

Universidade Federal do Rio Grande Do Sul  
Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS)  
Programa de Pós-Graduação em Neurociências

**RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA E DEPENDÊNCIA DE  
ESTADO: MECANISMOS DE ATUALIZAÇÃO**

Rodrigo Alejandro Sierra Ordoñez

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
graduação em Ciências Biológicas: Neurociências da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul como  
requisito parcial à obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Jorge Alberto Quillfeldt

Co-Orientador: Prof. Lucas De Oliveira Alvares

Porto Alegre, 2012

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha mãe, que já não se encontra fisicamente comigo, mas sempre me acompanhou como minha mais bela lembrança.

Agradeço ao meu avô Rodrigo que com seu trabalho permitiu o meu bem-estar e de toda minha família.

Agradeço à minha avó Vismaenza e meu pai Alejandro pelo apoio incondicional, por sempre acreditarem em mim e pelo amor mais sincero que existe na minha vida.

Agradeço à minha namorada Cristina por compartilhar comigo os momentos mais importantes durante minha formação, por escutar minhas idéias, por acordar cedo para estudar e sobre tudo, por encher a minha vida de amor, tranqüilidade e alegria.

Quero agradecer a todos meus colegas do LPBNC, Lindsey, Josué, Ana, Johanna, Querusche, Fabrício, Flavia, com eles encontrei novas amizades em um país diferente. Principalmente quero agradecer ao Lucas de Oliveira Alvares, que me co-orientou, aconselhou e ajudou em cada parte deste processo.

Ao professor Jorge Quillfeldt que me aceito no seu laboratório e sempre estava disposto para me ajudar e escutar.

Também quero agradecer aos meus orientadores na Colômbia, o professor Fernando Cárdenas e a professora Laura León. Por eles estou nesse caminho da neurociência que foi uma das melhores escolhas da minha vida. Também ao “Semillero de Neurociencia y Comportamiento” da Universidad de los Andes onde me formei e comecei meu caminho como pesquisador.

Agradeço a CAPES pela bolsa.

Agradeço à Senhora Zelma que cuidou dos meus ratos durante o experimento todo. E pode parecer estranho, mas também quero agradecer a todos os animais que usei durante meu projeto, por eles posso colocar meus resultados nesta dissertação.

Finalmente, a todos aqueles que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

## RESUMO

Algumas memórias entram em um período lábil após a evocação. Para persistir, devem passar por outro processo chamado reconsolidação. Uma das funções da reconsolidação da memória é a atualização de memórias existentes. Estados endógenos particulares concomitantes com a reconsolidação poderiam influenciar o armazenamento e a futura expressão da memória. Neste trabalho, exploramos se um processo endógeno ativado durante uma experiência natural/fisiológica ou uma intervenção farmacológica poderiam atualizar o conteúdo da memória. Usando um Condicionamento Aversivo ao Contexto em ratos, encontramos que o conteúdo endógeno da memória pode ser atualizado durante a reconsolidação por estímulos naturais como uma restrição de água, transformando uma memória prévia em uma memória dependente de estado. Essa atualização é mediada pelos receptores AT1 de Angiotensina no hipocampo dorsal e a infusão local de Angiotensina II humana (ANG II) mimetiza os efeitos da restrição de água na reconsolidação. Esta propriedade de atualização parece ser um processo geral da memória, tendo em conta que a administração sistêmica de morfina reproduz os efeitos encontrados com a restrição de água e a infusão local de angiotensina II. Esses achados trazem novos conhecimentos sobre a influência de eventos da vida diária na memória e ampliam a visão clássica da modulação endógena da consolidação da memória.

## ABSTRACT

Some memories enter into a labile state after retrieval, requiring to be reconsolidated in order to persist. One functional role of memory reconsolidation is to update existing memories. Particular endogenous states that are concomitant with reconsolidation could influence the storage and future expression of memory. Here, we explored whether an endogenous process activated during a natural/physiological experience or pharmacological interventions can update memory content. Using the Contextual Fear Conditioning paradigm in rats, we found that endogenous content of memory can be updated during reconsolidation by natural events such as water deprivation, transforming a previous memory in a state-dependent memory. This updating is mediated by Angiotensin AT1 receptors activation in dorsal hippocampus. Furthermore, local infusion of human Angiotensin II (ANG II) mimics the water deprivation effects on memory reconsolidation. The property of endogenous update appears to be a general memory process, since systemic morphine injection reproduces the same effects obtained by water deprivation and local angiotensin II infusion on making a previously acquired memory state-dependent. These findings trigger new insights about the influence of daily life events on memory and extend the classical view of endogenous modulation of memory consolidation.

# SUMÁRIO

Agradecimentos

Resumo

Abstract

Índice de Figuras

Lista de Abreviaturas

<b>1. Introdução</b> .....	1
2. Revisão Bibliográfica .....	5
2.1. Tipos de Memórias .....	5
2.2. Fases da Memória .....	7
2.3. Consolidação Sináptica da Memória .....	11
2.4. Modulação Endógena da Memória .....	16
2.4.1. Sistema Renina-Angiotensina e Memória.....	21
2.4.2. Dependência de Estado .....	25
2.4.2.1. Sistema Opióide e Memória .....	28
2.5. Reconsolidação da Memória .....	30
2.5.1. Reconsolidação VS Extinção .....	31
2.5.2. A idade e força da memória .....	33
2.5.3. Considerações estruturais da reconsolidação da memória .....	34
2.5.4. Considerações moleculares da reconsolidação da memória .....	34
2.6. Função Biológica da Reconsolidação .....	37
2.6.1. Fortalecimento.....	38
2.6.2. Precisão .....	39

2.6.3. Atualização .....	40
2.6.3.1. Atualização ou novo aprendizado? .....	43
2.7. Modulação Endógena da Reconsolidação .....	44
<b>3. Objetivos</b> .....	45
3.1. Objetivo Geral.....	45
3.2. Objetivos Específicos .....	45
<b>4. Resultados</b> .....	47
4.1. Artigo .....	47
<b>5. Discussão</b> .....	86
<b>6. Conclusões</b> .....	91
<b>7. Referências</b> .....	94
<b>8. Anexo</b> .....	123
8.1. Anexo I: Efeitos da restrição sobre a consolidação da memória .....	123

# ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

## Revisão Bibliográfica

Figura 2.1. Classificação da memória segundo a sua natureza associativa ou não associativa .....	7
Figura 2.2. Fases do processamento da memória .....	11
Figura 2.3. Desempenho da memória e a sua relação com o nível de estresse .....	19
Figura 2.4. Síntese de Angiotensina e algumas das suas principais funções .....	23

## Artigo

Figure 1. Schematic Design of water deprivation protocol .....	60
Figure 2. Endogenous memory content can be updated during reconsolidation by natural events .....	61-62
Figure 3. Angiotensin II and AT1 receptor in dorsal hippocampus mediates the endogenous updating .....	66-67
Figure 4. Water deprivation as internal cue strengthens the expression of a weak memory .....	70
Figure 5. Systemic morphine injection can also induce endogenous updating .....	74-75

## Conclusões

Tabela 1. Resumo de objetivos e Resultados.....	93
---	----



## LISTA DE ABREVIATURAS

Angiotensina I (ANG I)

Angiotensina II (ANG II)

Angiotensina III (ANG III)

Angiotensina IV (ANG IV)

Canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L (LVGCC)

Cinase cálcio-calmodulina tipo II (CAMK II)

