptors. *Clin Sci (Lond)*. 110(2): 175-191.

Alonso, M., Vianna, M.R., Izquierdo, I., Medina, J. (2002). Signaling mechanisms mediating BDNF modulation of memory formation in vivo in the hippocampus. *Cell Mol Neurobiol*. 22(5-6): 663-674.

Aston-Jones, G., Cohen, J.D. (2005). Adaptive gain and the role of locus coeruleus-norepinephrine system in optimal performance. *J Comp Neurol*. 493(1): 99-110.

Babstock, D.M., Harley, C.W. (1992). Paragigantocellularis stimulation induces  $\beta$ -adrenergic hippocampal potentiation. *Brain Res Bull*. 28(5): 709-714.

Barco, A., Bailey, C.H., Kandel, E.R. (2006). Common molecular mechanisms in explicit and implicit memory. *J Neurochem*. 97(6):1520-1533.

Bear, M., Connors, B.W., Paradiso, M.A. (2002). Neurociências: desvendando o sistema nervoso. 2 ed. Porto Alegre: Artmed.

Bekinschtein, P., Cammarota, M., Igaz, L.M., Bevilaqua, L.R.M., Izquierdo, I., Medina, J. (2007). Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis and BDNF-dependent phase in the hippocampus. *Neuron*. 53: 261-277.

Bekinschtein, P., Cammarota, M., Izquierdo, I., Medina, J.H. (2008). BDNF and memory formation and storage. *Neuroscientist*. 14(2): 147-56.

Benetti, F., Mello, P.B., Bonini, J.S., Monteiro, S., Cammarota, M., Izquierdo, I. (2009). Early postnatal maternal deprivation in rats induces memory deficits in adult life that can be reversed by donepezil and galantamine. *Int J Dev Neurosci*. 27(1): 59-64.

Bevilaqua, L.R., Rossato, J.I., Medina, J.H., Izquierdo, I., Cammarota, M. (2005). Src kinase activity is required for avoidance memory formation and recall. *Behav Pharmacol*. 14(8): 649-652.

Bonini, J.S., Bevilaqua, L.R., Zinn, C.G., Kerr, D.S., Medina, J.H., Izquierdo, I., Cammarota, M. (2006). Angiotensin II disrupts inhibitory avoidance memory retrieval. *Horm Behav*. 50(2): 308-313.

Bouret, S., Sara, S.J. (2004). Reward expectation, orientation of attention and locus-coeruleus-medial frontal cortex interplay during learning. *Eur J Neurosci.* 20(3): 791-802.

Bouret, S., Sara, S.J. (2005). Network reset: a simplified overarching theory of locus coeruleus noradrenaline function. *Trends Neurosci.* 28(11): 574-582.

Bourtchuladze, R., Frenguelli, B., Blendy, J., Cioffi, D., Schutz, G., Silva, A.J. (1994). Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell.* 79(1):59-68.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.

Cahill, L., McGaugh, J.L. (1996). Modulation of memory storage. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6: 237-242.

Cammarota, M., Bevilaqua, L.R., Ardenghi, P., Paratcha G, Levi de Stein M, Izquierdo I. (2000). Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade. *Mol Brain Res.* 10;76(1):36-46.

Cammarota, M., Bevilaqua, L.R., Kerr, D., Medina, J.H., Izquierdo, I. (2003). Inhibition of mRNA and protein synthesis in the CA1 region of the dorsal hippocampus blocks reinstatement of an extinguished conditioned fear response. *J Neurosci.* 23(3): 737-741.

Cammarota, M., Bevilaqua, L.R., Rossato, J.I., Lima, R.H., Medina, J.H., Izquierdo, I. (2008). Parallel memory processing by the CA1 region of the dorsal hippocampus and the basolateral amygdala. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105(30): 10279-10284.

Cammarota, M., Bevilaqua, L.R., Viola, H., Keer, D.S., Reichmann, B., Teixeira, V., Bulla, M., Izquierdo, I., Medina, J.H. (2002). Participation of CaMKII in neuronal plasticity and memory formation. *Cell Mol Neurobiol.* 22(3): 259-267.

Clarke, J.R., Cammarota, M., Gruart, A., Izquierdo, I., Delgado-García, J.M. (2010). Plastic modifications induced by object recognition memory processing. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107(6): 2652-2657.

Clayton, E.C., Williams, C.L. (2000a) Adrenergic activation of the nucleus tractus solitarius potentiates amygdale norepinephrine release and enhances retention performance in emotionally arousing and spatial memory tasks. *Behav Brain Res.* 112: 151-158.

Clayton, E.C., Williams, C.L. (2000b). Posttraining inactivation of excitatory afferent input to the locus coeruleus impairs retention in an inhibitory avoidance learning task. *Neurobiol Learn Mem.* 73: 127-140.

Clayton, E.C., Williams, C.L. (2000c). Glutamatergic influences on the nucleus paragigantocellularis: contribution to performance in avoidance and spatial memory tasks. *Behav Neurosci.* 114(4): 707-712.

Dere, E., Huston, J.P., Silva, M.A.S. (2007). The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of the one-trial object recognition in rodents. *Neurosci Biobehav Rev.* 31: 673-704.

Devauges, V., Sara, S.J. (1990). Activation of the noradrenergic system facilitates an attentional shift in the rat. *Behav Brain Res.* 39(1): 19-28.

Ennaceur, A., Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioural data. *Behav Brain Res.* 31(1): 47-59.

Ennis, M., Aston-Jones, G. (1988). Activation of locus coeruleus from nucleus paragigantocellularis: a new excitatory amino acid pathway in brain. *J neurosci.* 8(10): 3644-3657.

Forwood, S.E., Winters, B.D., Bussey, T.J. (2005). Hippocampal lesions that abolish spatial maze performance spare object recognition memory delays of up to 48 hours. *Hippocampus.* 15: 347-355.

Furini, C.G., Rossato J.I., Bitencourt, L.L., Medina, J.H., Izquierdo, I., Cammarota, M. (2010). B-adrenergic receptors link NO/sGC/PKG signaling to BDNF expression during rge consolidation of object recognition long-term memory. *Hippocampus*. 20(5): 672-683.

Geinisman, Y. (2000). Structural synaptic modifications associated with hippocampal LTP and behavioral learning. *Cereb Cortex*. 10(10):952-962.

Grilli, M., Zappettini, S., Zanardi, A., Lagomarsino, F., Pittaluga, A., Zoli, M., Marchi, M. (2009). Exposure to an enriched environment selectively increases the functional response of the pre-synaptic NMDA receptors which modulate noradrenaline release in mouse hippocampus. *J Neurochem*. 110: 1598-1606.

Gruart, A., Muñoz, M.D., Delgado-García, J.M. (2006). Involvement of the CA3-CA1 synapse in the acquisition of associative learning in behaving mice. *J Neurosci*. 26(4): 1077-1087.

Guyenet, P.G., Young, B.S. (1987). Projections of nucleus paragigantocellularis lateralis to locus coeruleus and other structures in rat. *Brain Res*. 406(1-2): 171-184.

Gygi, S.P., Rochon, Y., Franza, B.R., Aebersold, R. (1999). Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol*. 19(3): 1720-1730.



Haege, S., Galetzka, D., Zechner, U., Haaf, T., Gamerdinger, M., Behl, C., Hiemke, C., Schmitt, U. (2010). Spatial learning and expression patterns of PP1 mRNA in mouse hippocampus. *Neuropsychobiology*. 61(4): 188-196.

Haring, J.H., Davies, J.N. (1985). Differential distribution of locus coeruleus projections to the hippocampal formation: anatomical and biochemical evidences. *Brain Res*. 325(1-2): 366-369.

Harley, C., Milway, J.S., Lacaille, J.C. (1989). Locus coeruleus potentiation of dentate gyrus responses: evidence for two systems. *Brain Res Bull*. 22(4): 643-650.

Heldt, S.A., Stanek, L., Chhatwal, J.P., Ressler, K.J. (2007). Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. *Molecular Psychiatry*. 12(7): 656-670.

Holdefer, R.N., Jensen, R.A. (1987). The effects of peripheral D-amphetamine, 4-OH amphetamine, and epinephrine on maintained discharge in the locus coeruleus with reference to the modulation of learning and memory by these substances. *Brain Res*. 417(1): 108-117.

Hutter, P., Johansson, M., Saria, A., Humpel, C. (1996). Acute and chronic noradrenergic regulation of neurotrophin messenger RNA expression in rat hippocampus: evidence from lesions and organotypic cultures. *Neuroscience*. 70: 15-29.

Ihalainen, J.A., Riekkinen, P.J.R., Feenstra, M.G. (1999). Comparison of dopamine and noradrenaline release in mouse prefrontal cortex, striatum and hippocampus using microdialysis. *Neurosci Lett.* 277: 71-74.

Izquierdo, I. (2002). *Memória*. Porto Alegre: Artmed.

Izquierdo, I., Barros, D.M., Mello e Souza, T., Izquierdo, L.A., Medina, J.H. (1998). Mechanisms for memory types differ. *Nature.* 393: 635-636.

Izquierdo I., Bevilaqua L.R., Rossato J.I., Bonini J.S., Da Silva W.C., Medina J.H., Cammarota M. (1996). The connection between the hippocampal and the striatal memory systems of the brain: a review of recent findings. *Neurotox Res.* 10(2):113-121.

Izquierdo, I., Cammarota, M., Da Silva, W.C., Bevilaqua, L.R., Rossato, J.I., Bonini, J.S., Mello, P., Benetti, F., Costa, J.C., Medina, J.H. (2008). The evidence for hippocampal long-term potentiation as a basis of memory for simple task. *An Acad Bras Cienc.* 80(1): 115-127.

Izquierdo, I., Medina, J.H. (1997). Memory formation, the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in others brain structures. *Neurobiol Lern Mem.* 68: 285-316.

Izquierdo, L.A., Barros, D.M., Vianna, M.R., Coitinho, A., deDavid e Silva, T., Choi, H., Moletta, B., Medina, J.H., Izquierdo, I. (2002). Molecular pharmacological dissection of short- and long-term memory. *Cell Mol Neurobiol.* 22(3): 269-287.

Izquierdo, I., Bevilaqua, L.R.M., Rossato, J.I., Medina, J.H., Cammarota, M. (2006). Different molecular cascades in different sites of the brain control consolidation. *Trends Neurosci.* 29: 496-505.

Izquierdo, L.A., Viola, H., Barros, D.M., Alonso, M., Vianna, M.R., Furman, M., Levi de Stein, M., Szapiro, G., Rodrigues, C., Choi, H., Medina, J.H., Izquierdo, I. (2001). Novelty enhances retrieval: molecular mechanisms involved in rat hippocampus. *Eur J Neurosci.* 13(7): 1464-1467.

Kalia, M., Sullivan, J.M. (1982). Brainstem projections of sensory and motor components of the vagus nerve in the rat. *J Comp Neurol.* 211(3): 248-165.

Kelly, A., Laroche, S., Davis, S. (2003). Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory. *J Neurosci.* 23(12): 5354-5360.

Kerfoot, E.C., Chattillion, E.A., Williams, C.L. (2008). Functional interactions between the nucleus tractus solitarius (NTS) and nucleus accumbens shell in modulating memory for arousing experiences. *Neurobiol Learn Mem.* 89(1): 47-60.

Kerr, D.S., Bevilaqua, L.R., Bonini J.S., Rossato, J.I., Köhler, C.A., Medina, J.H., Izquierdo, I., Cammarota, M. (2005). Angiotensin II blocks memory consolidation through an AT2 receptor-dependent mechanism. *Psychopharmacology (Berl)*. 179(3): 529-535.

Khakpour-Taleghani, B., Lashgari, R., Motamedi, F., Naghdi, N. (2009). Effect of reversible inactivation of locus ceruleus on spatial reference and working memory. *Neuroscience*.158(4):1284-1291.

King, S.O., Williams, C.L. (2009). Novelty-induced arousal enhances memory for cued classical fear conditioning: interactions between peripheral adrenergic and brainstem glutamatergic systems. *Learn Mem*. 16:125-634.

Kobayashi, K., Yasoshima, Y. (2001). The central noradrenaline system and memory consolidation. *Neuroscientist*. 7: 371-376.

Lehnert, H., Schulz, C., Dieterich, K. (1998). Physiological and neurochemical aspects of corticotrophin-releasing factor actions in the brain: the role of locus coeruleus. *Neurochem Res*. 23(8): 1039-1052.

Lemon, N., Aydin-Abidin, S., Funke, K., Manahan-Vaughan, D. (2009). Locus coeruleus activation facilitates memory encoding and induces hippocampal LTD that depends on beta-adrenergic receptor activation. *Cereb Cortex*. 19(12): 2827-2837.

Loughlin, S.E., Foote, S.L., Grzanna, R. (1986). Efferent projections of nucleus locus coeruleus: morphologic subpopulations have different targets. *Neuroscience*. 18(2): 307-319.

Loy, R., Koziell, D.A., Lindsey, J.D., Moore, R.Y. (1980). Noradrenergic innervation of the adult rat hippocampal formation. *J Comp Neurol*. 189(4): 699-710.

Madison, D.V., Nicoll, R.A. (1986). Actions of noradrenaline recorded intracellularly in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons, in vitro. *J Physiol*. 372: 221-244.

Malva, J.O., Carvalho, A.P., Carvalho, C.M. (1994). Modulation of dopamine and noradrenaline release and of intracellular  $Ca^{2+}$  concentration by presynaptic glutamate receptors in hippocampus. *Br J Pharmacol*. 113: 1439-1447.

Mansour, A.A.H., Babstock, D.M., Penney, J.H., Martin, G.M., McLean, J.H., Harley, C.W. (2003). Novel objects in a holeboard probe the role of the locus coeruleus in curiosity: support for two models of attention in the rat. *Behav Neurosci*. 117(3): 621-631.

McGaugh, J.L. (1989). Involvement of hormonal and neuromodulatory systems in the regulation of memory storage. *Annu Rev Neurosci*. 12: 255-287.

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

Mello, P.B., Benetti, F., Cammarota, M., Izquierdo, I. (2008). Effects of acute and chronic physical exercise and stress on different types of memory in rats. *An Acad Bras Cienc*. 80(2): 301-9.

Mello, P.B., Benetti, F., Cammarota, M., Izquierdo, I. (2009). Physical exercise can reverse the deficit in fear memory induced by maternal deprivation. *Neurobiol Learn Mem*. 92(3): 364-369.

Miyashita, T., Williams, C.L. (2004). Peripheral arousal-related hormones modulate norepinephrine release in the hippocampus via influences on brainstem nuclei. *Behav Brain Res*. 153(1): 87-95.

Moses, S.N., Cole, C., Driscoll, I., Ryan, J.D. (2005). Differential contributions of hippocampus, amygdala and perirhinal cortex to recognition of novel objects, contextual stimuli and stimulus relationships. *Brain Res Bull*. 67 (1-2): 62-76.

Myskiw, J.C., Rossato, J.I., Bevilaqua, L.R., Medina, J.H., Izquierdo, I., Cammarota, M. (2008). On the participation of mTOR in recognition memory. *Neurobiol Learn Mem*. 89(3): 338-351.

Paxinos, G., Watson, C. (1986). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 2<sup>nd</sup> ed.

Qi Z, Gold PE. (2009). Intrahippocampal infusion of anisomycin produce amnesia: contribution of increased release of norepinephrine, dopamine and acetylcholine. *Learn Mem.* 16(5): 308-14.

Prakash, S., Ambrosio, E., Alguacil, L.F., Del Olmo, N. (2009). Genetic differences in hippocampal synaptic plasticity. *Neuroscience.* 161(2): 342-346.

Ramón y Cajal, S. (1893). Neue Darstellung vom histologischen Bau des Zentralnervens System. *Archives of Anatomical Physiology (Anat.).* 1: 319-428.

Reed, J.M., Squire, L.R., Patalano, A.L., Smith, E.E., Jonides, J. (1999). Learning about categories that are defined by object-like stimuli despite impaired declarative memory. *Behav Neurosci.* 113(3): 411-419.

Romero-Granados R, Fontán-Lozano A, Delgado-García JM, Carrión AM. (2010). From learning to forgetting: behavioral, circuitry, and molecular properties define the different functional states of the recognition memory trace. *Hippocampus.* 20(5): 584-595.

Rozenndaal, B., Castello, N.A., Vedana, G., Barsegyan, A., McGaugh, J.L. (2008). Noradrenergic activation of the basolateral amygdala modulates consolidation of object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem.* 90(3): 573-579.

Roozendaal, B., Williams, C.L., McGaugh, J.L. (1999). Glucocorticoid receptor activation in the rat nucleus of the solitary tract facilitates memory consolidation: involvement of the basolateral amygdala. *Eur J Neurosci.* 11(4):1317-1323.