Cinase reguladora de sinalização extracelular (ERK)

Complexo pós-sináptico 95 (PSD-95)

Condicionamento Aversivo ao Contexto (CAC) (CFC)

Corno de Amon 1 (CA1)

Corno de Amon 3 (CA3)

Depressão de Longa Duração (LTD)

Estimulo condicionado (EC)

Enzima Conversora de Angiotensina (ECA)

Fator de Transcrição kappa  $\beta$  (NF- $\kappa\beta$ )

Fator Neurotrófico derivado do Encéfalo (BDNF)

Hormônios adrenocorticotróficos (ACTH)

Hormônio Semelhante à Insulina Tipo II (IGF-II)

Potenciação de Longa Duração (LTP)

Proteína cinase A (PKA)

Proteínas cinases associadas Shank e Guanilato (GKAP)

Proteínas cinases ativados por mitógenos (MAPK)

Proteína cinase dependente de AMPc (PKA)

Proteína cinase dependente de cálcio (PKC)

Proteína cinase dependente de GMPc (PKG)

Proteína G inibitória (Gi)

Proteína ligante do elemento de resposta ao AMPc (CREB)

Receptor ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA)

Receptor N-metil-D-aspartato (NMDA)

Sistema Nervoso Periférico (SNP)

Sistema Renina-Angiotensina (SRA) (RAS)

## 1. INTRODUÇÃO

Podemos definir a “Memória” como o processo de aquisição, formação, conservação e evocação de informações (Izquierdo I, 2011). A aquisição é aquilo que conhecemos como aprendizado. Novos aprendizados podem, ou não, ser armazenados de forma permanente para depois serem utilizados no momento que o organismo requeira. A memória é uma das principais características biológicas comuns entre os diferentes seres vivos, no entanto, o conteúdo da memória depende exclusivamente da experiência do animal. No caso dos humanos, a memória, junto com as características genéticas e comportamentais, permite a formação do arcabouço essencial para a construção de uma personalidade.

Uma das áreas de vanguarda dentro da Neurociência é o estudo dos mecanismos fisiológicos e moleculares da memória. Uma das principais questões que dirigiu esses avanços foi onde e como as memórias são armazenadas. Entre 1882 e 1900 importantes estudos no campo da memória tentavam explicar como as informações recém adquiridas passam por um processo de estabilização para serem armazenadas permanentemente (Lechner et al., 1999). Esses trabalhos dariam origem à “Teoria da Consolidação”. Com mais de 100 anos desde a sua introdução formal na literatura científica, a Teoria da Consolidação proposta pelos alemães Muller e Pilzecker, estabeleceu os principais processos associados com o armazenamento e evocação de memórias (McGaugh, 2000). Como característica comum aos mais de 40 experimentos que foram realizados nessa época, a memória durante o processo de estabilização poderia sofrer interferências, por

exemplo, como produto de outro aprendizado. No entanto, as mesmas interferências após o período de “Consolidação” não tinham mais efeito (Lechner et al., 1999).

Os estudos baseados na Teoria da Consolidação continuaram seu caminho na mão de grandes pesquisadores da psicologia experimental, como o americano Carl Duncan, que usaria o choque eletro-convulsivo para estudar a fisiologia da memória em roedores (Duncan, 1949). De fato, os trabalhos de Duncan permitiriam refinar a janela temporal em que a memória é vulnerável a interferência após a aquisição. Além disso, foi pioneiro no estudo do fenômeno de amnésia retrógrada e anterógrada.

O panorama geral após o surgimento da Teoria da Consolidação era de um conceito com evidência experimental que permitia explicar parcialmente o processo de armazenamento da memória. No entanto, parecia que após a consolidação, as informações adquiridas poderiam permanecer fixas e pouco flexíveis. Essas evidências experimentais iam num sentido contrário às hipóteses paralelas provenientes da psicologia cognitiva, que tentavam explicar que existia um dinamismo natural na memória (Nader and Hardt, 2009; Hardt et al., 2010). Esse dinamismo só seria comprovado experimentalmente no ano 1968 pelo psicólogo experimental Donald Lewis. Usando o modelo do condicionamento aversivo em ratos, Lewis observou que o choque eletroconvulsivo após a reativação da memória (evocação de curta duração sem a presença do estímulo incondicionado), tinha novamente um efeito amnésico, como acontecia quando aplicado na janela de consolidação (James R. et al., 1968). Ou seja, a reativação poderia induzir a memória à um estado instável e vulnerável a interferências, parecido com aquele presente durante a consolidação da memória. Portanto, assim como ocorre na consolidação, a memória precisaria novamente de um período de estabilização

para perdurar após a sua reativação. Em 1979, Lewis publicou o artigo que resumia seus principais experimentos explicando a hipótese da “Memória Ativa” e “Memória Inativa”, na qual a memória após a reativação passava de um estado inativo para um estado ativo, onde é sensível a interferência. Com o tempo, essa memória se reestabiliza e entra num estado inativo, onde os tratamentos de interferência não teriam mais efeito (Lewis, 1979). Em conjunto, os achados de Lewis permitiram o surgimento do termo “Reconsolidação” para explicar esses fenômenos após a reativação.

No entanto, salvo algumas exceções, esse tema só ressurgiu em 2000, com os trabalhos de Karim Nader e Joseph Ledoux nos Estados Unidos. Esses estudos não somente resgataram a reconsolidação como um processo ativo da memória, mas também descreveram as estruturas encefálicas envolvidas, seus mecanismos moleculares e a função biológica do dito processo (Nader et al., 2000a;Nader et al., 2000b). Novos resultados com o uso de modernas técnicas farmacológicas e moleculares levaram a um incremento exponencial dos trabalhos sobre reconsolidação. Para se ter uma ideia, 67% da produção científica sobre esse tema foi desenvolvida durante o ano 2000 e 2011(Besnard et al., 2012).

Ainda existem muitas perguntas a serem respondidas no campo da Reconsolidação. Uma das questões pouco abordadas são os mecanismos endógenos/neuro-humorais que controlam o processo de desestabilização/estabilização da memória.

Adicionalmente, uma quantidade considerável de estudos procura entender as condições nas quais acontece a Reconsolidação e qual seria a sua função biológica (Riccio et al., 2006). No entanto, as abordagens são principalmente farmacológicas e invasivas, sem

usar metodologias que investiguem o processo de reconsolidação em condições naturais.

Tendo em conta a flexibilidade inerente à Reconsolidação e os poucos estudos sobre os processos endógenos que a modulam, investigamos como um estímulo natural durante a reativação poderia interagir com o conteúdo endógeno da memória presente durante a Reconsolidação. Além disso, buscamos identificar os mecanismos celulares e moleculares desses estados endógenos/neuro-humorais na Reconsolidação da memória.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Tipos de Memórias

A memória pode ser classificada de acordo com seu tempo de duração ou seu conteúdo (Izquierdo I, 2011).

Dentro do critério temporal, as informações que estão disponíveis por períodos muito curtos de tempo (segundos ou minutos) são classificadas como memória de trabalho. As memórias que são armazenadas por um tempo maior que a memória de trabalho, mas ainda por períodos curtos (minutos ou algumas horas) são chamadas de memória de curta duração. Por outro lado, aquelas que estão disponíveis durante um tempo maior (horas ou anos) podem ser classificadas como memórias de longa duração. Existe ainda mais uma classificação para aquelas memórias que podem durar décadas, como aquelas da nossa infância, essas memórias são chamadas de memórias remotas (Nadel et al., 2000).

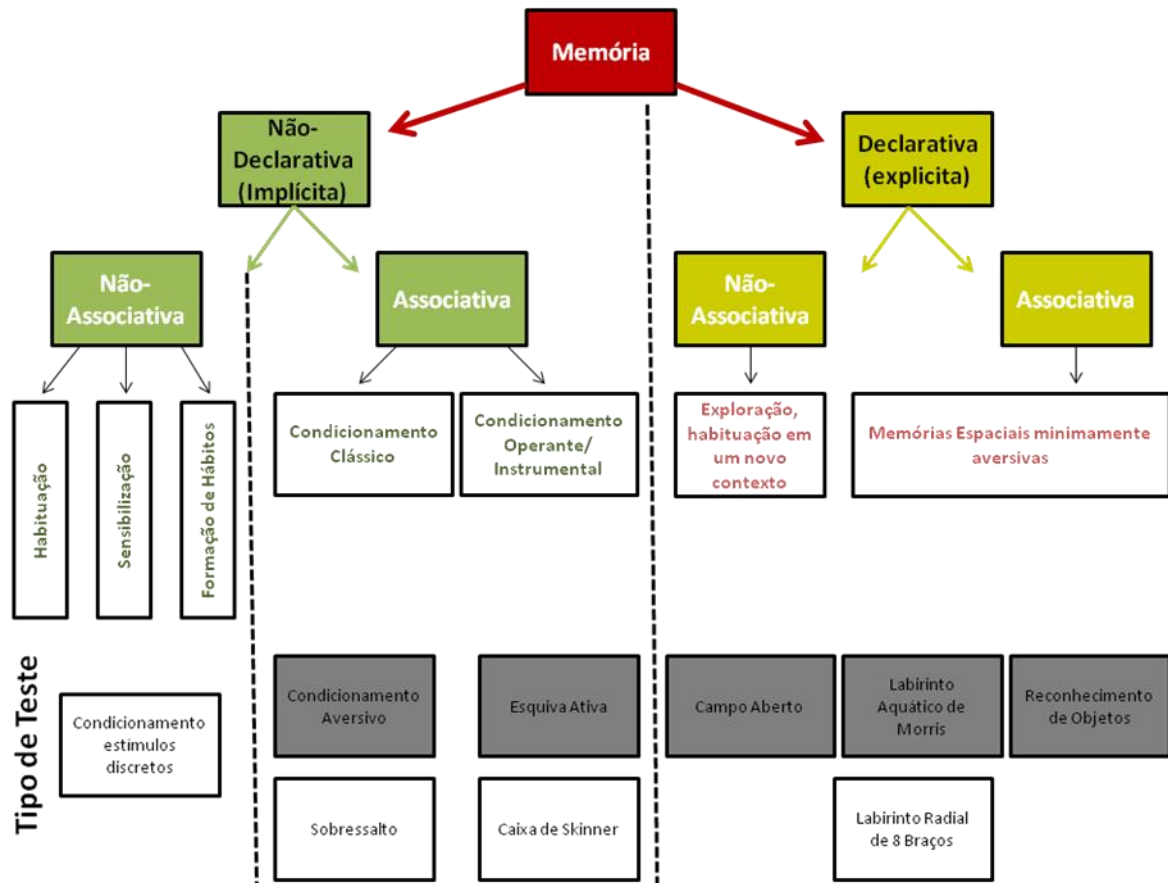
Dentro da classificação pelo conteúdo, podemos encontrar memórias associadas a eventos ou conhecimentos, essas memórias são chamadas de declarativas ou explícitas. Aquelas que registram fatos (onde você estava no dia dos atentados contra as torres gêmeas?) são denominadas memórias episódicas. Por outro lado, aquelas de conhecimentos (qual é a capital da França?) são chamadas memórias semânticas. Uma das características mais importantes das memórias declarativas, especificamente no caso dos humanos, é que podem ser verbalizadas. No caso de outros animais onde a informação não pode ser verbalizada, existem diferentes metodologias para avaliar a

existência da memória, por exemplo, modelos de memória episódica em ratos (Babb and Crystal, 2006;Crystal, 2009). Finalmente, podemos dizer que as memórias declarativas são conscientemente evocadas, ou seja, podemos centrar nossa atenção para recuperá-las.

Outros tipos de memórias são manifestadas por meio de comportamentos motores, denominadas de memórias procedurais ou implícitas. Em comparação com as memórias explícitas, as memórias de procedimentos são dificilmente verbalizadas e a sua avaliação é geralmente por meio da demonstração (é mais fácil demonstrar como conduzir um carro que falar como se conduz um carro). Dentro das memórias de procedimentos, podemos encontrar também hábitos e capacidades sensoriais como falar uma língua estrangeira de forma fluente. Esse tipo de memória não precisa de evocação consciente, ou seja, elas podem ser recuperadas sem a necessidade de prestar atenção nelas. Isso explicaria como é possível realizar atividades como nadar ou correr e pensar em outras coisas ou planejar o dia seguinte.

Na pesquisa com animais não-humanos, a classificação previamente mencionada pode ser difícil de aplicar, principalmente pela forma restrita que a memória pode ser avaliada em outras espécies. A figura 2.1 mostra essa classificação segundo a sua natureza associativa ou não associativa e alguns exemplos de modelos comportamentais em roedores para sua avaliação.





**Figura 2.1.**

Classificação da memória segundo a sua natureza associativa ou não associativa (Adaptado de Quillfeldt JA, 2006. Behavioral Methods to Study Learning and Memory in Rats, Em: Animal Models as Tools in Ethical Biomedical Research).

Neste trabalho centramos nossa atenção nos mecanismos associados com o processamento de memórias declarativas de longa duração.

## 2.2. Fases da Memória

A memória passa por três fases iniciais que podem ser divididas em aquisição, consolidação/armazenamento e evocação (Izquierdo I, 2011). Além das fases que encontramos entre a formação e evocação da memória, temos ainda outros caminhos que pode seguir a memória após seu armazenamento. Uma memória previamente

consolidada pode passar por um processo de esquecimento natural, onde a informação não estará mais disponível para a recuperação. Por outro lado, como produto de um novo aprendizado, a memória pode ser extinta. A extinção não significa esquecimento, mas sim uma inibição da memória original (Thompson, 1976; Bouton, 1993). Finalmente, evocações geralmente curtas podem induzir a reconsolidação, processo caracterizado pela desestabilização de uma memória previamente consolidada e posterior estabilização (Dudai and Eisenberg, 2004). Em comparação com a extinção, qualquer procedimento feito durante a reconsolidação vai afetar diretamente o traço original da memória. A inclusão da reconsolidação como uma fase ativa da memória foi recente, de fato ainda existem posições divididas sobre a existência ou não deste processo (McGaugh, 2004; Rodriguez-Ortiz and Bermudez-Rattoni, 2007).

A aquisição refere-se ao período de tempo entre a percepção de estímulos provenientes de uma experiência e o momento em que esses estímulos são codificados em uma forma de memória em particular. Um fator decisivo na formação da memória durante essa fase é o nível de atenção (Hamann, 2001). Quanto maior a atenção durante a aquisição, maior a probabilidade desse evento ser armazenado de forma permanente na memória (Kentros et al., 2004).