Rossato, J.I., Bevilaqua, L.R., Izquierdo, I., Medina, J.H., Cammarota, M. (2009). Dopamine controls persistence of long-term memory storage. *Science.* 325(5943): 1017-1020.

Rossato, J.I., Bevilaqua, L.R., Lima, R.H., Medina J.H., Izquierdo, I., Cammarota, M. (2006). On the participation of hippocampal p38 mitogen-activated protein kinase in extinction and reacquisition of inhibitory avoidance memory. *Neuroscience.* 143(1): 15-23.

Rossato, J.I., Bevilaqua, L.R., Myskiw, J.C., Medina, J.H., Izquierdo, I., Cammarota, M. (2007). On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Learn Mem.* 14(1): 36-46.

Rusakov DA, Davies HA, Harrison E, Diana G, Richter-Levin G, Bliss TV, Stewart MG. (1997). Ultrastructural synaptic correlates of spatial learning in rat hippocampus. *Neuroscience.* 80(1): 69-77.

Sara, S.J. (2009). The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. *Nat Rev Neurosci.* 10(3):211-223.



Sara, S.J., Segal, M. (1991). Plasticity of sensory responses of locus coeruleus neurons in the behaving rat: implications for cognition. *Prog Brain Res.* 88: 571-585.

Sershen, H., Balla, A., Lajtha, A., Vizi, E.S. (1997). Characterization of nicotinic receptors involved in the release of noradrenaline from the hippocampus. *Neuroscience.* 77: 121-130.

da Silva, W.C., Bonini, J.S., Bevilaqua, L.R., Izquierdo, I., Cammarota, M. (2006). Histamine enhances inhibitory avoidance memory consolidation through a H2 receptor-dependent mechanism. *Neurobiol Learn Mem.* 86(1): 100-106.

da Silva, W.C., Bonini, J.S., Bevilaqua, L.R., Medina, J.H., Izquierdo, I., Cammarota, M. (2008). Inhibition of mRNA synthesis in the hippocampus impairs consolidation and reconsolidation of spatial memory. *Hippocampus.* 18(1): 29-39.

Slipczuk L, Beckinschtein P, Katche C, Cammarota M, Izquierdo I, Medina JH. (2009). BDNF activates mTOR to regulate GluR1 expression required for memory formation. *PLoS One.* 4(6):e6007.

Squire, L.R., Zola-Morgan, J., Clark, R.E. (2007). Recognition memory and medial temporal lobe: a new perspective. *Nat Rev Neurosci.* 8(11): 872-883.

Straube, T., Korz, V., Frey, J.U. (2003). Requirement of  $\beta$ -adrenergic receptor activation and protein synthesis for LTP-reinforcement by novelty in rat dentate gyrus. *J Physiol.* 552: 953-960.

Takigawa, M., Mogenson, G.J. (1977). A study of inputs to antidromically identified neurons of the locus coeruleus. *Brain Res.* 135(2): 217-230.

Tao, X., Finkbeiner, S., Arnold, D.B., Shaywitz, A.J., Greenberg, M.E. (1998).  $Ca^{2+}$  influx regulates BDNF family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron.* 20: 709-726.

Tyler, W.J., Alonso M., Bramham, C.R., Pozzo-Miller, L.D. (2002). From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. *Learning and Memory.* 9(5): 224-237.

Tully, T., Bourtchouladze, R., Scott, R., Tallman, J. (2003). Targeting the CREB pathway for memory enhancers. *Nature Reviews Drug Discovery.* 2(4): 267-277.

Whitlock, J.R., Heynen, A.J., Shuler, M.G., Bear, M.F. (2006). Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science.* 313(5790): 1093-1097.

Williams, C.L., McGaugh, J.L. (1992). Reversible inactivation of the nucleus of the solitary tract impairs retention performance in an inhibitory avoidance task. *Behav Neural Biol.* 58(3): 204-210.

Williams, C.L., McGaugh, J.L. (1993). Reversible lesions of the nucleus of the solitary tract attenuate the memory-modulating effects of posttraining epinephrine. *Behav Neurosci.* 107(6): 955-962.

Williams, C.L., Men, D., Clayton, E.C. (2000). The effects of noradrenergic activation of the nucleus tractus solitarius on memory and in potentiating norepinephrine release in the amygdala. *Behav Neurosci.* 114(6): 1131-1144.

Winters, B.D., Tucci, M.C., DaCosta-Furtado, M. (2009). Older and stronger object memories are selectively destabilized by reactivation in the presence of new information. *Learn. Mem.* 16: 545-553.

Wolf NJ. (1998). A structural basis for memory storage in mammals. *Prog Neurobiol.* 55(1): 59-77.

## ANEXOS

- 1) Artigo científico publicado na revista *Neurobiology of Learning and Memory*;
- 2) Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul;
- 3) Artigo a ser submetido à publicação.

## ANEXO 1

## Artigo científico publicado

Neurobiology of Learning and Memory 92 (2009) 364–369



Contents lists available at ScienceDirect

Neurobiology of Learning and Memory

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ynlme](http://www.elsevier.com/locate/ynlme)

## Physical exercise can reverse the deficit in fear memory induced by maternal deprivation

Pâmela Billig Mello<sup>a,b</sup>, Fernando Benetti<sup>a,b</sup>, Martín Cammarota<sup>a</sup>, Iván Izquierdo<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Centro de Memória, Instituto do Cérebro and Instituto Nacional de Neurociência Translacional, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga 6690, 2nd Floor, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Sarmento Leite 500, 2nd floor 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 13 March 2009

Revised 16 April 2009

Accepted 16 April 2009

Available online 3 May 2009

## Keywords:

Treadmill running

Memory deficit

Maternal deprivation

Learning

## ABSTRACT

Maternal deprivation during the first 10 days of life induces significant behavioral alterations in rodents which persist through adulthood. Physical exercise reduces the cognitive deficits associated with pharmacologic and pathological conditions. Here we investigated whether forced physical exercise alters memory deficits caused by postnatal maternal deprivation. Male rats were divided into four groups: (1) control, (2) deprived, (3) exercised, and (4) deprived + exercised. In groups 2 and 4, pups were deprived from their mothers for 3 h/day during the first 10 days post-birth. In groups 3 and 4, from post-natal day 45 (PND-45) on, animals were submitted to forced treadmill exercise. At adulthood, animals were submitted to four different behavioral tasks: open field, Morris water maze (MWM), object recognition (OR) and inhibitory avoidance (IA). Maternal deprivation had no effect on open field behavior, but disrupted memory in the three other tasks. Physical exercise alone had no effect, except for a slight enhancement of MWM learning. Importantly, physical exercise reversed the deficit of IA and reduced the deficit of spatial memory but not that of OR seen in deprived animals. It is possible that physical exercise may counteract the influence of maternal deprivation on neurohumoral or hormonal memory modulatory systems related to stress. Indeed, the decreasing order of the effect of exercise on the memory disturbances induced by deprivation roughly follows the descending degree of stress associated with each task (IA > MWM > OR). Maternal deprivation is known to hinder hormonal mechanisms involved in coping with stress.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Early postnatal maternal deprivation induces cognitive deficits that persist into adulthood and senescence in rats (Benetti et al., 2009, 2007; Lehmann, Pryce, Bettschen, & Feldon, 1999; Oitzl, Workel, Fluttert, Frosch, & de Kloet, 2000; Renard, Suárez, Levin, & Rivarola, 2005). These are accompanied by neurochemical and anatomical modifications, such as reduced expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunits (Ang, Wong, Mochhala, & Ng, 2003; Kuma et al., 2004; Roceri, Hendriks, Racagni, Ellenbroek, & Riva, 2002), increased nerve growth factor expression (Cirulli, Micera, Alleva, & Aloe, 1998), reduced mossy fiber density (Hout, Plotsky, Lenox, & Mcnamara, 2002), as well as by hormonal and neurohumoral alterations, such as elevated basal pituitary–adrenal activity (Rots et al., 1996; Schmidt, Oitzl, Levine, & de Kloet, 2002), and altered responses to stress (Liu, Caldji, Sharma, Plotsky, & Meaney, 2000; Mirescu & Gould, 2006).

Physical exercise has been reported to exert beneficial effects on different memory types (Ang & Gomez-Pinilla, 2007; Winter et al., 2007), including spatial (Alaei, Moloudi, & Sarkaki, 2007; Ang, Dawe, Wong, Mochhala, & Ng, 2006), and fear long-term memory (LTM; Chen et al., 2007). We have previously detected only very mild enhancing effects on spatial learning, and no effects at all in an object recognition learning task and in inhibitory avoidance (Mello, Benetti, Cammarota, & Izquierdo, 2008). Barnes et al. (1991) were also unable to detect significant influences of physical exercise on various cognitive parameters in rats. However, exercise has been reported to reverse memory deficits caused by morphine (Alaei et al., 2006) and aging (Van Praag, Shubert, Ahao, & Gage, 2005) in animals, and to reduce cognitive impairments in aged humans (Friedland et al., 2001; Laurin, Verreault, Lindsay, Macpherson, & Rockwood, 2001).

We studied the memory deficits caused by maternal deprivation for 3 h/day during 10 days (Benetti et al., 2009; McIntosh, Anisman, & Merali, 1999) in rats, and examined whether forced physical exercise can reverse these deficits. We used forced physical exercise in a treadmill (Ang et al., 2006; Mello et al., 2008; Radak et al., 2006). Forced exercise has been shown to have

\* Corresponding author.

E-mail address: [izquierdo@terra.com.br](mailto:izquierdo@terra.com.br) (I. Izquierdo).

positive effects in human learning (Winter et al., 2007). In this procedure it is easier to control the time, duration, and intensity of the running, than in free running procedures (e.g., Kennedy, Smith, & Fleshner, 2005; Van Praag et al., 2005), which permits control of training volume (Moraska, Deak, Spencer, Roth, & Fleshner, 2000); but it involves a degree of stress (Cotman & Berchtold, 2002; Dishman, 1997; Dishman et al., 1997; Mello et al., 2008).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Pregnant female Wistar rats (age of 3–4 months, weight of 250–280 g) were obtained from the Reproduction Center of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). All animals were maintained in light/dark cycle (lights on at 07:00 AM, off at 7:00 PM). The environment temperature ( $\pm 22^\circ\text{C}$ ) and humidity (60%) were kept constant. Pregnant females were individually housed with sawdust bedding and *ad libitum* access to food and water. Litters were culled to eight pups per dam, four males and four females. The day of delivery was marked as day zero, and on postnatal day 1 (PND-1) a maternal deprivation protocol was applied to 50% of the pups from days 1–10 after birth; the other males were used as controls. Animals were weaned at the age of 21 days, and housed in regular cages 4 to a cage. Females were donated to the Reproduction Center for other research purposes. The males were used in the present experiments.

There were four experimental groups: (1) control, which received no treatment whatsoever; (2) deprived, which were submitted to maternal deprivation as described; (3) physical exercise, which from PND-45 onward were exposed to 8 weeks of forced treadmill activity as will be described below; and (4) deprived + physical exercise, which were maternally deprived from PND1-1 to PND-10 and then submitted to the treadmill from PND-45 on. Animals of the four groups were submitted to four different behavioral procedures beginning on PND-100: first, free exploration of an open field; then, spatial learning in a Morris water maze (MWM); subsequently, an object recognition task (OR), and finally aversive learning in the inhibitory avoidance task (IA). The entire battery of behavioral tests took 15 days. In all experiments the "Principles of laboratory animal care" (NIH publication No 85-23, revised 1996) were strictly followed.

### 2.2. Maternal deprivation protocol

Female Wistar rats were maintained in individual boxes until the delivery day. Deprivation was carried out for 180 min a day from PND-01 to PND-10. The deprivation protocol consisted in removing the mother from the residence box and taking her to another room. Pups were maintained in their home cage (grouped in the nest in the presence of maternal odor). We prefer this maternal deprivation protocol because it does not require manipulation of the pups (Kosten, Lee, & Kim, 2007; Todeschin et al., in press).

While the mothers were absent the room temperature was raised to  $32^\circ\text{C}$  to compensate for the mother's body heat (Renard et al., 2005; Benetti et al., 2009, 2007). At the end of each daily deprivation session, the mothers were returned to their home boxes; this procedure was carried out during the light part of the cycle, between 8:00 AM and 2:00 PM. Control rats remained in their resident boxes together with their mothers throughout. Only on PND-11, the boxes were cleaned normally again, according with the laboratory routine. On PND-21 the animals were weaned, and males were maintained in groups of 4 in  $50 \times 25 \times 40$  cm plastic boxes with a stainless steel lid, with food and water *ad lib.*, as all the other animals of our animal housing facility.

### 2.3. Physical exercise protocol

Animals were submitted to chronic treadmill physical exercise during 8 weeks. In the week immediately before the first week of training, all animals were placed in the training apparatus for 10 min to habituate, in order to minimize novelty-induced stress. In the first day of the second week an incremental test was carried out on an adapted motorized rodent treadmill (INBRAMED TK 01, Porto Alegre, Brazil) to determine the physical exercise intensity that would be used in the training period. Indirect measurement of peak oxygen uptake ( $\text{VO}_2$  peak) was measured as recommended by Brooks and White (1978). Each rat ran for 25 min on the treadmill at a low initial speed followed by increases of speed of 5 m/min every 3 min, until they reached their point of exhaustion (i.e., failure to continue running). Time to fatigue (in minutes) and workload (expressed by velocity in km/h) were taken as indexes of maximum capacity for exercise, and as an indirect measurement of  $\text{VO}_2$  peak. The intensity of physical training protocol (50 min/day for 5 day per week) was kept between 60% and 75% of their respective peak oxygen uptake for 8 weeks. Each training session started with a 10 min warm-up (gradual acceleration) followed by 30 min at target intensity. The last 10 min of each session were for gradual deceleration (adapted from Scopel et al., 2006; see also Mello et al., 2008).

Running sessions on the treadmill were carried out between 10:00 AM and 2:00 PM. The treadmill had individual 10-cm wide, 50 cm-long lanes separated by transparent acrylic walls. Neither electric shock nor physical prodding was used in this study to avoid possible stress effects. The animals that refused to run were encouraged by gently tapping on their backs. Animals that were not able to perform the exercise were excluded. Control animals were transported to the experimental room and handled exactly as those in the physical exercise groups; they were placed in the running lanes for 10 min, but they were not submitted to exercise protocol.

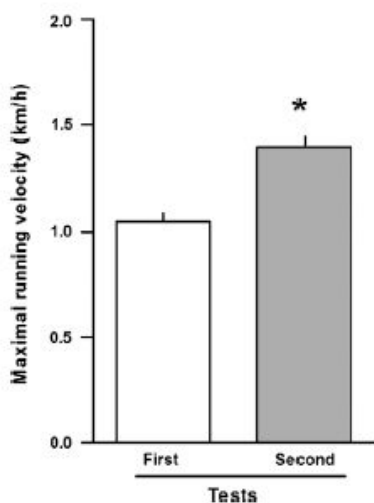
The problem of the stress associated with exercise and its influence on memory of exercised rats was addressed in a previous paper (Mello et al., 2008). It was reported there that a short but not a prolonged period of forced physical exercise produces mnemonic effects similar to those of stress induced by daily footshocks. In addition, Kennedy et al. (2005) reported that freewheel running provides sufficient exercise stimulus to produce some, but not all, physiological adaptations to training, which suggests that forced physical exercise is a more efficient protocol. The effects of chronic stress on learning and memory have been repeatedly described (Krugers et al., 1997; Mitra & Sapolsky, in press; Veena et al., 2007) and have been almost invariably found to be deleterious, which is the opposite of what is seen with physical exercise (Mello et al., 2008). Therefore, the effects of the latter can not be attributed to the former.

### 2.4. Second analysis of indirect maximal oxygen uptake

In the first day of the 5th week of training, the physical exercise group was submitted to a second measurement of indirect maximal oxygen uptake (Brooks & White, 1978) to analyze whether the training protocol was effective, and to verify if the forced running protocol indeed enhanced physical aerobic capacity. As can be seen in Fig. 1, this was the case. Peak oxygen uptake was not evaluated on the end of the physical exercise training, in order to avoid effects of stress on the memory tests that the animals were going to be exposed to a few days later.

### 2.5. Open field test

The animals were submitted to an open field to evaluate spontaneous locomotor and exploratory activities. The open field appa-



**Fig. 1.** Maximal running velocity (km/h) increased in physical exercise training group. The first measurement of maximal running velocity (km/h; indirect measurement of maximum oxygen uptake according Brooks and White, 1978) was carried out one day before the beginning of training, and the second one after 4 weeks of training. \* $p < 0.05$  in Student's *t*-test;  $n = 12$ .

ratu consisted of  $40 \times 50 \times 50$  cm open arena painted white except for the frontal wall which was of glass. The floor was divided into 12 equal rectangles by black lines; crossings of the lines were used to evaluate locomotion. Exploratory activity was monitored by counting the number of rearings performed by each animal (Benetti et al., 2009). The rats were individually placed in the arena and observed during 5 min.