A consolidação é o processo pelo qual uma informação adquirida é estabilizada para ser armazenada como uma memória de longa duração. Esse processo é vulnerável a interferências tanto farmacológicas como comportamentais (Serota, 1971; Mah et al., 1972; Glaser et al., 2010). Adicionalmente, a consolidação pode ser modulada por fatores endógenos ou neurohormonais do animal, como o nível de estresse (McGaugh, 2006; Roozendaal et al., 2009). Existe uma grande relação entre o processo de

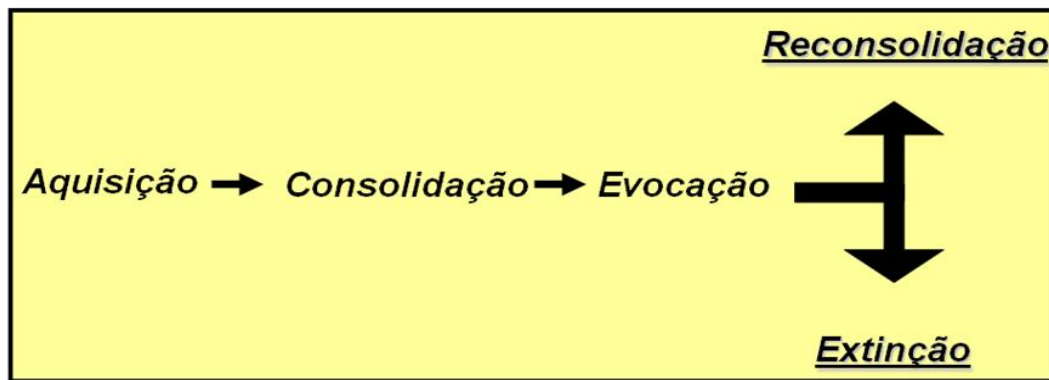
consolidação e a formação da memória de longa duração. Durante a consolidação ocorre uma série de processos metabólicos em diferentes estruturas encefálicas associadas com o armazenamento da memória, tal processo requer mais ou menos 6 h. No entanto, esses tempos sofrem algumas modificações dependendo da estrutura onde acontecem (Izquierdo et al., 1997). O tempo transcorrido entre a aquisição e estabilização de uma memória é conhecido como “Janela de Consolidação” e é o momento onde podemos fazer o maior número de análises sobre os mecanismos de formação da memória (Wallenstein et al., 2002; Berlese et al., 2005; Fulton et al., 2005; Klann and Sweatt, 2008).

Finalmente, quando a memória é consolidada, permanece em uma forma estável e dificilmente sensível a interferências (Ji et al., 2003). Quando uma informação armazenada não é utilizada, ela pode ser esquecida, priorizando o espaço para o armazenamento de novas informações.

Com a evocação, podem ocorrer dois processos paralelos que, metodologicamente, dependem do tempo de reativação da memória. Quando a evocação é prolongada em ausência das contingências aprendidas, a memória pode ser extinta (Ambroggi et al., 1993; Harris et al., 2000). Na verdade a extinção constitui um novo processo de aquisição, esta vez, de uma nova memória que pode inibir a evocação da primeira (Brooks and Bouton, 1993; Morgan et al., 2003). Para exemplificar este processo, podemos imaginar o que aconteceria com a exposição prolongada a um tom que foi previamente pareado com um choque. Inicialmente, o tom gerava uma resposta de medo no animal. Entretanto, com a exposição prolongada ao tom, o valor preditivo desse estímulo vai diminuindo até o ponto que não existe mais contingência entre o tom e o

choque. O novo aprendizado “tom não significa choque” vai inibir o primeiro “tom significa choque”, desse modo, a resposta de medo frente ao tom fica enfraquecida. É bem importante esclarecer que a extinção não significa esquecimento, e a memória de extinção pode co-existir com a memória original. Uma das formas clássicas de observar esse fenômeno é por meio da “recuperação espontânea”, onde alguns dias após a extinção a memória do primeiro aprendizado pode se expressar novamente (Brooks, 2000; Lubow and De la Casa, 2002; Quirk, 2002). No nosso exemplo seria a volta da memória “tom significa choque”.

Para concluir, temos ainda o processo de reconsolidação, associada com exposições curtas aos estímulos aprendidos. Dentro da literatura científica, essa exposição é chamada geralmente de “reativação”. Os experimentos com reconsolidação começaram com o Donald Lewis em 1968, mas a produção científica sobre o tema não foi significativa em anos posteriores. No ano 2000 o estudo da reconsolidação ressurgiu, com os mesmos princípios estabelecidos anos atrás pelo grupo do Lewis. A reconsolidação se fundamenta na desestabilização da memória após a reativação, deixando uma memória previamente consolidada lábil e vulnerável novamente a interferências (Nader and Einarsson, 2010). Os mecanismos da reconsolidação são muito semelhantes (mas não idênticos) àqueles presentes na consolidação (Alberini, 2005). Recentes estudos mostram que a labilização induzida pela reativação poderia ter um papel biológico importante para o organismo, tema que será abordado um pouco mais a frente. A Figura 2.2 mostra um esquema resumindo as diferentes fases da memória.



**Figura 2.2.**

Fases do processamento da memória.

Finalmente é importante ressaltar que as diferentes fases da memória não são lineares, ou seja, uma fase não é pré-requisito da seguinte. Um bom exemplo é a independência que existe entre memória de curta e longa duração. A memória de curta duração não necessariamente vai ser armazenada como uma memória de longa duração, assim como uma memória de longa duração, não necessariamente precisa ser expressa como uma memória de curta duração (Izquierdo et al., 1999; Medina et al., 1999; Vianna et al., 2000; Izquierdo et al., 2002).

### **2.3. Consolidação Sináptica da Memória**

O termo consolidação é usado na maior parte da literatura científica para descrever dois processos diferentes. O primeiro termo é conhecido como “Consolidação Sináptica”, e faz referência às mudanças moleculares que ocorrem no período imediatamente após o aprendizado e que se mantêm mais ou menos durante 6 horas (Izquierdo and Medina, 1997). Durante essa fase, são fortalecidas as sinapses que serão responsáveis pela manutenção da memória e tal fortalecimento pode ocorrer em mais de uma estrutura ao mesmo tempo (Izquierdo et al., 2006). Por outro lado, podemos encontrar o termo

“Consolidação Sistêmica”, associado a memórias dependentes do hipocampo (Dash et al., 2004). Nesse caso, o fortalecimento é de circuitos corticais onde a memória vai ser armazenada depois de um tempo de permanência no hipocampo (Wiltgen et al., 2004). Ou seja, a evocação da memória passa a ser dependente do córtex e independente do hipocampo. Neste trabalho focaremos nossa atenção na consolidação sináptica.

Uns dos grandes achados que permitiu aumentar o interesse pelos mecanismos de formação de memórias, foi a descoberta do processo eletrofisiológico conhecido como “Potenciação de Longa Duração” (LTP). A LTP consiste no aumento persistente da resposta de neurônios à breve estimulação repetida de um axônio ou um conjunto de axônios que fazem sinapses com elas (Napolitano et al., 1999). Essa estimulação também permite uma diminuição no limiar de excitabilidade da célula, permitindo que seja mais facilmente ativada. Um processo parecido, mas inibitório, também foi descoberto, a “Depressão de Longa Duração” ou LTD. Em comparação com a LTP, a LTD inibe a resposta neuronal (Stanton, 1996). Uma característica comum da LTP e LTD era que podiam ser medidas por horas, dias ou semanas. De fato, a duração dessas mudanças levou a conjecturar que existiria uma forte relação entre LTP-LTD e as memórias de longa duração (Teyler and Discenna, 1984).

Os mecanismos de LTP e LTD foram estudados principalmente no hipocampo, especificamente na via que comunica a região CA3 com CA1 (O'Mara et al., 2000). Com o tempo, a hipótese que a LTP e LTD eram a base eletrofisiológica e molecular das memórias de longa duração foi enfraquecida (Herry and Garcia, 2002), no entanto, os dois processos na região CA1 utilizam processos parecidos. Provavelmente o ponto de convergência mais claro entre LTP-LTD e as memórias de longa duração são as

mudanças estruturais e moleculares que ocorrem no nível celular em resposta a determinados estímulos, mudanças que conhecemos como “Plasticidade Sináptica” (Malleret et al., 2010).

Uma das ferramentas mais utilizadas historicamente para o estudo da memória é a farmacologia. A administração de agentes farmacológicos após o treino permitiu estudar a influência de certos compostos no processo de consolidação de uma tarefa (Izquierdo and McGaugh, 2000). Como resultado dessa metodologia, atualmente conhecemos uma boa parte das diferentes substâncias neurotransmissoras, receptores, cascatas metabólicas e sistemas moduladores que atuam na consolidação.

Um dos componentes moleculares mais estudados no processo de consolidação da memória é a ativação do receptor glutamatérgico ionotrópico do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), que permite o influxo de  $Ca^{++}$  na célula (Collingridge et al., 1992). O receptor NMDA é complexamente regulado por co-agonistas que permitem seu normal funcionamento além da ligação do seu agonista direto glutamato ou aspartato (Cotman et al., 1988). Entre os co-agonistas podemos encontrar a glicina e as poliaminas (espermina e espermidina) (Wood, 1995). O normal funcionamento do receptor NMDA depende da ligação conjunta da glicina e do glutamato (Albeni, 2007). Adicionalmente o receptor apresenta no seu interior sítios de ligação para o  $Mg^{++}$ ,  $Zn^{++}$  e  $H^+$ , que normalmente bloqueiam o canal (Liu and Zhang, 2000). Portanto, é necessária, além da ligação dos seus agonistas, a despolarização da membrana em torno do receptor para promover a sua ativação. Essa despolarização pode ser efetuada pela atividade de receptores ionotrópicos não-NMDA como o ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA) ou o receptor cainato (Isaac et al., 1999).

O influxo de cálcio pelo receptor NMDA modula sinalizações intracelulares que tem por objetivo ativar cinases dependentes de cálcio, entre elas, a proteína cinase dependente de cálcio (PKC) (Rosenegger and Lukowiak, 2010) e a cálcio-calmodulina cinase tipo II (CAMK II) (Wayman et al., 2011). A principal função dessas cinases é fosforilar diversos tipos de receptores e fatores de transcrição durante a janela de consolidação, permitindo mudanças na eficácia sináptica e, em último momento, o começo da transcrição protéica.

Diferentes cascatas podem ser ativadas simultaneamente na mesma sinapse e pela atividade de diferentes receptores, conseqüentemente, outras cinases também podem ter um papel importante no processo de consolidação. Por exemplo, a proteína cinase dependente de GMPc (PKG) (Ota et al., 2008), a proteína cinase dependente de AMPc (PKA) (Abel et al., 1997; Locatelli and Romano, 2005) e as proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK) (Schafe and LeDoux, 2000; Szapiro et al., 2003).

No nível nuclear, a fosforilação pode ser de proteínas que participam da síntese protéica, como a proteína CREB (Stevens, 1994; O'Connell et al., 2000). A consolidação da memória é dependente de síntese protéica e sua inibição pode bloquear a consolidação de novas memórias (Kida et al., 2002).

É importante ressaltar que os processos moleculares presentes durante a consolidação da memória não somente determinam se essa memória vai ou não ser armazenada como uma memória de longa duração, como também pode determinar a sua "Persistência". Experimentalmente, a persistência de uma memória vai depender de diferentes variáveis



como a intensidade do treino e o número de repetições. Essas variáveis geram ou não mudanças moleculares que permitem que a memória seja mais ou menos persistente. Atualmente sabemos que no caso de memórias aversivas, um sistema é ativado 12h após a aquisição da memória. Nesse sistema, a área tegmentar ventral, cujos axônios são dopaminérgicos, enervam a região CA1 do hipocampo (Rossato et al., 2009). Por meio da estimulação de receptores dopaminérgicos D1, geram uma rápida síntese do Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo (BDNF) e sua rápida liberação (Bekinschtein et al., 2008b). O BDNF permite o fortalecimento das sinapses hipocampais que participam do armazenamento da memória e promovem sua persistência por períodos de tempo mais longos (Bekinschtein et al., 2008a). Com a inibição desse sistema com antagonistas D1 ou o bloqueio da síntese de BDNF, a memória não vai persistir e a sua expressão só será observada durante dois ou três dias.

Recentemente, um estudo mostrou que a manipulação farmacológica fora da janela de consolidação poderia interferir com o armazenamento da memória por meio da inibição do hormônio semelhante à insulina tipo II (IGF-II) (Chen et al., 2011). Essas primeiras evidências poderiam ser uma porta para mudanças conceituais sobre o tempo da consolidação. No entanto, esses achados ainda precisam de replicação e pesquisas mais aprofundadas.

Contudo, o processo de consolidação pode ser reduzido às alterações morfológicas e metabólicas produzidas após a aquisição de novas informações que vão ser armazenadas na memória de longa duração, que por sua vez, podem determinar o quão persistente será a memória. Neste trabalho usaremos uma tarefa de Condicionamento Aversivo ao Contexto (CAC) que é dependente do hipocampo, região responsável pela consolidação

de memórias espaciais e onde são bem conhecidas as cascatas moleculares anteriormente mencionadas.

#### **2.4. Modulação Endógena da Memória**

Parece evidente no nosso dia a dia que novos aprendizados ou a recuperação de informações podem ser influenciados por fatores endógenos, como por exemplo, o nível de estresse. Além disso, também é possível perceber que alguns tipos de memórias são mais acessíveis para serem evocadas que outras. A questão de como fatores endógenos podem influenciar a consolidação da memória permitiu uma extensa pesquisa por mais de 30 anos em uma área conhecida como “Sistemas Moduladores da Memória” (Cahill and McGaugh, 1996).

O conceito de modulação do armazenamento da memória surgiu basicamente por três descobertas, algumas já mencionadas: 1) Memórias recentemente formadas são suscetíveis a influências após o aprendizado por um período limitado de tempo, 2) esses tratamentos após o aprendizado têm a capacidade de melhorar, inibir ou modular o armazenamento da memória dependendo das condições experimentais, e 3) tratamentos pós-treino, como a administração de adrenalina, modulam o armazenamento da memória, mas não agem diretamente nas estruturas responsáveis pelo seu armazenamento (Roozendaal and McGaugh, 2011). Com essas evidências foi proposta a existência de um sistema de modulação endógena que atua no processo de consolidação da memória, mas não faz parte da base neuronal de tal processo.

A modulação endógena da consolidação está baseada na influência hormonal ou neuro-humoral existente durante o treino ou na janela da consolidação que poderiam determinar a futura expressão da memória. Assim, a modulação endógena envolve dois aspectos principais: 1) Distinguir as memórias com maior carga emocional de outras, permitindo que sejam melhor armazenadas e 2) Sob algumas circunstâncias, acrescentar informação neuro-humoral ao conteúdo das memórias (Izquierdo I, 2011).