#### 2.6. Morris water maze (MWM) test

The MWM was a black circular pool (200 cm in diameter) conceptually divided in four equal imaginary quadrants for the purpose of data analysis. Water temperature was maintained between 21 and 23 °C. Two centimeters beneath the water surface, and hidden from the rats' view, there was a black circular platform 12 cm in diameter. It had a rough surface that allowed the rat to climb onto it easily once detected. The swimming path of the rats was recorded using a video camera mounted above the center of the pool and analyzed using a video tracking path and analysis system. The MWM was located in a well-lit white room with several posters and other distal visual stimuli hanging on the walls to provide spatial cues. A curtain separated the part of the room with the water maze from the part where the experimenter and the computer setup were installed. The MWM task was carried out during five consecutive days (Rossato et al., 2006a), which is a schedule viewed as more sensitive to different parameters of spatial learning (Rossato, Bevilaqua, Medina, & Cammarota, 2006b; Rossato, Bevilaqua, Myskiw, Medina, & Izquierdo, 2007) than; say, a 1-day protocol (Frick, Stillner, & Berger-Sweeney, 2000). In each training day/session, the rats were submitted to eight consecutive training trials, while the hidden platform was kept in a constant position. A different starting location was used for each trial, which consisted of swimming followed by a 30 s sitting on the platform. Rats that did not find the platform within 60 s were guided to platform by the experimenter. Memory retention was evaluated during a 30 s probe trial carried out 24 h after last training session in the absence of the escape platform (Rossato et al., 2006a).

#### 2.7. Object recognition (OR) test

The OR test (Ennauer & Delacour, 1988) was carried out in the same arena used as an open field, following the protocol described by Myskiw et al. (2008). All animals were habituated to the experimental arena in the absence of any specific behavioral stimulus for 20 min/day during 4 days. The objects to be recognized were made of metal or glass and were fixed to arena's floor with adhesive ribbon. In the first day after habituation (training session) animals were placed in the arena containing two different objects (A and B), and left to explore them freely for 5 min. The test was repeated 24 h later to evaluate long-term memory (LTM). In the test, one of the objects was removed and a new object (C) replaced it, upon which the rat to be tested was introduced in arena for five more minutes. Positions of objects (familiar or novel) were randomly permuted for each experimental animal, with the arena being always cleaned between trials. Exploration was defined as sniffing or touching the object with the nose and/or forepaws. Sitting on or turning around the object was not considered as an exploratory behavior. Time spent to explore each object was recorded by an observer blind to treatment and expressed as a percentage of total exploration time computed in seconds (Rossato et al., 2007).

#### 2.8. Inhibitory avoidance (IA) test

The IA apparatus was a  $50 \times 25 \times 25$  cm acrylic box whose grid was a series of 3 mm caliber bronze bars spaced 3 cm apart. At the left end of floor there was a 8 cm wide, 25 cm long, 5 cm high wood platform (Cammarota, Bernabeu, Izquierdo, & Medina, 1996; Paratcha et al., 2000). During training, animals were gently placed on the platform facing the rear left corner, and when they stepped down placing their four paws on the grid they received a 3-s scrambled 0.5 mA foot-shock.

The rats were tested for retention 24 h after training. Retention test latency measurements were cut off at 300 s; i.e., scores equal to or greater than this measure were counted as 300 s. Animals received of course no footshock on the retention test.

#### 2.9. Statistical analysis

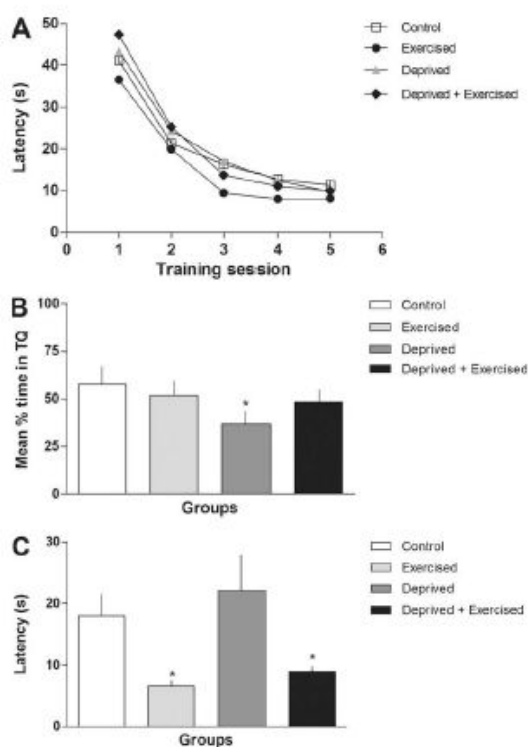
Indirect  $\text{VO}_2$  peak was analyzed using a Student *t*-test. The results of open field behavior were analyzed using two-way ANOVA. MWM behavior was analyzed using either two-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparison test. OR was analyzed using a one sample *t*-test. Since a ceiling of 300 s was imposed to step-down latencies during retention tests in the IA, retention data in this task did not have a normal distribution and are expressed as medians and interquartile ranges; comparisons among groups in this task were did using a Kruskal–Wallis non-parametric ANOVA followed by Dunn's multiple comparisons as appropriate. All other data were expressed as means  $\pm$  SEM. The sample size ( $N$ , number of animals in each group) for each experiment is stated in the figure captions. Minimum statistically significant differences were established at  $P < 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. Analysis of indirect maximum oxygen uptake

There was a significant increase of  $\text{VO}_2$  in the second measurement as compared to that at the beginning of the forced exercise routine ( $P < 0.05$  in Student's *t*-test). Thus, the forced running protocol indeed enhanced physical aerobic capacity (Fig. 1).

During the firsts four weeks of physical exercise training rats ran 650 m/day, in the last four weeks they ran around 1000 m/



**Fig. 2.** Maternal deprivation impairs and physical exercise improves the spatial memory. Animals were trained during 5 days in the spatial version of the Morris Water Maze (MWM). (A) mean  $\pm$  SEM escape latency on each training session. (B) mean  $\pm$  SEM % time spent in the target quadrant (TQ) during a 60 s probe test carried out 24 h after the 5th training session (\* $p$  < 0.001 in Newman-Keuls' test). (C) mean  $\pm$  SEM latency, measured in the probe test (\* $p$  < 0.01 in Newman-Keuls' test).  $N$  = 12–14 per group.

day (like in Morris et al., 2007; Silva et al., in press; Simões et al., 2008).

### 3.2. Morris water maze (MWM)

Acquisition of spatial memory in the MWM learning curves was similar among groups (Fig. 2A). However, in the probe test carried 24 h after training, a deficit was observed in the maternal deprivation group (Fig. 2B). Deprived animals spent significantly less time swimming in the target quadrant (TQ;  $P$  < 0.001 in Newman-Keuls multiple comparison test), although the latency to swim over the previous location of the escape platform did not differ from controls. On the contrary, physical exercise did not affect the % of time in TQ but reduced significantly the escape latency (Fig. 2C). No significant difference in swimming speed was observed among the different experimental groups (Table 1).

**Table 1**  
Swimming velocity in MWM probe test (cm/s; data expressed as mean  $\pm$  SEM;  $n$  = 12–14 per group).

	Control	Exercise	Deprived	Deprived + exercise
Velocity (cm/s)	26.16 $\pm$ 2.96	25.67 $\pm$ 2.19	25.55 $\pm$ 1.96	27.05 $\pm$ 3.12

### 3.3. Object recognition (OR)

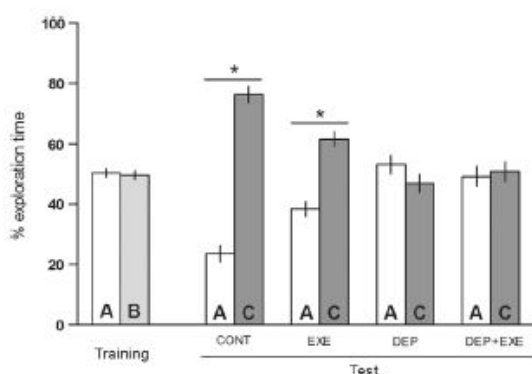
During the training phase (day 1) the animals exploring equally the two stimuli objects (Fig. 3). In the test phase (day 2), while control animals explored the novel object longer than the familiar one ( $P$  < 0.001 in one sample  $t$ -test), the deprived rats spent the same amount of time exploring the two objects. Exercise did not modify the amnesic effect of maternal deprivation (Fig. 3).

### 3.4. Inhibitory avoidance (IA)

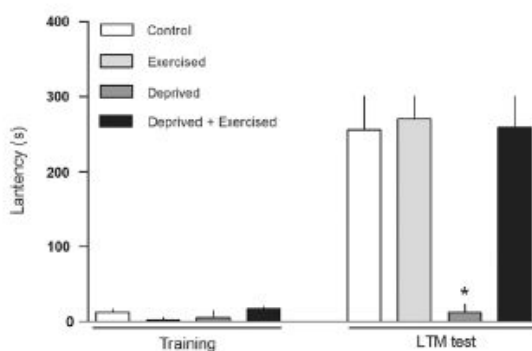
Maternal deprivation disrupted IA memory. Deprived animals had a shorter step down latency than the controls in the LTM test ( $P$  < 0.001 in Dunn's multiple comparison test). No influence of exercise on the task itself was detected. However, exercise clearly reversed the deleterious effect of maternal deprivation (Fig. 4).

### 3.5. Motor and exploratory activity in the open field

Maternal deprivation and physical exercise did not affect the number of crossings and rearings during a 5-min long free-exploration session in the open field (Table 2).



**Fig. 3.** Maternal deprivation impairs and physical exercise does not affect the object recognition memory. Rats were exposed to two different objects (A and B) for 5 min in the training session. Long-term memory (LTM) was measured 24 h after training: animals were exposed to a familiar object (A) and to a novel object (C) during 5 min. Data (mean  $\pm$  SEM) are present as the percentage of total exploration time. \* $p$  < 0.001 in one-sample Student's  $t$ -test;  $n$  = 12–14 per group.



**Fig. 4.** Impairment in retention of inhibitory avoidance (IA) memory caused by maternal deprivation is reversed by physical exercise. Rats were trained in IA and, 24 h after were tested (LTM test). Bars represent median  $\pm$  interquartile range of step-down latencies. \* $p$  < 0.001 level in Dunn's test;  $n$  = 12–14 per group.



**Table 2**

Effects of each study procedure on locomotor and exploratory activities. Maternal deprivation, physical exercise for 8 weeks or both had no effect on locomotor and exploratory activities (two-way ANOVA; data expressed for mean  $\pm$  SEM;  $n = 12$ –14 per group).

Groups	Crossings	Rearings
Control	70.00 $\pm$ 25.11	38.50 $\pm$ 10.43
Exercise	78.43 $\pm$ 21.76	40.00 $\pm$ 8.357
Maternal deprivation	60.10 $\pm$ 21.75	35.40 $\pm$ 10.42
Maternal deprivation + exercise	78.00 $\pm$ 20.94	37.60 $\pm$ 9.513

#### 4. Discussion

It is known that physical exercise can influence brain physiology and cognitive function both in humans and in laboratory animals. It has been used in the prevention or treatment of a variety of memory deficits, like those caused by natural aging (Garza, Ha, Garcia, Chen, & Russo-Neustadt, 2004; Van Praag et al., 2005), morphine (Alaei et al., 2006) and prenatal ethanol exposure (Christie et al., 2005). To our knowledge this is the first time that the effect of physical exercise was examined on cognitive deficits induced by maternal deprivation.

The present experiments show a clear deficit in spatial, recognition and avoidance memory in rats exposed to postnatal maternal deprivation, and a reversal or reduction of some of these effects in animals submitted to forced treadmill exercise. The reversal was complete in the IA task and partial in the MWM task. Exercise had no influence on the deprivation induced deficit of the least aversive of the three tasks, the OR test. In the present study, as in a previous paper (Mello et al., 2008), the effects of exercise *per se* on memory parameters were barely noticeable, and limited to the spatial task. This is at odds with other reports using different forms of physical exercise (Ang et al., 2006; Radak et al., 2006; Uysal et al., 2005; van Praag et al., 2005), but coincident with others reporting no effect of physical exercise on spatial memory (Barnes et al., 1991). This strengthens the finding of the effect of exercise on the cognitive deficits induced by early maternal deprivation.

It is likely that both the deleterious effect of maternal deprivation and the partially corrective effect of exercise are secondary to influences on some of the many modulatory systems that regulate both memory consolidation and retrieval (Izquierdo et al., 2006; McGaugh, 2004). In this respect, the hypothalamus–pituitary–adrenal axis is a major candidate. That system is enhanced in animals submitted to postnatal maternal deprivation (Huot et al., 2002; Plotsky et al., 2005) and this enhancement has been associated with memory deficits (Aisa, Tordera, Laceras, Del Río, & Ramírez, 2007; see McGaugh, 2004). Campbell, Rakhshani, Fediuc, Bruni, and Riddell (2008) reported that physical exercise activates the HPA axis and it is known that physical exercise reverts the hypoactivity of HPA caused by chronic administration of corticosterone in rats (Kim et al., 2008). Importantly, some authors have found that wheel running can reduce the HPA axis responses to mild stressors (Droste, Chandramohan, Hill, Linthorst, & Reul, 2007; Droste et al., 2003).

Certainly, the corrective effect of exercise on the memory deficits induced by maternal deprivation did correlate with the aversiveness and presumable stress associated with each task: more marked in IA, less marked in the MWM, inexistent in OR. An effect of either maternal deprivation or physical exercise on “core” molecular mechanisms of memory formation or retrieval (see Izquierdo et al., 2006), or on cognition itself, is by all means unlikely.

In summary, the decreasing order of the effect of exercise on the memory disturbances induced by deprivation roughly follows the descending degree of stress associated with each task (IA > MWM > OR). Maternal deprivation is known to hinder hormonal mechanisms involved in coping with stress.

#### Acknowledgments

This work was supported by research grants from the National Research Council of Brazil (CNPq) to II and MC.

#### References

- Aisa, B., Tordera, R., Laceras, B., Del Río, J., & Ramírez, M. J. (2007). Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology*, *32*, 256–266.
- Alaei, H., Borjeian, L., Azizi, M., Orian, S., Pourshanzari, A., & Hanninen, O. (2006). Treadmill running reverses retention deficit induced by morphine. *European Journal of Pharmacology*, *536*, 138–141.
- Alaei, H., Moloudi, R., & Sarkaki, A. R. (2007). Effects of treadmill running on mid-term memory and swim speed in the rat with Morris water maze test. *Journal of Bodywork Movement Therapies*, *12*, 72–75.
- Ang, E. T., Dawe, G. S., Wong, P. T. H., Moochhala, S., & Ng, Y. K. (2006). Alterations in spatial learning and memory after forced exercise. *Brain Research*, *1113*, 186–193.
- Ang, E. T., & Gomez-Pinilla, F. (2007). Potential therapeutic effects of exercise to the brain. *Current Medicinal Chemistry*, *14*, 2564–2571.
- Ang, E. T., Wong, P. T. H., Moochhala, S., & Ng, Y. K. (2003). Neuroprotection associated with running: Is it a result of increased endogenous neurotrophic factors. *Neuroscience*, *118*, 335–345.
- Barnes, C. A., Forster, M. J., Flesher, M., Ahanotu, E. N., Laudenslager, M. L., Mazzeo, R. S., et al. (1991). Exercise does not modify spatial memory, brain autoimmunity, or antibody response in aged F-344 rats. *Neurobiology of Aging*, *12*, 47–53.
- Benetti, F., Andrade de Araújo, P., Sanvitto, G. L., & Lucion, A. B. (2007). Effects of neonatal novelty exposure on sexual behavioural, fear, and stress-response in adult rats. *Developmental Psychobiology*, *49*, 258–264.
- Benetti, F., Mello, P. B., Monteiro, S. C., Bonini, J. S., Cammarota, M., & Izquierdo, I. (2009). Early postnatal maternal deprivation in rats induces cognitive impairment in adult life; the deficit is reversed by donepezil and galantamine. *International Journal of Developmental Neuroscience*, *2*, 59–64.
- Brooks, G. A., & White, T. P. (1978). Determination of metabolic and heart rate responses of rats in treadmill exercise. *Journal of Applied Physiology*, *45*, 1009–1015.
- Cammarota, M., Bernabeu, R., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (1996). Reversible changes in hippocampal 3H-AMPA binding following inhibitory avoidance training in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, *66*, 85–88.
- Campbell, J. E., Rakhshani, N., Fediuc, S., Bruni, S., & Riddell, M. C. (2008). Voluntary wheel running initially increases adrenal sensitivity to adrenocorticotropic hormone, which is attenuated with long-term training. *Journal of Applied Physiology*, *106*, 66–72.
- Chen, H., Lin, L., Yu, L., Liu, Y., Kuo, Y., Huang, A., et al. (2007). Treadmill exercise enhances passive avoidance learning in rats: The role of down-regulated serotonin system in the limbic system. *Neurobiology of Learning and Memory*, *89*, 489–496.
- Christie, B. R., Swann, S. E., Fox, C. J., Proc, D., Lieblich, S. E., Redila, V., et al. (2005). Voluntary exercise rescues deficits in spatial memory and long-term potentiation in prenatal ethanol-exposed male rats. *European Journal of Neuroscience*, *21*, 1719–1726.
- Cirulli, F., Micera, A., Alleve, E., & Aloe, L. (1998). Early maternal separation increases NGF expression in the developing rat hippocampus. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *59*, 853–858.
- Cotman, C. W., & Berchtold, N. C. (2002). Exercise: A behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends in Neuroscience*, *25*, 295–301.
- Dishman, R. K. (1997). Brain monoamines, exercise, and behavioral stress: Animals models. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, *29*, 63–74.
- Dishman, R. K., Renner, K. J., Youngstedt, S. D., Reagle, T. G., Bunnell, B. N., Burke, K. A., et al. (1997). Activity wheel running reduces escape latency and alters monoamine levels after footshock. *Brain Research Bulletin*, *42*, 399–406.
- Droste, S. K., Chandramohan, Y., Hill, L. E., Linthorst, A. C. E., & Reul, J. M. H. M. (2007). Voluntary exercise impacts on the rat hypothalamic–pituitary–adrenocortical axis mainly at the adrenal level. *Neuroendocrinology*, *86*, 26–37.
- Droste, S. K., Gesing, A., Ulbricht, S., Müller, M. B., Linthorst, A. C., & Reul, J. M. H. M. (2003). Effects of long-term voluntary exercise on the mouse hypothalamic–pituitary–adrenocortical axis. *Endocrinology*, *144*, 3012–3023.
- Ennauer, A., & Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioral Brain Research*, *31*, 47–59.
- Frick, K. M., Stillner, E. T., & Berger-Sweeney, J. (2000). Mice are not little rats: Species differences in a one-day water maze task. *NeuroReport*, *11*, 3461–3465.
- Friedland, R. P., Fritsch, T., Smyth, K. A., Koss, E., Lerner, A. J., Chen, C. H., et al. (2001). Patients with Alzheimer's disease have reduced activities in midlife compared with healthy control-group members. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*, 3440–3445.
- Garza, A. A., Ha, T. G., Garcia, C., Chen, M. J., & Russo-Neustadt, A. (2004). Exercise, antidepressant treatment, and BDNF mRNA expression in the aging brain. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *77*, 209–220.
- Hout, R. L., Plotsky, P. M., Lenox, R. H., & Mcnamara, R. K. (2002). Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. *Brain Research*, *950*, 52–63.