Durante a consolidação, o complexo basolateral da amígdala se mostra como a estrutura chave para facilitar o armazenamento de memórias aversivas de forma duradoura (Rubin et al., 2001; Holahan and White, 2004). A conexão direita entre amígdala e hipocampo parece ser o fundamento anatômico da modulação emocional da memória (Packard and Teather, 1998; Tsoury et al., 2008). Por sua vez, a amígdala depende da função de hormônios adrenais (McGaugh, 1985). A lesão da amígdala ou da estria terminal em animais bloqueia o efeito de fármacos e hormônios na memória (Introini-Collison et al., 1991; Roozendaal and McGaugh, 1997). Uma quantidade considerável de evidências também mostrou os efeitos moduladores da amígdala na memória por meio de sinapses colinérgicas, com fibras provenientes do núcleo basal de Meynert (Van der Zee and Luiten, 1999), e  $\beta$ -noradrenérgicas, provenientes do *locus coeruleus* (Dalmaz et al., 1993; Kroes et al., 2010). A ativação desses sistemas depende de variáveis como a atenção do indivíduo e a aversividade dos estímulos externos durante a experiência. Fibras serotoninérgicas e dopaminérgicas da amígdala que estão envolvidas na percepção da ansiedade também são parte dos sistemas moduladores (Strange et al., 2008), assim como fibras que liberam  $\beta$ -endorfina sobre as sinapses noradrenérgicas nos circuitos locais da amígdala (Izquierdo and Netto, 1985; McGaugh et al., 1986). Diferentes experimentos mostram que o papel modulador da amígdala na memória é

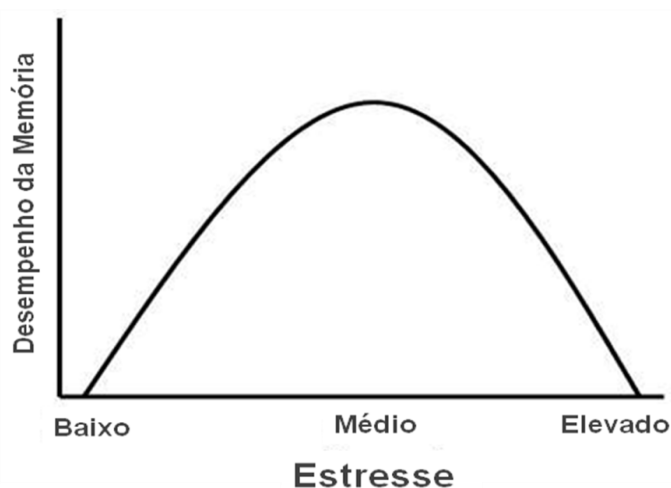
tempo-dependente (durante e imediatamente após o treino) e pode atuar em diferentes formas de memória (Brioni et al., 1989;McGaugh and Introini-Collison, 1987;McGaugh et al., 2002). Outras áreas encefálicas, como o sistema septo-hipocampal também pode modular a memória (Dashniani et al., 2009). De fato, a administração de agonistas GABAérgicos no septo medial impede o normal funcionamento da memória de trabalho em testes de memória espacial (Durkin, 1992).

Os sistemas de modulação endógena não são restritos a áreas encefálicas específicas. Um número considerável de estudos mostram que a liberação periférica de hormônios adrenérgicos (adrenomedulares) durante eventos emocionais modulam o armazenamento da memória, particularmente pela ação de receptores  $\beta$ -noradrenérgicas (McGaugh, 1985). Fármacos como o  $\beta$ -bloqueador propranolol, podem interferir com a consolidação de memórias emocionais (Strange et al., 2003; Strange and Dolan, 2004; Kroes et al., 2010).

Por outro lado, o efeito da administração sistêmica de glicose atua como uma curva em U invertida na consolidação de memórias aversivas (Messier and Destrade, 1988). O efeito da glicose na memória parece estar fortemente associado com a transmissão colinérgica central (Micheau et al., 1995). Ragozzino e colaboradores (1995) mostraram que a administração sistêmica ou intra-septal de glicose aumenta a liberação de acetilcolina no hipocampo gerando um efeito facilitatório na memória.

Outro sistema amplamente estudado na modulação da memória são os hormônios adrenocorticais. As pesquisas utilizam como metodologia a administração de diferentes doses desses hormônios ou protocolos de estresse agudo, médio ou crônico (Rozen daal

et al., 1996;de Quervain et al., 1998). Os adrenocorticóides agem em dois tipos de receptores, os mineralocorticóides (tipo I) e os glicocorticóides (tipo II). O tratamento com dexametasona em humanos tem efeitos deletérios em tarefas de memória declarativa (Plihal et al., 1999). Em modelos animais, a administração crônica de corticosterona em ratos ou o estresse crônico afetam o desempenho no labirinto aquático de Morris (Bodnoff et al., 1995). Como a glicose, os efeitos dos hormônios adrenocorticais seguem uma curva em U invertida (Martignoni et al., 1992). De fato, é o exemplo clássico para explicar os efeitos do estresse na memória. Níveis muito baixos ou elevados de estresse podem afetar a consolidação e evocação de memórias, um nível médio geralmente permite um bom desempenho (Kim and Haller, 2007) (ver Figura 2.3). O tratamento crônico e em altas doses de corticosterona pode induzir morte celular no hipocampo de ratos adultos, que por sua vez poderia estar relacionado com os efeitos adversos na memória gerados pelo estresse crônico (Sousa et al., 2000). Existem fortes evidências que o funcionamento do sistema adrenomédular mencionado anteriormente é dependente da atividade de hormônios adrenocorticais (Cahill and McGaugh, 1996). Porém, a relação entre os dois sistemas ainda não é bem entendida.



**Figura 2.3**

Desempenho da memória e a sua relação com o nível de estresse.

Outras substâncias neuromoduladoras importantes de ação central são a vasopressina (Dantzer et al., 1988; Faiman et al., 1992), a substância P (Costa et al., 2010), a colecistoquinina (Hebb et al., 2005) e a angiotensina II (Wright and Harding, 2004), para essa última dedicaremos a próxima seção.

A modulação endógena da memória parece ser iniciada por influência do Sistema Nervoso Periférico (SNP) sobre processos centrais. Evidências recentes mostram que os efeitos da epinefrina sobre a memória podem ser inibidos pela administração de sotalol, um antagonista  $\beta$ -adrenérgico que atua periféricamente (Introini-Collison et al., 1992). Da mesma forma, a estimulação elétrica do nervo vago imediatamente após um treino de esquivas ativa em ratos, melhora o desempenho na tarefa (Clark et al., 1995). Efeitos similares aos estudos com hormônios mostram uma curva em U invertida com o aumento da intensidade da estimulação.

Contudo, os sistemas de modulação endógena da memória mencionados anteriormente foram e são ainda os mais estudados. No entanto, existe uma complexa interação entre muitos hormônios e neuro-hormônios com o processo de armazenamento da memória que provavelmente ainda não estão estabelecidos. É importante mencionar que nesta seção demos ênfase nos mecanismos de modulação durante a consolidação da memória, mas esses sistemas também são amplamente estudados para outras fases da memória como a evocação (Concannon and Carr, 1982; Sara, 1985; Ilyutchenok and Dubrovina, 1995). O estado neuro-humoral presente durante a aquisição/consolidação e aqueles apresentados na evocação da memória precisa ser correspondente para uma adequada

recuperação da informação, esse fenômeno é conhecido como “Dependência de Estado” (Izquierdo I, 2011), e será explorado em outra seção do presente trabalho.