- Izquierdo, I., Bevilaqua, L. R., Rossato, J. I., Bonini, J. S., Medina, J. H., & Cammarota, M. (2006). Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends in Neuroscience*, 29, 496–505.
- Kennedy, S. L., Smith, T. P., & Fleshner, M. (2005). Resting cellular and physiological effects of free-wheel running. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 37, 79–83.
- Kim, H. G., Lim, E. Y., Jung, W. R., Shin, M. K., Ann, E. S., & Kim, K. L. (2008). Effects of treadmill exercise on hypoactivity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis induced by chronic administration of corticosterone in rats. *Neuroscience Letters*, 434, 46–49.
- Kosten, T. A., Lee, H. J., & Kim, J. J. (2007). Neonatal handling alters learning in adult male and female rats in a task-specific manner. *Brain Research*, 118, 144–153.
- Kruger, H. J., Douma, B. R., Andringa, G., Bohus, B., Korf, J., & Luiten, P. G. (1997). Exposure to chronic psychosocial stress and corticosterone in the rats: Effects on spatial discrimination learning and hippocampal protein kinase Cgamma immunoreactivity. *Hippocampus*, 7, 427–436.
- Kuma, H., Miki, T., Matsumoto, Y., Gu, H., Li, H. P., Kusaka, T., et al. (2004). Early maternal deprivation induces alterations in brain-derived neurotrophic factor expression in the developing rat hippocampus. *Neuroscience Letters*, 372, 68–73.
- Laurin, D., Verreault, R., Lindsay, J., Macpherson, K., & Rockwood, K. (2001). Physical activity and risk of cognitive impairment and dementia in elderly persons. *Archives of Neurology*, 58, 498–504.
- Lehmann, J., Pryce, C. R., Bettschen, D., & Feldon, J. (1999). The maternal separation paradigm and adult emotionality and cognition in male and female Wistar rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 64, 705–715.
- Liu, D., Caldji, C., Sharma, S., Plotsky, P. M., & Meaney, M. J. (2000). Influence of neonatal rearing conditions on stress-induced adrenocorticotropic responses and norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Journal of Neuroendocrinology*, 12, 5–12.
- McGaugh, J. L. (2004). The amygdale modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annual Review of Neuroscience*, 27, 1–28.
- McIntosh, J., Anisman, H., & Merali, Z. (1999). Short- and long-periods of neonatal maternal separation differentially affect anxiety and feeding in adult rats: Gender-dependent effects. *Brain Research*, 113, 97–106.
- Mello, P. B., Benetti, F., Cammarota, M., & Izquierdo, I. (2008). Effects of acute and chronic exercise and stress on different types of memory in rats. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 80, 301–309.
- Mirescu, C., & Gould, E. (2006). Stress and adult neurogenesis. *Hippocampus*, 16, 233–238.
- Mitra, R., & Sapolsky, R.M. (in press). Effects of enrichment predominate over those of chronic stress on fear related behavior in male rats. *Stress*.
- Moraska, A., Deak, T., Spencer, R. L., Roth, D., & Fleshner, M. (2000). Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative Comparative Physiology*, 279, 321–329.
- Morris, R. T., Fine, D. M., Lees, S. J., Booth, F. W., Link, C. D., Ferrario, C. M., et al. (2007). Exercise training prevents development of cardiac contractile dysfunction in hypertensive TG (mREN-2)27 rats. *Journal of the American Society of Hypertension*, 1, 393–399.
- Myskiw, J. C., Rossato, J. I., Bevilaqua, L. R., Medina, J. H., Izquierdo, I., & Cammarota, M. (2008). On the role of mTOR in recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 89, 338–351.
- Oitzl, M. S., Workel, J. O., Flutterm, M., Frosch, F., & de Kloet, E. R. (2000). Maternal deprivation affects behavior from youth to senescence: Amplification of individual differences in spatial learning and memory in senescence Brown Norway rats. *European Journal of Neuroscience*, 12, 3771–3780.
- Paratcha, G., Furman, M., Bevilaqua, L., Cammarota, M., Vianna, M., de Stein, M. I., et al. (2000). Involvement of hippocampal PKCbeta1 isoform in the early phase of memory formation of an inhibitory avoidance learning. *Brain Research*, 855, 199–205.
- Plotsky, P. M., Thiruvikraman, K. V., Nemeroff, C. B., Caldji, C., Sharma, S., & Meaney, M. J. (2005). Long-term consequences of neonatal rearing on central corticotrophin-releasing factor systems in adult male rat offspring. *Neuropsychopharmacology*, 30, 2192–2204.
- Radak, Z., Told, A., Szabo, Z., Siamilis, S., Nyakas, C., Silye, G., et al. (2006). The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. *Neurochemistry International*, 49, 387–392.
- Renard, G. M., Suárez, M. M., Levin, G. M., & Rivarola, M. A. (2005). Sex differences in rats: Effects of chronic stress on sympathetic system and anxiety. *Physiology and Behavior*, 85, 363–368.
- Roceri, M., Hendriks, W., Racagni, G., Ellenbroek, B. A., & Riva, M. A. (2002). Early maternal deprivation reduces the expression of BDNF and NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *Molecular Psychiatry*, 7, 609–616.
- Rossato, J. I., Bevilaqua, L. R. M., Lima, R. H., Medina, J. H., Izquierdo, I., & Cammarota, M. (2006a). On the participation of hippocampal p38 mitogen-activated protein kinase in extinction and reacquisition of inhibitory avoidance memory. *Neuroscience*, 143, 15–23.
- Rossato, J. I., Bevilaqua, L. R. M., Medina, J. H., & Cammarota, M. (2006b). Retrieval induces hippocampal-dependent reconsolidation of spatial memory. *Learning and Memory*, 13, 431–440.
- Rossato, J. I., Bevilaqua, L. R. M., Myskiw, J. C., Medina, J. H., Izquierdo, I., & Cammarota, M. (2007). On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Learning and Memory*, 14, 36–46.
- Rots, N. Y., de Jong, J., Workel, J. O., Levine, S., Cools, A. R., & de Kloet, E. R. (1996). Neonatal maternally deprived rats have as adults elevated basal pituitary-adrenal activity and enhanced susceptibility to apomorphine. *Journal of Neuroendocrinology*, 8, 501–506.
- Schmidt, M. Y., Oitzl, M. S., Levine, S., & de Kloet, E. R. (2002). The HPA system during the postnatal development of CD1 mice and the effects of maternal deprivation. *Brain Research Developmental Brain Research*, 139, 39–49.
- Scopel, D., Fochesatto, C., Cimarosti, H., Rabbo, M., Beló-Klein, A., Salgado, C., et al. (2006). Exercise intensity influences cell injury in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation. *Brain Research Bulletin*, 71, 155–159.
- Silva, S. G., Doná, F., Fernandes, M. J. S., Scorza, F. A., Cavalheiro, E. A., & Arida, R. M. (in press). Physical exercise during the adolescent period of life increases hippocampal parvalbumin expression. *Brain and Development*.
- Simões, P. A., Zamarioli, A., Blóes, P., Mazzocato, F. C., Pereira, L. H., Volpon, J. B., et al. (2008). Effect of treadmill exercise on lumbar vertebrae in ovariectomized rats: Anthropometrical and mechanical analyses. *Acta of Bioengineering and Biomechanics*, 10, 39–41.
- Todeschin, A. S., Winkelmann-Duarte, E. C., Jacob, M. H., Aranda, B. C., Jacobs, S., & Fernandes, M. C. et al. (in press). Effects of neonatal handling on social memory, social interaction, and number of oxytocin and vasopressin neurons in rats. *Hormones and Behavior*.
- Uysal, N., Tugyan, K., Kayatekin, B. M., Acikgoz, O., Bagriyanik, H. A., Gonenc, S., et al. (2005). The effects of regular aerobic exercise in adolescent period on hippocampal neuron density, apoptosis and spatial memory. *Neuroscience Letters*, 383, 241–245.
- Van Praag, H., Shubert, T., Aha, C., & Gage, F. (2005). Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *Journal of Neuroscience*, 25, 8680–8685.
- Veená, J., Srikanth, B. N., Mahati, K., Bhaga, V., Raju, T. R., & Shankaranarayana Rao, B. S. (2007). Enriched environment restores hippocampal cell proliferation and ameliorates cognitive deficits in chronically stressed rats. *Journal of Neuroscience Research*, 87, 831–843.
- Winter, B., Breitenstein, C., Mooren, F. C., Voelker, K., Fobker, M., Lechtermann, A., et al. (2007). High impact running improves learning. *Neurobiology of Learning and Memory*, 87, 597–609.

## ANEXO 2

## Carta de Aprovação do Comitê de Ética



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
CARTA DE APROVAÇÃO

proXpesq

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o projeto:

Número : 2008076


Título : Participação da via NTS-PGi-LC-Hipocampo (Núcleo do Trato Solitário - Núcleo Paragigantocellular - Locus Coeruleus - Hipocampo) na consolidação da memória de reconhecimento de objetos

Pesquisador (es) :

<u>NOME</u>	<u>PARTICIPACÃO</u>	<u>EMAIL</u>	<u>FONE</u>
IVAN ANTONIO IZQUIERDO	PESQ RESPONSÁVEL	izquier@zaz.com.br	33085534
JULIA HELENA ROSAURO CLARKE	PESQUISADOR	juclarke@gmail.com	
MARTIN PABLO CAMMAROTA	PESQUISADOR	mcammaro@terra.com.br	
PÂMELA BILLIG MELLO CARPES	PESQUISADOR	panmello@hotmail.com	
SIOMARA DA CRUZ MONTEIRO	PESQUISADOR	siomaramonteiro@hotmail.com	

O mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, reunião nº 50 , ata nº 130 , de 18/6/2009 , por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, terça-feira, 23 de junho de 2009

  
ILMA SIMONI BRUM DA SILVA  
Coordenador do CEP-UFRGS

**ANEXO 3****Artigo Científico a ser submetido à publicação****PARTICIPATION OF NTS-PGi-LC-CA1 (NUCLEUS OF THE SOLITARY TRACT –  
NUCLEUS PARAGIGANTOCELLULARIS – *LOCUS COERULEUS* – CA1 REGION OF  
DORSAL HIPPOCAMPUS) PATHWAY IN THE CONSOLIDATION OF OBJECT  
RECOGNITION MEMORY**

Pâmela Billig Mello<sup>1,2</sup>, Julia Helena Rosauero Clarke<sup>1</sup>, Siomara da Cruz Monteiro<sup>1</sup>, Jorge H  
Medina<sup>1</sup>, Ivan Izquierdo<sup>1,2</sup> and Martín Cammarota<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Centro de Memória, Instituto do Cérebro, Hospital São Lucas, Pontifícia Universidade  
Católica do Rio Grande do Sul

Avenida Ipiranga, 6690, Jardim Botânico, Porto Alegre, RS, Brasil, CEP 90610-000

Telefone (51) 33203000 ramal 2532

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Instituto de Ciências  
Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Sarmiento Leite, 500, Centro, Porto Alegre, RS, Brasil, CEP 90010-170

**\*Corresponding author.** E-mail: mcammaro@terra.com.br

**Abstract**

There are a lot of evidences about the contribution of release of noradrenaline (NA) in the consolidation of memories. The Nucleus of Solitary Tract (NTS) receive peripheric information and several stimulus and send projections to Paragigantocellularis Nucleus (PGi), that use neurotransmitters predominantly excitatory to influence *Locus Coeruleus* (LC). So, LC sends noradrenergic projections to hippocampus and amygdala. Here we show that the inhibition of NTS, PGi or LC until 3 hours to object recognition memory training impairs the consolidation of memory when the animals were tested 24 hours later. Additionally, the infusion of timolol in the CA1 region of hippocampus also not allows the consolidation of this type of memory. The infusion of NA in CA1 region of hippocampus did not alters the memory retention, but, this infusion on CA1 after inhibition of NTS, PGi or LC revert the prejudice of consolidation. The infusion of NMDA in LC after inhibition of NTS or PGi also revert the amnesia. Concomitantly, we verify that the inhibition of NTS, PGi or LC barrier the increases of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in the CA1 region of dorsal hippocampus that occurs 120 min after training in object recognition task. Also, the infusion of NA in CA1 region of hippocampus after inhibition of NTS, PGi or LC promotes the BDNF's increase 120 min after training in OR again.

**Key-words:** Memory. BDNF. Noradrenaline. Consolidation. Object Recognition.

## Introduction

There are a lot of evidences about the contribution of release of noradrenaline (NA) in the consolidation of memories (Clayton & Williams, 2000; Gliebus and Lippa, 2007; Furini et al., 2009). The neural representation creates by emotional events were assigned to physiological consequences of this experience: peripheral hormonal secretion and correspondent liberation of specific neurotransmitters in the activated limbic regions (Kerfoot et. al., 2008). So, it is know that the NA in the hippocampus and amygdala is essential to convert the emotional experiences in long term memories (Miyashita & Williams, 2004). Pharmacologic studies demonstrated that NA, interfacing with others neuromodulators and hormones, modules memory formation, mainly by its action in amygdala and hippocampus (Cahill & McGaugh, 1996).

The NA has effect in several neurons, membrane potentials, cellular excitability, intercellular cascades and synaptic plasticity. The noradrenergic signalization occurs by 3 categories of receptors:  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  and  $\beta$ , with subtypes in each group (Sara, 2009). *In vitro* studies suggest that the NA liberation effect in any cerebral region is complex and dependent of the intracellular NA concentration and the availability and affinity of receptors in the target region (Madison & Nicoll, 1986).

The Nucleus of Solitary Tract (NTS), located in the brain stem, receives peripheric information and among stimulus and send projections to Nucleus Paragigantocellularis (PGi), also located in brain stem, composed by glutamatergic and cholinergic neurons (Ennis & Aston-Jones, 1988). PGi releases glutamate and others neurotransmitters, predominantly excitatory, and use these ones to stimulates *Locus Coeruleus* (LC). LC contains glutamatergic neurons and receptors sensitive to several neurotransmitters and, for your time, send noradrenergic projections to hippocampus and amygdala (central and basolateral; Sara, 2009). The noradrenergic system of LC facilitates the attention, cognition and adaptation of behavior to changes of the environment (Sara & Devauges,

1990; Sara & Segal, 1991; Bouret & Sara, 2004, 2005), beyond facilitate the behavior responses resulted by decisive processes in specific tasks (Aston-Jones & Cohen, 2005). NA interacts with others neurotransmitters, neuromodulators and stress hormones in amygdala and hippocampus to promote the long term memory formation (Roosendaal et al., 2008). So, the NA affect the cognitive processes, facilitating the integration of cerebral regions involved in these processes (Sara, 2009).

It was already demonstrate that NTS, PGI, LC and hippocampus participate and are essential to consolidation of aversive memory. Clayton e Williams (2000) demonstrated that the adrenergic activation of NTS potentiates the release of NA by amygdala, improving the aversive memory retention in the inhibitory avoidance task. Roosendaal, Williams & McGaugh (1999) showed that the activation of glucocorticoid receptors in NTS facilitates the aversive memory consolidation. Williams, Men & Clayton (2000) verified that the inactivation of excitatory afferent pathway to LC (PGI) prejudices the retention of memory in inhibitory avoidance.

According Sara (2009) is missing one link between the well established actions of NA in this target-cells and this real effect in the cognitive functions. Considering that the object recognition task involves the presentation of a new to the animal, we hypothesized that this types of memory also requires the participation of these pathway.

The aim of this study was verify the participation of NTS-PGI-LC-CA1 region of dorsal hippocampus in the consolidation of object recognition memory.

## **Results**

To analyze the effect of NTS inhibition on OR memory consolidation, male Wistar rats were trained in an OR learning task involving exposure to two different stimuli objects (Fig. 1A). Immediately, 3 h or 6 h after training, the animals received bilateral intra-NTS infusions of vehicle (VEH; saline) or muscimol (MUS; 0.1 µg/µl; 0.5 µl/side). LTM was evaluated 24 h later. In the LTM retention test session, the animals were exposed for 5

min to one of the objects presented during training together with a novel one. Rats that received VEH or MUS 6 h after training explored the novel object significantly longer than the familiar one (Fig. 1D). On the contrary, animals that received MUS immediately or 3 h after training session spent the same amount of time exploring the novel and the familiar object (Fig. 1B, 1C), suggesting that NTS activity is necessary at least until 3 h after learning for retention of OR memory.

To analyze the effect of inhibition of PGI on OR memory consolidation, we did the same procedure, immediately, 3 h or 6 h after training, the animals received bilateral intra-PGI infusions of VEH or MUS (0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 0.5  $\mu\text{l}/\text{side}$ ). In the LTM retention test session, rats that received VEH or MUS 6 h after training explored the novel object significantly longer than the familiar one (Fig. 2D). On the contrary, animals that received MUS immediately or 3 h after training session spent the same amount of time exploring the novel and the familiar object (Fig. 2B, 2C), suggesting that PGI activity is also necessary at least until 3 h after learning for retention of OR memory.

To analyze the effect of inhibition of LC on OR memory consolidation, the animals received bilateral intra-LC infusions of VEH or MUS (0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 0.25  $\mu\text{l}/\text{side}$ ) immediately, 3 or 6 h after training session. In the LTM retention test session, rats that received VEH or MUS 6 h after training explored the novel object significantly longer than the familiar one (Fig. 3D). On the contrary, animals that received MUS immediately or 3 h after training session spent the same amount of time exploring the novel and the familiar object (Fig. 3B, 3C), suggesting that LC activity is necessary at least until 3 h after learning for retention of OR memory.

To evaluate the necessity of noradrenaline (NA) in CA1 region of dorsal hippocampus (CA1), basolateral (BSL AMY) and central amygdala (CNT AMY), rats were trained in an OR learning task and, immediately after training the animals received bilateral intra-CA1, intra-BSL AMY or intra-CNT AMY infusions of VEH or timolol (TIM; 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 1  $\mu\text{l}/\text{side}$  for CA1 and 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 0.5  $\mu\text{l}/\text{side}$  for BSL and CNT AMY). LTM was evaluated 24 h later. In the



LTM retention test session, rats that received VEH or TIM in BSL and CNT AMY after training explored the novel object significantly longer than the familiar one (Fig. 4B, 4C). On the contrary, animals that received TIM in CA1 spent the same amount of time exploring the novel and the familiar object (Fig. 4A), suggesting that NA activity is necessary in the CA1 region of dorsal hippocampus for retention of OR memory.

To access the effect of NA infusion on CA1, rats were trained in an OR learning task and, immediately after training the animals received bilateral intra-CA1 infusion of VEH or NA (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 1 $\mu\text{l}/\text{side}$ ). LTM was evaluated 24 h later. In the LTM retention test session, rats that received VEH or NA after training have a similar behavioral, explored the novel object significantly longer than the familiar one (Fig.5), suggesting that NA did not improve this type of memory, at least when the animals were tested 24 h after training session.

To verify whether the amnesia caused by MUS in NTS, PGI and LC, and TIM in CA1 were actually impairment of consolidation process or instead it was induced by a delayed action on structure's functions, anxiety and/or exploratory activity able to hinder retrieval of OR task, rats received bilateral intra-structure infusion of drug 24 h before exposure to a plus maze or an open-field arena. MUS in NTS, PGI and LC and TIM in CA1 had no effect in the total number of entries or in percentage of time spent in the open arms during the plus maze session (Table 1 – plus maze). Similarly, the drugs did not affect the number of crossings and rearings during a 5 min long free exploration session of the open field (Table 1 – open field). Until, when the drugs are infused 24 h before training in inhibitory avoidance task, they did not affect acquisition or retention tested 24 h later (Table 1 – inhibitory avoidance), a learning task that requires the functional integrity of the NTS (Kerfoot et al., 2008; Roozental et al., 1999), PGI (Clayton and Williams, 2000; Anniss and Aston-Jones, 1988), LC (Khakpour-Taleghari et al., 2008; Clayton and Williams, 2000) and hippocampal formation (Izquierdo et al., 2006).

Because the final station of the pathway NTS-PGI-LC is the CA1 region of dorsal hippocampus, we investigate if the amnesia caused by infusion of MUS on NTS, PGI and

LC can be reversed by CA1 stimulation with NE. Rats were trained in an OR learning task and, immediately after training the animals received bilateral intra-NTS, -PGi or -LC infusion of VEH or MUS (0.1 µg/µl; 0.5 µl/side for NTS and PGi or 0.2 µg/µl; 0.25 µl/side for LC) and a bilateral intra-CA1 infusion of VEH or NA (1 µg/µl; 1µl/side). LTM was evaluated 24 h later. In the LTM retention test session, rats that received VEH or MUS + NA after training explored the novel object significantly longer than the familiar one (Fig. 6), suggesting that NA infused in CA1 region of dorsal hippocampus can reverse the memory impairment caused by inhibition of NTS (Fig. 6A), PGi (Fig. 6B) or LC (Fig. 6C) in OR task.

Also, to investigate if the amnesia caused by infusion of MUS on NTS and PGi can be reversed by stimulation of a downstream point of the pathway, we stimulated LC with NMDA. NMDA receptors are located in plasma membranes of noradrenergic neurons in LC (Grilli et al., 2009). Rats were trained in an OR learning task and, immediately after training the animals received bilateral intra-NTS or -PGi infusion of VEH or MUS (0.1 µg/µl; 0.5 µl/side) and a bilateral intra-LC infusion of VEH or NMDA (0.1 µg/µl; 0.25 µl/side). LTM was evaluated 24 h later. In the LTM retention test session, rats that received VEH or MUS + NMDA after training explored the novel object significantly longer than the familiar one (Fig. 7), suggesting that NMDA infused in LC can reverse the memory impairment caused by inhibition of NTS (Fig. 7A) and PGi (Fig. 7B) in OR task.

Importantly, none of these drugs or combination of drugs affect total exploration time during the OR test session (Table 2).

Recent findings suggest that 120 min after OR training there is an increase of BDNF's expression in CA1 region of dorsal hippocampus (Furini et al., 2009). BDNF have an essential play in memory formation and persistence (Bekinschtein et al., 2008; Romero-Granados et al., 2010). Thus, we study the possible link between NTS - PGi - LC - CA1 pathway activation and BDNF's expression during OR memory consolidation. We verify that inactivation of NTS (Fig. 8A), PGi (Fig. 8B) or LC (Fig. 8C) with MUS blocks the

BDNF increase that occur 120 min posttraining in OR task. Importantly, the infusion of NA in CA1 region immediately after infusion of MUS in NTS (Fig. 9A), PGI (Fig. 9B) or LC (Fig. 9C) revert this effect, and permit the increase of BDNF expression 120 min posttraining in OR. Also, the coinfusion of NMDA in LC and MUS in NTS (Fig. 10A) or PGI (Fig. 10B) revert the block of the increase of BDNF expression 120 min after training in OR.

### **Discussion**

Our results confirm the participation of NTS – PGI – LC - CA1 pathway on object recognition memory consolidation. It is known that these structures have an important contribution in inhibitory avoidance memory retention (Clayton and Williams, 2000; Khakpour-Taleghari et al., 2008; Miyashita and Williams, 2004; Roozendaal et al., 1999), but it is the first time that these structures are investigated together, like one pathway, on memory processes, and in recognition memory.

Most studies regarding the role of NTS on aversive memory, showing that NTS reversible inactivation impaired the aversive memory storage (Williams and McGaugh, 1992) and that the adrenergic activation of NTS potentiates amygdala noradrenaline release and enhances retention performance in emotionally arousing (Clayton and Williams, 2000b). Others studies investigated PGI participation in this process. Clayton and Williams (2000c) verified that the inhibition of PGI impairs the retention in inhibitory avoidance task. The same authors (2000a) showed that the activation of PGI with glutamate after training in an inhibitory avoidance task improved the retention latencies in the test. Also, Khakpour-Taleghari et al. (2008) showed that LC is involved in consolidation and memory retrieval, but not in acquisition of this type of memory. The participation of hippocampus formation in aversive learning is known for a long time (Izquierdo et al., 2006; Qi and Gold, 2009). But, very little or nothing is known about the participation of NTS, PGI and LC in the consolidation of non-aversive declarative long-term memories. The present data show that

the inhibition of these structures until 3 h after learning in OR task impairs the memory formation. Confirmed the pathway structure, since the amnesic effect of NTS and PGI infusion of MUS is reversed by stimulation of LC with NMDA.

We demonstrated, yet, that activation of  $\beta$ -adrenergic receptors is necessary on CA1 region of dorsal hippocampus immediately after training to permits the object recognition memory consolidation. When TIM, a  $\beta$ -receptor antagonist is infused in this region the rats became amnesic when their LTM is access. However, the infusion of NA in CA1 region immediately after learning did not affect the consolidation. It is expected, since the control animals had a normal learning, and it is difficult to see an improved of this normal memory. However, the NA infusion in CA1 reverses the amnesic effect of inhibition of NTS, PGI and LC. It confirmed our hypothesis that the  $\beta$ -adrenergic CA1 receptors acts downstream of NTS – PGI – LC – CA1 pathway.

These findings, together, indicated that activation of NTS – PGI – LC - CA1 pathway is necessary to non-declarative recognition memories consolidation.

There is abundant evidence about the BDNF's participation on consolidation and persistence of memories (Romero-Granados et al., 2010; Slipczuk et al., 2009; Bekinschtein et al., 2007; Bekinschtein et al., 2008). Indeed, it is recently demonstrated that 120 min after object recognition task training there are a increase of BDNF expression in CA1 region of dorsal hippocampus (Furini et al., 2009). We are able to confirm these results, and we verified that inhibition of NTS, PGI or LC impairs this BDNF expression increase, and that co-infusion of NA in CA1 after the inhibition of these regions revert this effect and the BDNF's expression increase again 120 min after learning. Also, the LC's stimulation with NMDA after NTS or PGI inhibition promoted the increase of BDNF's expression again.

Our results demonstrated that NA release in CA1 region is modulated by NTS-PGI-LC pathway. The NTS is activated by a peripheric stimulus before the new, what occurs when the rat where exposed to two novel objects in this task's training. NTS send projections to

PGi, and this one to LC. LC controls the NA liberation on CA1 region, it is already demonstrated that in aversive learning LC controls also NA liberation in basolateral amygdala (Roosendaal et al., 2009), but, in this case, OR declarative memory, we are unable to detect basolateral or central amygdala participation.

The NA stimulation on CA region should activate CREB and increase BDNF's expression, what we confirmed in previous researches (Furini et al., 2009) that demonstrated BDNF increased 120 min after learning. We confirm the LC's NA necessity because the inactivation of any point of NTS-PGi-LC-CA1 pathway impairs BDNF's level increase, and the inactivation of one point associated with stimulation of other posterior point reverts this effect.

### **Surgery and Drug Infusion Procedures**

Male Wistar rats (3-month-old, 250-280g) bought at FEPPS (Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil) were used. The animals were housed five to a cage and kept with free access to food and water under a 12-hour light-dark cycle, with light onset at 8:00 AM. The temperature of the animal's room was maintained at 22-24°C.

To implant them with indwelling cannulas, rats were deeply anesthetized with thiopental (i.p., 30-50 mg/kg) and 27-gauge cannulas stereotaxically aimed (according to coordinates from the atlas of Paxinos and Watson, 1986) to the NTS (A – 13.3, L ± 1.0, V – 7.9 mm), PGi (A – 12.8, L ± 1.6, V – 12 mm), LC (A – 9.7, L ± 1.3, V – 7.1 mm), basolateral amygdala (A – 2.4, L ± 5.1, V – 8.1 mm), central amygdala (A – 2.4, L ± 4.2, V – 8.3 mm) or/and CA1 region of the dorsal hippocampus (A – 4.2, L ± 3.0, V – 2.0 mm). Animals were allowed to recover from surgery for 4 days before submitting to any other procedure. At the time of drug delivery, 30-gauge infusion cannulas were tightly fitted into the guides. Infusions (0.25 µl/lado in LC, 0.5 µl/lado in NTS, PGi and central and basolateral amygdala, and 1 µl/lado in CA1 region of hippocampus) were carried out over 60 s with an

infusion pump, and the cannulas were left in place for 60 additional seconds to minimize backflow. The placement of cannulas was verified postmortem: 2-4 h after the last behavioral test, the same bulk of drug utilized of a 4% methylene-blue solution was infused as described earlier, and the extension of the dye 30 min thereafter was taken as an indication of the presumable diffusion of the vehicle or drug previously given to each animal. Only data from animals with correct implants were analyzed. All procedures were conducted in accordance with the "Principles of laboratory animal care" (NIH publication N]. 85-23, revised 1996). Every effort was made to reduce the number of animals used to minimize their suffering.

### **Object Recognition Task**

Training and testing in the object recognition (OR) task was carried out in an open-field arena (50 x 50 x 50 cm) built of polyvinyl chloride plastic, plywood and transparent acrylic as described (Myskiw et al, 2008). The first procedure consisted in habituation of the animals. Each animal was placed in the apparatus for 20 min to freely exploration per day during 4 consecutive days before the training. On day 1, training day, two different objects (A and B) were placed in the apparatus; animals were allowed to explore them freely for 5 min. The objects were made of metal, glass, or glazed ceramic. Exploration was defined as sniffing or touching the objects with the nose and/or forepaws. Sitting on or turning around the objects was not considered exploratory behavior. A video camera was positioned over the arena, and the rats' behavior was recorded using a video tracking and analysis system for later evaluation. The experiments were performed by an observer blind to the treatment condition of the animals. 24h later, on day 2, test phase, one of the objects was randomly exchanged for a novel object (C) and rats were reintroduced into the apparatus for an additional 5 min period. To avoid confounds by lingering olfactory stimuli and preferences, the object and the arena were cleaned after testing each animal with 70% ethanol.

The drugs were bilaterally infused different times after training session. Data were analyzed using one-sample Student's *t*-test.

### **Open Field and Plus Maze**

To analyze animals' exploratory and locomotor activities, 24h after the infusion of different drugs rats were placed on the left quadrant of a 50 x 50 x 39 cm open field made with wooden painted white, with a frontal glass wall. Black lines were drawn on the floor to divide it into 12 equal quadrants. Crossings and rearings, with measure locomotor and exploration, respectively, were measured over 5 min (Barros et al., 2002).

To evaluate the animals' anxiety state, 24h after the infusion of different drugs rats were exposed to an elevated plus maze as detailed in Pellow et al. (1985). The total number of entries into the four arms, the number of entries and the time spent into the open arms were recorded over 5 min session.

Data were analyzed using one-way ANOVA.