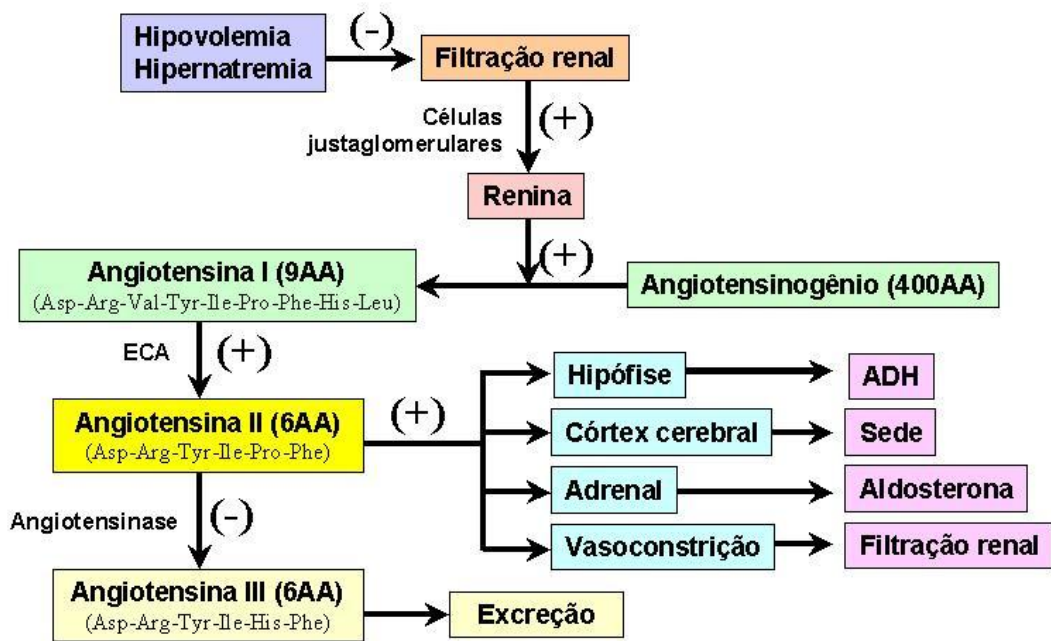
#### *2.4.1. Sistema Renina-Angiotensina e Memória*

O Sistema Renina-Angiotensina (SRA) regula um número considerável de funções fisiológicas como a regulação da pressão sanguínea (Pollock and Banks, 1991), níveis de sódio e água no corpo (Robillard et al., 1992), o ciclo de produção de hormônios reprodutivos (Bachmann et al., 1991), comportamento sexual e a liberação hormonal da glândula pituitária (Wright and Harding, 1992; Saavedra, 1992). Além disso, estudos sugerem que este sistema poderia ser crucial em processos de memória e aprendizado como regulador da aquisição, consolidação e evocação de memórias (Wright et al., 2002). O SRA é bastante conservado evolutivamente, sendo encontrado tanto em invertebrados como vertebrados com poucas modificações (Okuyama et al., 1988).

A produção de Angiotensina começa com a clivagem do angiotensinogênio, produzido no fígado, pela enzima renina (também conhecida como angiotensinase) liberada na circulação pelo aparelho justaglomerular do rim (Lever, 1989). Esse processo permite a síntese do decapeptídeo Angiotensina I (ANG I) que por sua vez, é clivada por outra enzima circulante chamada de Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) encontrada no endotélio vascular de diferentes órgãos (Jackson et al., 1991), principalmente na circulação pulmonar, permitindo a produção do octapeptídeo Angiotensina II (ANG II) (Figura 2.4).

A ANG II é considerada o composto mais ativo do SRA. Entre as suas funções se encontra a vasoconstrição por meio de receptores para ANG II no músculo liso ou pela estimulação da liberação de aldosterona provenientes do córtex adrenal (Ikram, 1996). Também está associada com a osmoregulação e a estimulação para beber líquidos em condições de restrição (Evered and Robinson, 1981). A ANG II atua em receptores do tipo AT1, AT2 e AT4, sendo o receptor AT1 o principal mediador nas funções do SRA (Zhuo et al., 1998). A interação da ANG II com o encéfalo pode ser por meio da lâmina terminal, entre o corpo caloso e o quiasma óptico, que carece de barreira hematoencefálica, no entanto, a síntese de ANG II não é restrita ao sistema periférico (Vinson et al., 1999). De fato, no encéfalo, neurônios mostram ter as enzimas necessárias para a produção de ANG II, a qual é liberada como co-transmissor em neurônios em diferentes estruturas encefálicas (von Bohlen und Albrecht, 2006). A ANG II pode ser convertida em Angiotensina III (ANG III) e posteriormente em Angiotensina IV (ANG IV) para depois ser degradada (Wright et al., 1995). A ANG I é considerada inativa e a ANG II e a ANG III são agonistas de alta afinidade dos receptores AT1 e AT2 (Phillips and Summers, 1998). A ANG IV tem baixa afinidade pelos receptores AT1 e AT2, mas uma alta afinidade e especificidade pelo receptor AT4 (von Bohlen und, 2003).





**Figura 2.4**

Síntese de Angiotensina e algumas das suas principais funções (Adaptado de Vieira R, 2003. Equilíbrio hidro-eletrolítico e ácido-básico, Em: Fundamentos de Bioquímica).

Tem sido demonstrado que a ANG II participa como modulador em processos de consolidação e evocação da memória. Fármacos usados para o controle da pressão arterial elevada como o Losartan (antagonista AT1) ou inibidores da ECA estão associados com melhoras cognitivas, particularmente em memória, em pacientes adultos com acidentes cérebro-vasculares (Ciobica et al., 2009).

A administração intracerebroventricular de ANG II imediatamente após o treino de uma tarefa de esquila inibitória em ratos tem um efeito facilitatório sobre a consolidação da memória (Georgiev et al., 1988). Efeitos facilitatórios também foram encontrados com a administração sistêmica de ANG II em caranguejos *Chasmagnathus* na consolidação de um CAC (Delorenzi et al., 1996). No entanto, a administração restrita à região CA1 do hipocampo de ANG II tem um efeito amnésico e dose dependente na esquila inibitória em ratos (Kerr et al., 2005a). Experimentos eletrofisiológicos têm mostrado

um efeito inibitório da ANG II na indução da LTD (Wright et al., 2002), resultado que poderia estar associado aos efeitos amnésicos na consolidação de tarefas emocionais e espaciais.

Em uma interessante série de experimentos, Frenkel e colaboradores (2010a) mostraram que o antagonista inespecífico Saralasin gerava um efeito de memória latente no *Chasmagnathus* durante a consolidação de uma memória aversiva. Nesse caso o efeito da Saralasin se mostrava como amnésico. No entanto, aumentos nos níveis de ANG II por meio de um estímulo natural (restrição de água) durante uma sessão de reativação, recuperava a memória e voltava a se expressar normalmente. No mesmo trabalho a ANG II foi proposta como um modulador da expressão, mas não do armazenamento, da memória de longa duração. Essa função moduladora na expressão da memória poderia explicar os resultados amnésicos parciais da ANG II na evocação. De fato, na tarefa de esquiva inibitória, o efeito amnésico da ANG II pré-teste não é perdurável e a memória é expressa normalmente em testes posteriores (Bonini et al., 2006).