### **Inhibitory Avoidance Task**

Considering that NTS, PGI, LC, CA1 region of dorsal hippocampus and amygdala participate of IA memory consolidation (Kerfoot et al., 2008; Roozental et al., 1999; Clayton and Williams, 2000; Khakpour-Taleghari et al., 2008; Izquierdo et al., 2006), the integrity of these structures are necessary to occur learning in this task. To verify the availability of these structures to a new learning, 24 h after infusion of different drugs rats were trained in a one-trial step-down inhibitory avoidance task as previously described (Bevilaqua et al., 2005). The training apparatus was a 50 x 25 x 25 cm plexiglass box with a 5 cm-high, 8 cm-wide, and 25 cm-long platform on the left end of a series of bronze bars which made up the floor of the box. For training, animals were gently placed on the platform facing the left rear corner of the training box. When they stepped down and

placed their four paws on the grid, received a 2 s, 0.5 mA scrambled footshock. Memory retention was evaluated in a nonreinforced test session carried out 24 h after training.

Data were analyzed using ANOVA.

### **Immunoblot Assays**

Animals were killed by decapitation and the CA1 region of the dorsal hippocampus rapidly dissected out and homogenized in ice-chilled buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.32 M sucrose, 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM PMSF, 10 µg/ml aprotinin, 15 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml bacitracin, 10 µg/ml pepstatin, 15 µg/ml trypsin inhibitor, 50 mM NaF, and 1 mM sodium orthovanadate). Protein concentration was determined using the BCA protein assay (Pierce, Rockford, IL), and equal amounts of protein were fractionated by SDS-PAGE before electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes (PVDF; Immobilon-P, Millipore, MS). After verification of protein loading by Ponceou S staining, the blots were blocked in Tween-Tris buffer saline (TTBS; 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 0.9 % NaCl and 0.1 % Tween 20) and incubated overnight with anti-BDNF antibody (N20, 1:5,000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) or anti-tubuline antibody (1:1,000, Sigma-Aldrich, St Louis, MO). The membranes were washed in TTBS and incubated with HRP-coupled anti-IgG antibody, washed again, and the immunoreactivity detected using West-Pico enhanced chemiluminescence kit (Pierce, IL). Densitometric analysis was carried out in an ImageQuant RT-ECL system (GE, Piscataway, NJ).

Data were analyzed using ANOVA followed by Dunnet's post hoc.

### **Reagents**

Muscimol, timolol, NMDA and NA were from Sigma-Aldrich (St Louis, MO). Anti-BDNF antibody was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anti-tubuline antibody was from Sigma-Aldrich (St Louis, MO). The drug were dissolved in saline and stored



protect from light at -20°C until use. Right before that an aliquot was thawed and diluted to working concentration in saline 0.9 % (pH 7.2). The doses used were based on pilot experiments and on previous studies showing the effect of each compound on learning and behavioral performance (Furini et al., 2009; Roozendaal et al., 2008; Clayton e Williams, 2000; Lemon et al, 2009).

## References

- Akirav, I., Maroun, M. (2006). Ventromedial prefrontal cortex is obligatory for consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Cereb Cortex*. 16(12): 1759-1765.
- Aston-Jones, G., Cohen, J.D. (2005). Adaptive gain and the role of locus coeruleus-norepinephrine system in optimal performance. *J Comp Neurol*. 493(1): 99-110.
- Bekinschtein P, Cammarota M, Igaz LM, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Medina JH. (2007). Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis – and BDNF – dependent phase in the hippocampus. *Neuron*. 53(2): 261-77.
- Bekinschtein P, Cammarota M, Izquierdo I, Medina JH. (2008). BDNF and memory formation and storage. *Neuroscientist*. 14(2): 147-56.
- Bevilaqua, L.R., Rossato, J.I., Medina, J.H., Izquierdo, I., Cammarota, M. (2005). Src kinase activity is required for avoidance memory formation and recall. *Behav Pharmacol*. 14(8): 649-652.
- Bonini, J.S., Bevilaqua, L.R., Zinn, C.G., Kerr, D.S., Medina, J.H., Izquierdo, I., Cammarota, M. (2006). Angiotensin II disrupts inhibitory avoidance memory retrieval. *Horm Behav*. 50(2): 308-313.
- Bouret, S., Sara, S.J. (2004). Reward expectation, orientation of attention and locus-coeruleus-medial frontal cortex interplay during learning. *Eur J Neurosci*. 20(3): 791-802.
- Bouret, S., Sara, S.J. (2005). Network reset: a simplified overarching theory of locus coeruleus noradrenaline function. *Trends Neurosci*. 28(11): 574-582.

- Cahill, L., McGaugh, J.L. (1996). Modulation of memory storage. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6: 237-242.
- Cammarota, M., Bevilaqua, L.R., Ardenghi, P., Paratcha G, Levi de Stein M, Izquierdo I. (2000). Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade. *Mol Brain Res.* 10;76(1):36-46.
- Cammarota, M., Bevilaqua, L.R., Kerr, D., Medina, J.H., Izquierdo, I. Inhibition of mRNA and protein synthesis in the CA1 region of the dorsal hippocampus blocks reinstatement of an extinguished conditioned fear response. *J Neurosci.* 23(3): 737-741.
- Clayton, E.C., Williams, C.L. (2000a). Glutamatergic influences on the nucleus paragigantocellularis: contribution to performance in avoidance and spatial memory tasks. *Behav Neurosci.* 114(4): 707-712.
- Clayton EC, Williams CL. (2000b). Adrenergic activation of the nucleus tractus solitarius potentiates amygdala norepinephrine release and enhances retention performance in emotionally arousing and spatial memory tasks. *Behav Brain Res.* 112(1-2): 151-8.
- Clayton EC, Williams CL. (2000c) Posttraining inactivation of excitatory afferent input to the locus coeruleus impairs retention in an inhibitory avoidance learning task. *Neurobiol Learn Mem.* 73(2): 127-40.
- Devauges, V., Sara, S.J. (1990). Activation of the noradrenergic system facilitates an attentional shift in the rat. *Behav Brain Res.* 39(1): 19-28.
- Ennaceur, A., Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioural data. *Behav Brain Res.* 31(1): 47-59.
- Ennis, M., Aston-Jones, G. (1988). Activation of locus coeruleus from nucleus para gigantocellularis: a new excitatory amino acid pathway in brain. *J Neurosci.* 8(10): 3644-3657.

- Furini CR, Rossato JI, Bitencourt LL, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. (2010).  $\beta$ -adrenergic receptors link NO/sGC/PKG signaling to BDNF expression during consolidation of object recognition long-term memory. *Hippocampus*. 20(5): 672-683.
- Gliebus G., Lippa CF. (2007). The influence of beta-blockers on delayed memory function in people with cognitive impairment *Am J Alzheimers Dis Other Demen* 22: 57-61.
- Grilli M, Zappettini S, Zanardi A, Lagomarsino F, Pittaluga A, Zoli M, Marchi M. (2009) Exposure to an enriched environment selectively increases the functional response of the presynaptic NMDA receptors which modulate noradrenaline release in mouse hippocampus. *Journal of Neurochemistry*. In press.
- Gygi, S.P., Rochon, Y., Franza, B.R., Aebersold, R. (1999). Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol*. 19(3):1720-1730.
- Kelly, A., Laroche, S., Davis, S. (2003). Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory. *J Neurosci*. 23(12): 5354-5360.
- Kerfoot, E.C., Chattillion, E.A., Williams, C.L. (2008). Functional interactions between the nucleus tractus solitarius (NTS) and nucleus accumbens shell in modulating memory for arousing experiences. *Neurobiol Learn Mem*. 89(1): 47-60.
- Kerr, D.S., Bevilaqua, L.R., Bonini J.S., Rossato, J.I., Köhler, C.A., Medina, J.H., Izquierdo, I., Cammarota, M. (2005). Angiotensin II blocks memory consolidation through an AT2 receptor-dependent mechanism. *Psychopharmacology (Berl)*. 179(3): 529-535.
- Izquierdo I, Bevilaqua LR, Rossato JI, Bonini JS, Medina JH, Cammarota M. (2006). Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends Neurosci*. 29: 496-505.
- Khakpour-Taleghari B, Lashgari R, Aavani T, Haghparast A, Naderi N, Motamedi F. (2008). The locus coeruleus involves in consolidation and memory retrieval, but not in acquisition of inhibitory avoidance learning task. *Behav Brain Res*. 189(2): 257-62.

- Lemon N, Aydin-Abidin S, Funke K, Manahan-Vaughan D. (2009) Locus coeruleus activation facilitates memory encoding and induces hippocampal LTD that depends on  $\beta$ -adrenergic receptor activation. *Cereb Cortex*. In press.
- Madison, D.V., Nicoll, R.A. (1986). Actions of noradrenaline recorded intracellularly in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons, in vitro. *J Physiol*. 372: 221-244.
- Myskiw JC, Rossato JI, Bevilaqua LR, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. (2008). On the participation of mTOR in recognition memory. *Neurobiol Learn Mem*. 89(3): 338-51.
- Miyashita, T., Williams, C.L. (2004). Peripheral arousal-related hormones modulate norepinephrine release in the hippocampus via influences on brainstem nuclei. *Behav Brain Res*. 153(1): 87-95.
- Moses, S.N., Cole, C., Driscoll, I., Ryan, J.D. (2005). Differential contributions of hippocampus, amygdala and perirhinal cortex to recognition of novel objects, contextual stimuli and stimulus relationships. *Brain Res Bull*. 67 (1-2): 62-76.
- Paxinos, G. & Watson, C. (1986). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 2<sup>nd</sup> ed.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*. 14(3): 149-67.
- Qi Z, Gold PE. (2009). Intrahippocampal infusion of anisomycin produce amnesia: contribution of increased release of norepinephrine, dopamine and acetylcholine. *Learn Mem*. 16(5): 308-14.
- Reed, J.M., Squire, L.R., Patalano A.L., Smith, E.E., Jonides, J. Learning about categories that are defined by object-like stimuli despite impaired declarative memory. *Behav Neurosci*. 113(3): 411-419.
- Romero-Granados R, Fontán-Lozano A, Delgado-García JM, Carrión AM. (2009). From learning to forgetting: behavioral, circuitry, and molecular properties define the different functional states of the recognition memory trace. *Hippocampus*. In press.
- Roosendaal B, McEwen BS, Chattarji S. (2009). Stress, memory and the amygdala. *Nat Rev Neurosci*. 10(6): 423-33.

Roosendaal, B., Castello, N.A., Vedana, G., Barsegyan, A., McGaugh, J.L. Noradrenergic activation of the basolateral amygdala modulates consolidation of object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem.* 90(3): 573-579.

Roosendaal, B., Williams, C.L., McGaugh, J.L. (1999). Glucocorticoid receptor activation in the rat nucleus of the solitary tract facilitates memory consolidation: involvement of the basolateral amygdala. *Eur J Neurosci.* 11(4):1317-1323.

Rossato, J.I., Bevilaqua, L.R., Lima, R.H., Medina J.H., Izquierdo, I., Cammarota, M. (2006). On the participation of hippocampal p38 mitogen-activated protein kinase in extinction and reacquisition of inhibitory avoidance memory. *Neuroscience.* 143(1): 15-23.

Sara, S.J. (2009). The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. *Nat Rev Neurosci.* 10(3):211-223.

Sara, S.J., Segal, M. (1991). Plasticity of sensory responses of locus coeruleus neurons in the behaving rat: implications for cognition. *Prog Brain Res.* 88: 571-585.

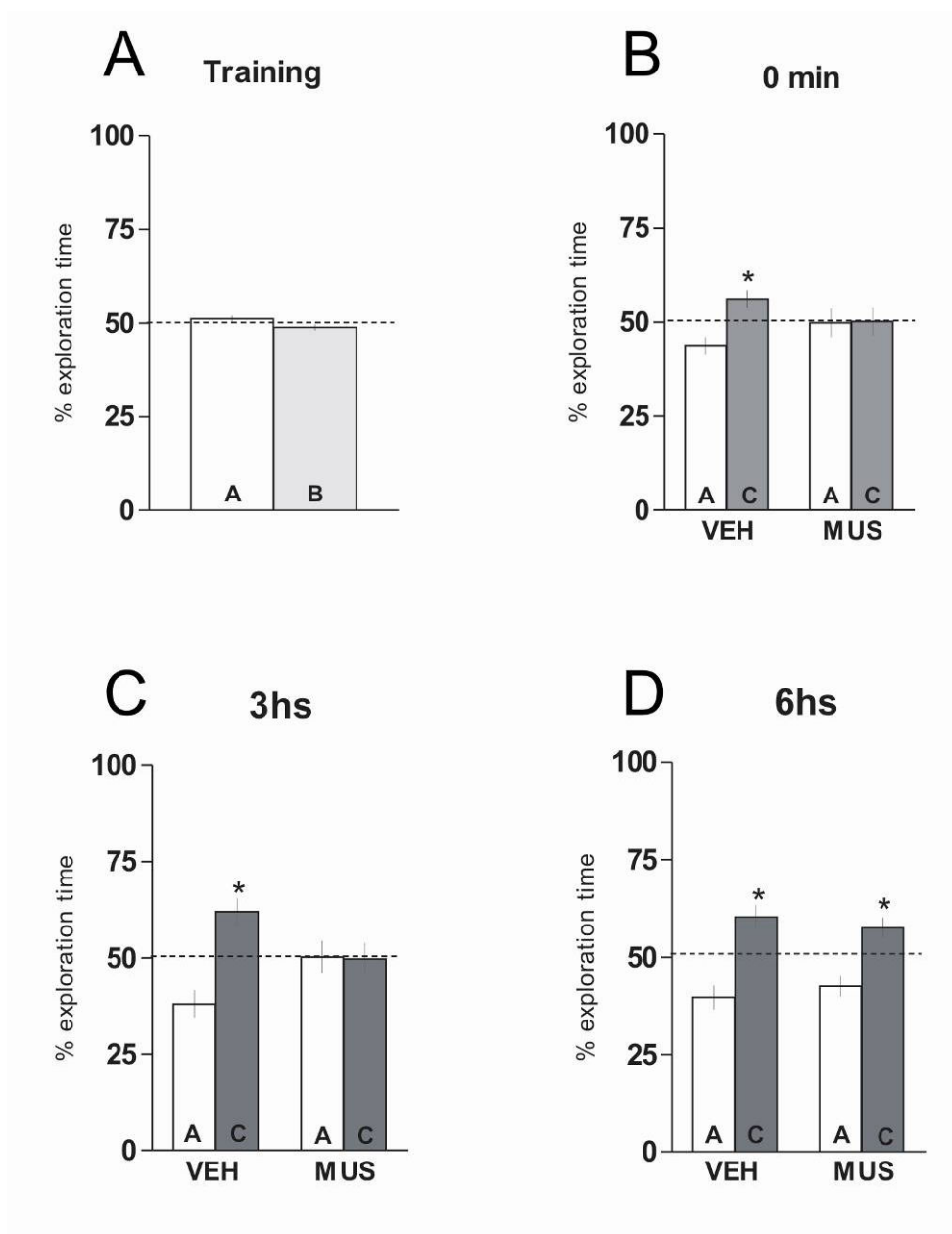
da Silva, W.C., Bonini, J.S., Bevilaqua, L.R., Izquierdo, I., Cammarota, M. (2006). Histamine enhances inhibitory avoidance memory consolidation through a H2 receptor-dependent mechanism. *Neurobiol Learn Mem.* 86(1): 100-106.

da Silva, W.C., Bonini, J.S., Bevilaqua, L.R., Medina, J.H., Izquierdo, I., Cammarota, M. (2008). Inhibition of mRNA synthesis in the hippocampus impairs consolidation and reconsolidation of spatial memory. *Hippocampus.* 18(1): 29-39.

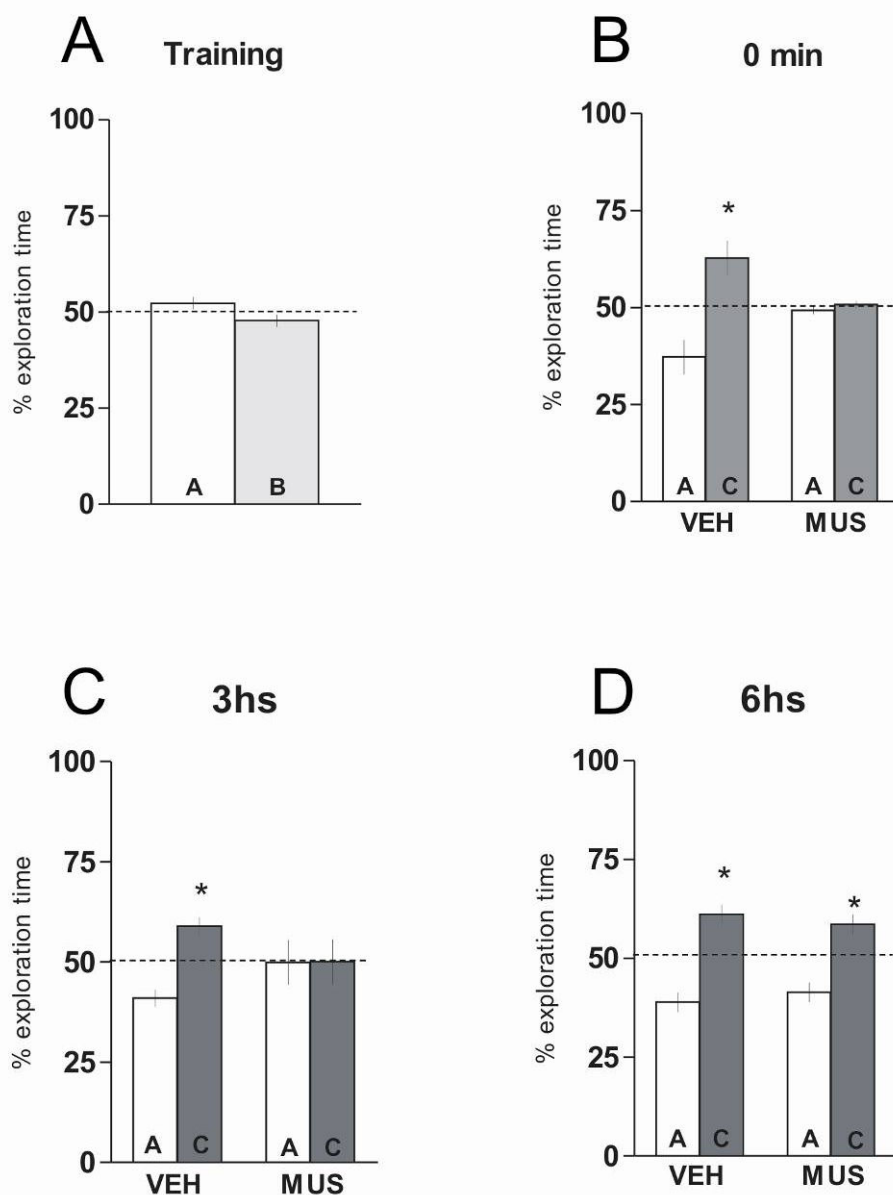
Slipczuk L, Beckinschtein P, Katch C, Cammarota M, Izquierdo I, Medina JH. (2009). BDNF activates mTOR to regulate GluR1 expression required for memory formation. *PLoS One.* 4(6):e6007.

Williams CL, McGaugh JL. (1992). Reversible inactivation of the nucleus of the solitary tract impairs retention performance in an inhibitory avoidance task. *Behav Neural Biol.* 58(3): 204-10.

Williams, C.L., Men, D., Clayton, E.C. (2000). The effects of noradrenergic activation of the nucleus tractus solitarius on memory and in potentiating norepinephrine release in the amygdala. *Behav Neurosci.* 114(6): 1131-1144.

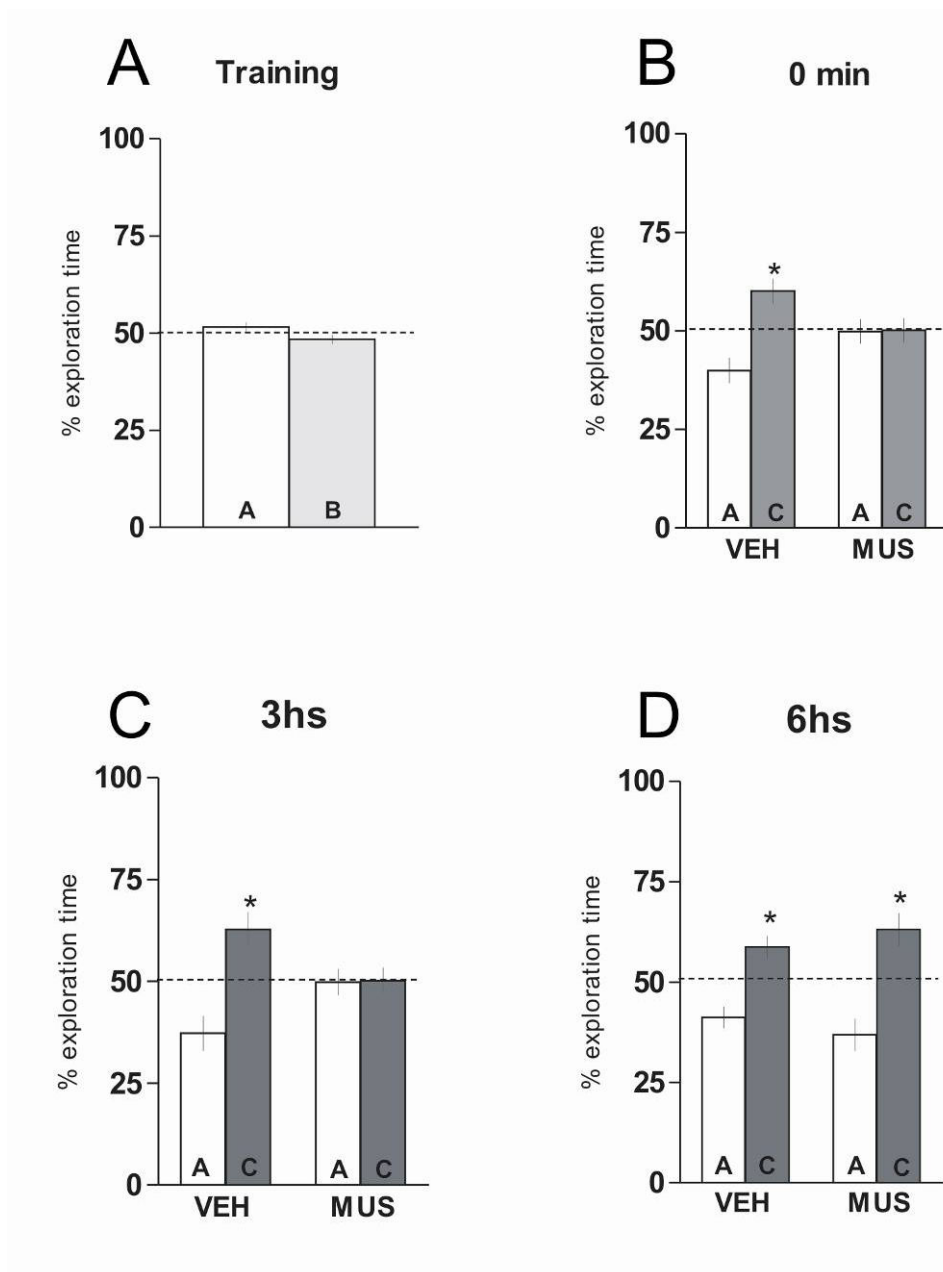


**Fig. 1. Inhibition of NTS with muscimol 0 min and 3 h, but not 6 h after training impairs retention of object recognition long-term memory.** 1A: On training session (day 1) rats were exposed to two different objects (A and B) for 5 min and immediately, 3 h or 6 h after that received bilateral infusions (0.5  $\mu$ l/side) of vehicle (VEH; saline) or muscimol (MUS; 0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l) in NTS. On test session (day 2), animals that received MUS 0 min (1B), 3 h (1C) and 6 h (1D) were exposed to a familiar (A) and a novel object (C) for five minutes to evaluate long-term memory retention. Data (mean  $\pm$  SEM) are presented as percentage of total exploration time. \*  $P \leq 0.01$  in one-sample Student's  $t$ -test with theoretical mean = 50;  $n = 9 - 12$  per group.

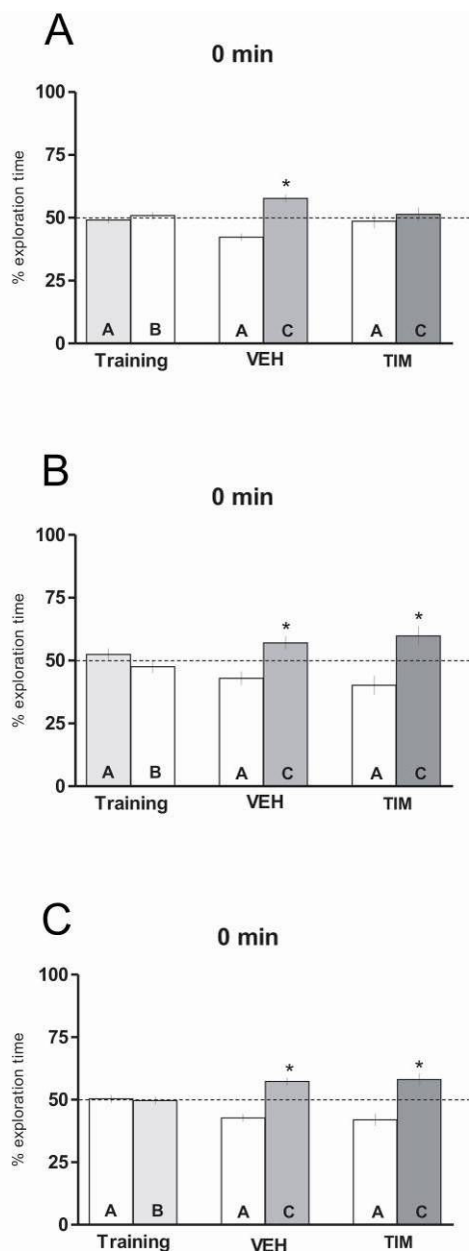


**Fig. 2. Inhibition of PGI with muscimol 0 min and 3 h, but not 6 h after training impairs retention of object recognition long-term memory.** 1A: On training session (day 1) rats were exposed to two different objects (A and B) for 5 min and immediately, 3 h or 6 h after that received bilateral infusions (0.5  $\mu\text{l}/\text{side}$ ) of vehicle (VEH; saline) or muscimol (MUS; 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) in PGI. On test session (day 2), animals that received MUS 0 min (1B), 3 h (1C) and 6 h (1D) were exposed to a familiar (A) and a novel object (C) for five minutes to evaluate long-term memory retention. Data (mean  $\pm$  SEM) are presented as percentage of total exploration time. \*  $P \leq 0.01$  in one-sample Student's  $t$ -test with theoretical mean = 50;  $n = 9 - 12$  per group.

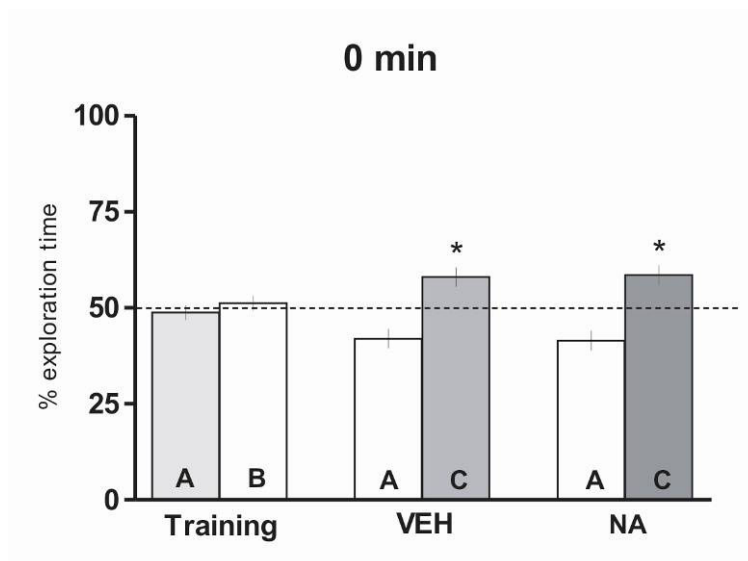




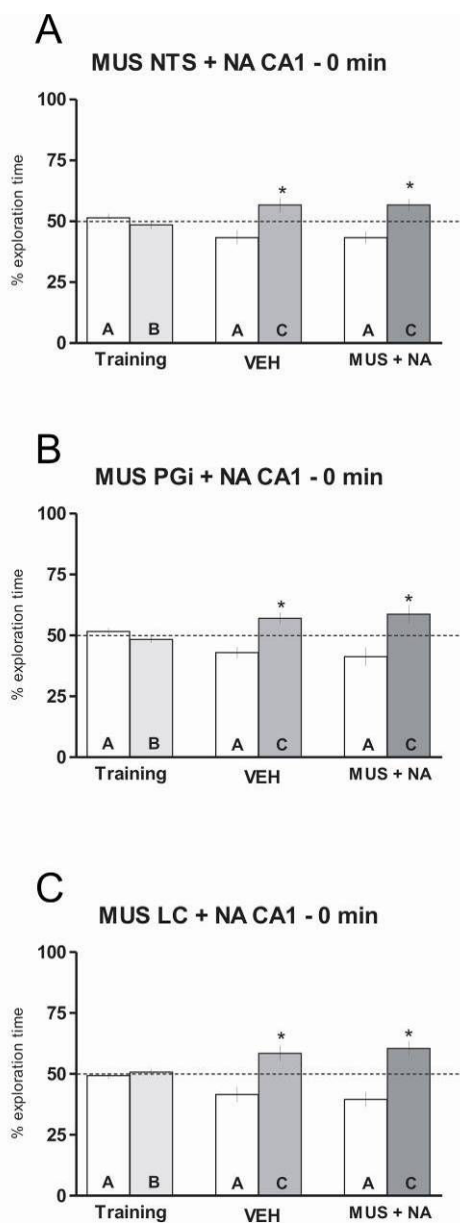
**Fig. 3. Inhibition of LC with muscimol 0 min and 3 h, but not 6 h after training impairs retention of object recognition long-term memory.** 1A: On training session (day 1) rats were exposed to two different objects (A and B) for 5 min and immediately, 3 h or 6 h after that received bilateral infusions (0.25  $\mu$ l/side) of vehicle (VEH; saline) or muscimol (MUS; 0.2  $\mu$ g/ $\mu$ l) in LC. On test session (day 2), animals that received MUS 0 min (1B), 3 h (1C) and 6 h (1D) were exposed to a familiar (A) and a novel object (C) for five minutes to evaluate long-term memory retention. Data (mean  $\pm$  SEM) are presented as percentage of total exploration time. \*  $P \leq 0.01$  in one-sample Student's  $t$ -test with theoretical mean = 50;  $n = 9 - 12$  per group.



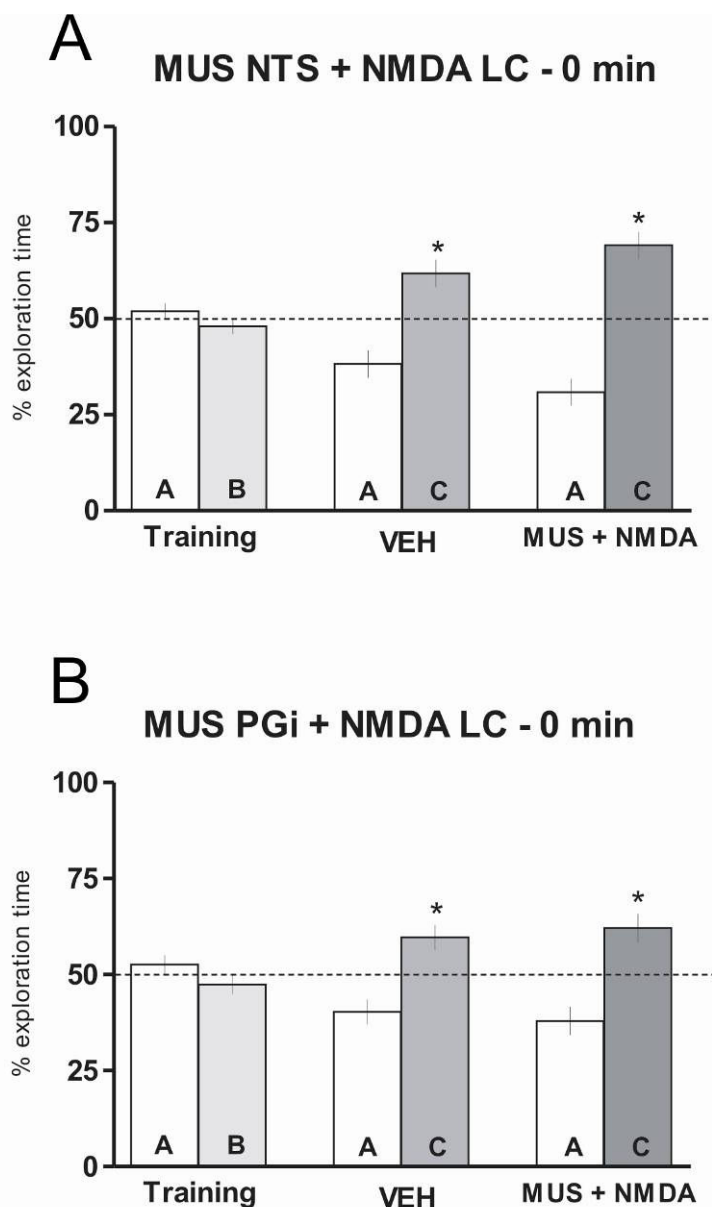
**Fig. 4. The infusion of  $\beta$ -adrenergic antagonist timolol in CA1 region of dorsal hippocampus (1A), but not in basolateral (BSL AMY; 1B) and central amygdala (CNT AMY; 1C) 0 min after training impairs retention of object recognition long-term memory.** On training session (day 1) rats were exposed to two different objects (A and B) for 5 min and immediately after that received bilateral infusions (1  $\mu$ l/side in CA1 and 0.5  $\mu$ l/side in BSL and CNT AMY) of vehicle (VEH; saline) or timolol (TIM; 1  $\mu$ g/ $\mu$ l for CA1 and 2  $\mu$ g/ $\mu$ l for BSL and CNT AMY). On test session (day 2), animals were exposed to a familiar (A) and a novel object (C) for five minutes to evaluate long-term memory retention. Data (mean  $\pm$  SEM) are presented as percentage of total exploration time. \*  $P \leq 0.01$  in one-sample Student's  $t$ -test with theoretical mean = 50;  $n = 9 - 12$  per group.



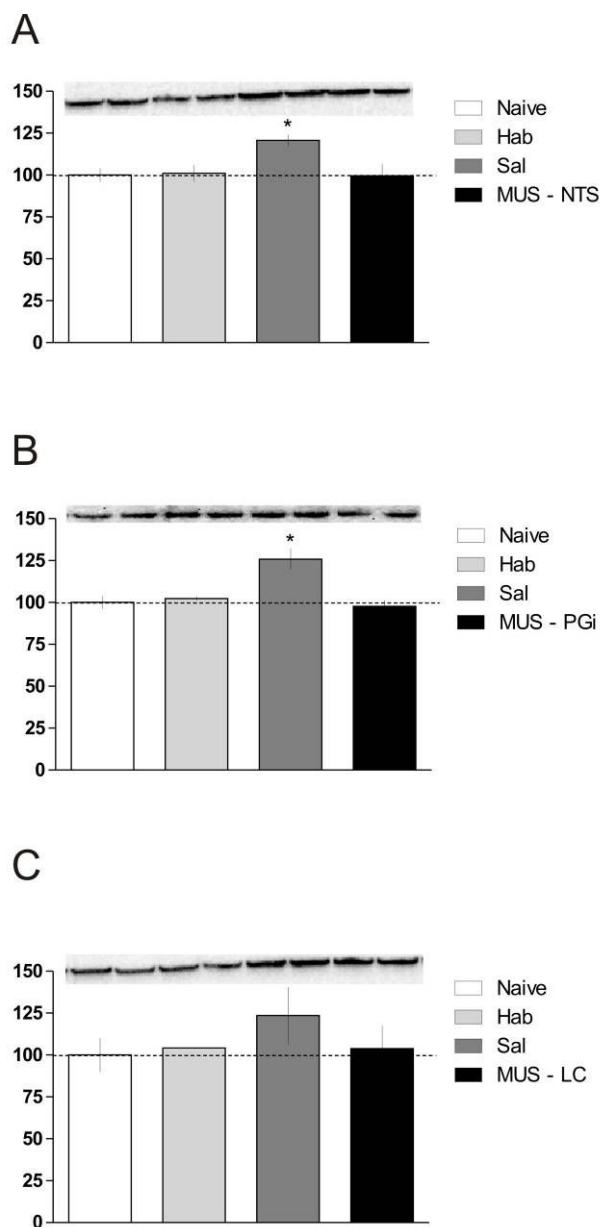
**Fig. 5. The infusion of noradrenaline in CA1 region of dorsal hippocampus 0 min after training does not affect retention of object recognition long-term memory.** On training session (day 1) rats were exposed to two different objects (A and B) for 5 min and immediately after that received bilateral infusions (1  $\mu$ l/side) of vehicle (VEH; saline) or noradrenaline (NA; 1  $\mu$ g/ $\mu$ l). On test session (day 2), animals were exposed to a familiar (A) and a novel object (C) for five minutes to evaluate long-term memory retention. Data (mean  $\pm$  SEM) are presented as percentage of total exploration time. \*  $P \leq 0.01$  in one-sample Student's *t*-test with theoretical mean = 50;  $n = 9 - 12$  per group.



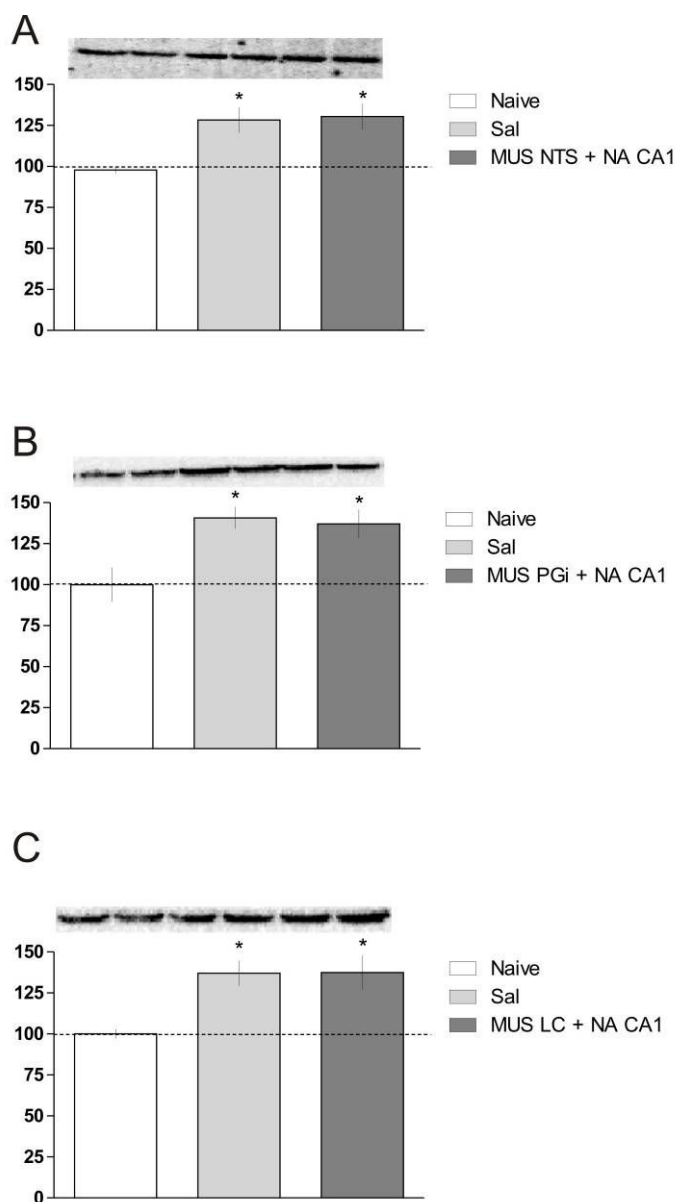
**Fig. 6. The infusion of noradrenaline in CA1 region of dorsal hippocampus immediately after infusion of muscimol in NTS (6A), PGi (6B) and LC (6C) in object recognition long-term memory revert the amnesic effect of muscimol.** On training session (day 1) rats were exposed to two different objects (A and B) for 5 min and immediately after that received bilateral infusions of vehicle (VEH; saline) or muscimol in NTS, PGi or LC + noradrenaline in CA1 (MUS: 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 0.5  $\mu\text{l}/\text{side}$  for NTS and PGi; 0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 0.25  $\mu\text{l}/\text{side}$  for LC; NA: 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 1  $\mu\text{l}/\text{side}$  for CA1). On test session (day 2), animals were exposed to a familiar (A) and a novel object (C) for five minutes to evaluate long-term memory retention. Data (mean  $\pm$  SEM) are presented as percentage of total exploration time. \*  $P \leq 0.01$  in one-sample Student's  $t$ -test with theoretical mean = 50;  $n = 9 - 12$  per group.



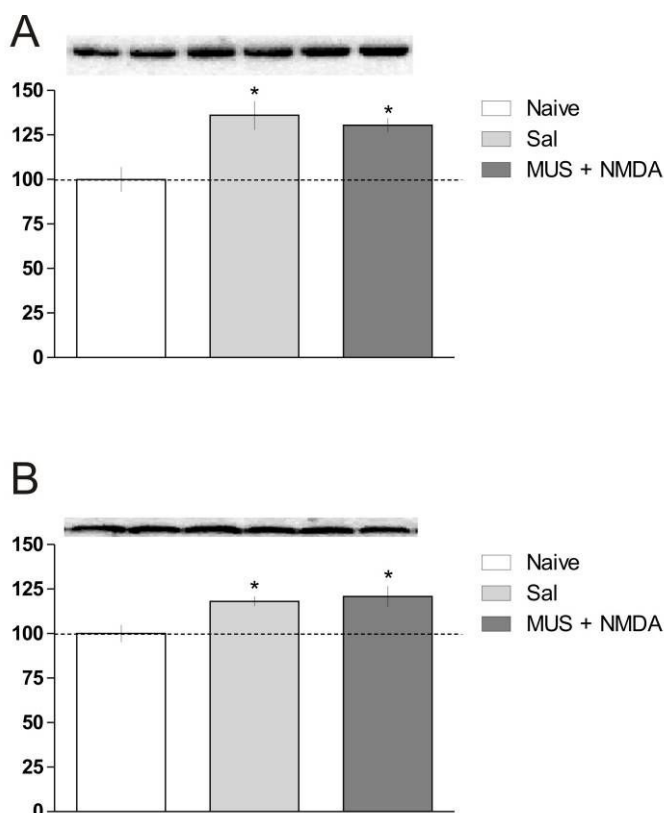
**Fig. 7. The infusion of NMDA in LC immediately after infusion of muscimol in NTS (7A) and PGI (7B) in object recognition long-term memory revert the amnesic effect of muscimol.** On training session (day 1) rats were exposed to two different objects (A and B) for 5 min and immediately after that received bilateral infusions of vehicle (VEH; saline) or muscimol in NTS or PGI + NMDA in LC (MUS: 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 0.5  $\mu\text{l}/\text{side}$  for NTS and PGI; NMDA: 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 0.25  $\mu\text{l}/\text{side}$  for LC). On test session (day 2), animals were exposed to a familiar (A) and a novel object (C) for five minutes to evaluate long-term memory retention. Data (mean  $\pm$  SEM) are presented as percentage of total exploration time. \*  $P \leq 0.01$  in one-sample Student's  $t$ -test with theoretical mean = 50;  $n = 9 - 12$  per group.



**Fig. 8. Consolidation of object recognition memory promotes BDNF's increase 120 min after training; this increase is blocked by infusion of muscimol in NTS (8A), PGI (8B) and LC (8C).** Animals received chirurgical procedures to canulla's implantation (Naive), are habituated for 4 days (Hab) or are training in OR task. Trained animals rats were exposed to two different objects for 5 min and immediately after that received bilateral infusions of saline (Sal) or muscimol (MUS) in NTS, PGI (0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 0.5  $\mu\text{l}/\text{side}$ ) or LC (0.02  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 0.25  $\mu\text{l}/\text{side}$ ). 120 min after that, the animals are killed by decapitation, the dorsal CA1 region of hippocampus dissected out and total homogenates submitted to SDS-PAGE followed by immunoblot analysis with antibodies against BDNF. Bars show the percentage levels respect to naive animals. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*  $P \leq 0.05$  in Dunnett's comparison test after ANOVA;  $n = 5$  per group.



**Fig. 9. Block of the increase of BDNF by infusion of muscimol in NTS (9A), PGI (9B) and LC (9C) are reversed by infusion of noradrenaline in CA1 region of dorsal hippocampus.** Animals only received surgical procedures to cannula's implantation (Naive) or are training in OR task. Trained animals rats were exposed to two different objects for 5 min and immediately after that received bilateral infusions of saline (Sal) or muscimol (MUS) in NTS, PGI (0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 0.5  $\mu\text{l}/\text{side}$ ) or LC (0.2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 0.25  $\mu\text{l}/\text{side}$ ) + noradrenaline (NA) in CA1 (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 1  $\mu\text{l}/\text{side}$ ). 120 min after that, the animals are killed by decapitation, the dorsal CA1 region of hippocampus dissected out and total homogenates submitted to SDS-PAGE followed by immunoblot analysis with antibodies against BDNF. Bars show the percentage levels respect to naive animals. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*  $P \leq 0.05$  in Dunnett's comparison test after ANOVA;  $n = 5$  per group.



**Fig. 10. Block of the increase of BDNF by infusion of muscimol in NTS (10A) and PGI (10B) are reversed by infusion of NMDA in LC.** Animals only received chirurgical procedures to canulla's implantation (Naive) or are training in OR task. Trained animals rats were exposed to two different objects for 5 min and immediately after that received bilateral infusions of saline (Sal) or muscimol (MUS) in NTS or PGI (0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 0.5  $\mu\text{l}/\text{side}$ ) + NMDA in LC (0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; 0.25  $\mu\text{l}/\text{side}$ ). 120 min after that, the animals are killed by decapitation, the dorsal CA1 region of hippocampus dissected out and total homogenates submitted to SDS-PAGE followed by immunoblot analysis with antibodies against BDNF. Bars show the percentage levels respect to naive animals. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*  $P \leq 0.05$  in Dunnett's comparison test after ANOVA;  $n = 5$  per group.



TABLE 1. Bilateral intra-NTS/PGi/LC infusions of muscimol and intra-CA1 infusion of Timolol, have no effect on locomotor and exploratory activities, anxiety or on NTS, PGi, LC and CA1 functions.

	<i>VEH</i>	<i>MUS NTS</i>	<i>MUS PGi</i>	<i>MUS LC</i>	<i>TIM CA1</i>
Plus Maze					
Total entries	16.55 ± 1.63	14.78 ± 1.34	11.87 ± 1.86	14.1 ± 0.76	13.7 ± 1.00
Time in open arms (s)	154.0 ± 7.28	178.8 ± 15.11	121.00 ± 12.51	180.7 ± 6.74	150.0 ± 20.00
Open Field					
Crossings	39.33 ± 6.04	42.08 ± 4.63	39.50 ± 6.95	45.33 ± 7.66	51.25 ± 7.63
Rearings	9.00 ± 1.51	8.92 ± 1.86	6.89 ± 2.17	8.36 ± 1.55	7.77 ± 2.60
Inhibitory avoidance					
Training step-down latency (s)	14.39 ± 7.53	18.34 ± 6.66	15.89 ± 5.67	10.87 ± 4.44	10.18 ± 3.18
Test step-down latency (s)	256.9 ± 79.76	250.3 ± 72.07	239.78 ± 49.97	221.8 ± 36.7	226.70 ± 43.79

MUS (0.5 µg/side in NTS and PGi; 0.25 µg/side in LC) and TIM (1 µg/side in CA1) are infused 24 h before an open field, a plus maze or a training session in inhibitory avoidance. Data are expressed as mean (± SEM) of the total number of entries and the percentage of time spent in the open arms (plus maze; n = 8 per group), the number of crossings and rearings (open field; n = 8 per group) and training/test step-down latency (s; inhibitory avoidance; n=8 per group). VEH = vehicle. MUS = muscimol. TIM = timolol. NE = norepinephrine.

TABLE 2. Intra-structure administration of muscimol, timolol, noradrenaline, NMDA or combinations of these drugs does not affect exploration in the OR task

	<b>Total exploration time (s)</b>
<b>Training session</b>	48.38 ± 9.72
<b>Test session</b>	
VEH	47.95 ± 4.14
MUS NTS (0.5 µg/side; 0.1 µg/µl)	48.57 ± 4.71
MUS PGi (0.5 µg/side; 0.1 µg/µl)	37.99 ± 5.71
MUS LC (0.25 µg/side; 0.2 µg/µl)	43.31 ± 3.77
TIM CA1 (1 µg/side; 1 µg/µl)	44.28 ± 4.77
NA CA1 (1 µg/side; 1 µg/µl)	47.28 ± 6.8
TIM AMY BSL (0.5 µg/side; 2 µg/µl)	35.92 ± 6.37
TIM AMY CNT (0.5 µg/side; 2 µg/µl)	49.33 ± 5.93
MUS NTS + NA CA1(0.5 µg/side; 0.1 µg/µl + 1 µg/side; 1 µg/µl)	52.32 ± 11.83
MUS PGi + NA CA1 (0.5 µg/side; 0.1 µg/µl + 1 µg/side; 1 µg/µl)	49.66 ± 8.38
MUS LC + NA CA1 (0.25 µg/side; 0.2 µg/µl + 1 µg/side; 1 µg/µl)	42.1 ± 8.52
MUS NTS + NMDA LC (0.5 µg/side; 0.1 µg/µl + 0.25 µg/side; 0.1 µg/µl)	38.59 ± 6.4
MUS PGi + NMDA LC (0.5 µg/side; 0.1 µg/µl + 0.25 µg/side; 0.1 µg/µl)	37.71 ± 8.48

Total exploration time (s; mean ± SEM) during training and test sessions for the animals presented in the paper. VEH = vehicle. MUS = muscimol. TIM = timolol. NA = noradrenaline