Em condições fisiológicas, antagonistas de receptores AT1 como o Losartan, ou AT2 como o PD123319, não mostraram ter efeitos na consolidação e evocação da memória. No entanto o antagonista AT2 pode reverter os efeitos deletérios da administração local no hipocampo dorsal de ANG II (Kerr et al., 2005b). Foi sugerido que a ANG II poderia atuar pela ativação do fator de transcrição kappa  $\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ), importante durante o processo de consolidação da memória (Yeh et al., 2002).

Entretanto, a função da ANG II nos diferentes processos de memória ainda não é bem estabelecida, principalmente pelos resultados contraditórios mencionados anteriormente.

Porém, a maioria dos estudos mostra o SRA como um possível modulador da expressão da memória. Recentemente, a ANG II foi avaliada em modelos de reconsolidação com resultados que reforçam seu papel como modulador endógeno (Frenkel et al., 2005a).

#### *2.4.2. Dependência de Estado*

Um dos fenômenos mais interessantes e estudados dentro dos mecanismos endógenos que modulam a memória é a de “Dependência de Estado”. A dependência de estado pode ser definida como a correspondência existente entre o estado neuro-humoral presente durante a formação de uma memória e aquele presente durante a evocação (Overton, 1978). Quanto mais similaridade existir entre os dois estados, melhor será a evocação.

As memórias são adquiridas sob diferentes estados endógenos, que podem ser traduzidos em níveis ou concentrações de hormônios e substâncias neurotransmissoras como a dopamina, a noradrenalina, a serotonina e a beta endorfina (Izquierdo et al., 1988). O papel fundamental desses moduladores é facilitar a formação de memórias. Um desequilíbrio nesse estado endógeno poderia significar mudanças na forma na qual a memória é consolidada ou inclusive inibir a sua formação (Izquierdo et al., 1979).

É importante ressaltar que durante eventos emocionalmente significativos, aumenta a liberação de adrenalina e corticóides (Schelling, 2002). Esses, não apenas permitem uma melhor consolidação desses eventos, como também podem facilitar a evocação de outras experiências que foram adquiridas com o mesmo estado endógeno (Roosendaal, 2002). Uma forma simples de explicar o fenômeno é por meio dos estudos com

pacientes depressivos. Tem sido observado que pacientes depressivos que aprendem tarefas durante esses episódios, podem evocar melhor a informação quando estão novamente nesse mesmo estado (Wolf et al., 2004). Além disso, durante o episódio depressivo, eles têm uma tendência a recuperar um maior número de memórias associadas a eventos estressantes ou de acontecimentos negativos (Holland and Kensinger, 2010). Dessa forma, os pacientes depressivos aprendem sob um estado endógeno particular que pode ser necessário no futuro para evocar a memória satisfatoriamente. Sem dúvida, a dependência de estado representa uma função adaptativa bastante importante, permitindo que informações endógenas atuem como dicas internas para a evocação da memória. Distorções deste fenômeno podem ser encontradas em condições clínicas como o Transtorno de Pânico, onde estímulos internos podem gerar respostas de medo quando associadas a eventos aversivos (Jacobs and Nadel, 1999).

A correspondência neuro-humoral entre aquisição/consolidação e evocação poderia explicar o fenômeno de memória latente, encontrado com a Saralasin nos experimentos em caranguejos sobre o SRA e memória. Uma memória poderia ficar latente se os estímulos externos e neuro-humorais não são apresentados. Nesse caso a memória existe, mas não pode ser evocada por não se estabelecer a correspondência endógena.

Uma das tarefas mais usadas para o estudo da dependência de estado é a esquiiva inibitória. Nessa tarefa, o aprendizado induz mudanças neuro-humorais que vão ser persistentes no período pós-treino, e, conseqüentemente, modular o armazenamento da memória (Bracs et al., 1984;Ogren, 1986). Entre elas, estão a hipersecreção periférica de epinefrina e norepinefrina, aumento da liberação de dopamina, norepinefrina e  $\beta$ -

endorfina no encéfalo e a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (Bammer, 1982). Essas mudanças que atuam como moduladores da formação da memória têm sido menos estudados durante as sessões de teste. No entanto, acredita-se que são menores que aquelas que ocorrem pós-treino, mas reproduzem consideravelmente o estado neuro-humoral presente durante o aprendizado (Ahlers et al., 1991).

A administração sistêmica pré-treino de ACTH,  $\beta$ -endorfina ou epinefrina, facilita o armazenamento da memória de tarefas aversivas. No entanto, quando administradas pós-treino, de forma dose dependente, podem induzir um efeito amnésico. Quando a administração pós-treino é acompanhada pela administração pré-teste dos mesmos fármacos e nas mesmas doses, o efeito amnésico desaparece (Izquierdo, 1980; Izquierdo and Dias, 1983). Esses experimentos reproduzem fielmente o fenômeno de dependência de estado.

A dependência de estado tem sido estudada em diferentes sistemas de neurotransmissão, como o glutamatérgico (Sepehrizadeh et al., 2008), dopaminérgico (Zarrindast and Rezayof, 2004) e opióide (Homayoun et al., 2003). Além disso, a dependência de estado em tarefas aversivas parece envolver diferentes estruturas encefálicas como a amígdala (Rezayof et al., 2009), hipocampo (Rezayof et al., 2007a), área tegmental ventral (Darbandi et al., 2008) entre outras. Provavelmente, as mudanças neuro-humorais produzidas durante a formação da memória e posteriormente necessárias no teste, ocorrem em mais de uma estrutura simultaneamente.

É importante ressaltar que a dependência de estado não é um fenômeno exclusivo de memórias aversivas. De fato, podemos encontrar experimentos na literatura onde é avaliada a dependência de estado em tarefas espaciais como o Labirinto Aquático de Morris (Nakagawa et al., 1995).

Uma das ferramentas farmacológicas mais utilizadas no estudo da dependência de estado é a administração de agonistas opióides como a Morfina, tanto local como sistemicamente. Neste trabalho decidimos investigar o sistema opióide como possível indutor de dependência de estado sobre a reconsolidação da memória.

#### *2.4.2.1. Sistema Opióide e Memória*

Os fármacos opióides são geralmente usados na intervenção clínica de doenças como a dor crônica (Lipp, 1991). No entanto, estão associados ao desenvolvimento de tolerância e dependência (Kosten, 1990).

Os receptores para os opióides estão associados com a proteína G, sendo classificados em receptores  $\mu$ ,  $\delta$  e Kappa. O receptor ORL1 tem sido sugerido também na ligação dos opióides (Fawzi et al., 1997; Harrison et al., 1998).

A morfina liga-se ao receptor  $\mu$ , que por sua vez está acoplado a uma proteína G inibitória ( $G_i$ ), quando ativada, diminui a fosforilação induzida pelo AMPc. Também inibe canais de cálcio e conjuntamente, ativa canais de potássio favorecendo a hiperpolarização da célula (Wagner J. and Chavkin CI, 2002). Esse efeito inibitório se

mostra como o principal mecanismo para explicar os efeitos amnésicos da morfina sobre a consolidação da memória.

O sistema opióide tem sido sugerido como fundamental em processos de modulação da memória, principalmente em situações de estresse elevado como aqueles produzidos durante tarefas aversivas como a esQUIVA inibitória e o CAC (Izquierdo I, 2011). A administração pré ou pós-treino de agonistas opióides prejudica o armazenamento de memórias aversivas, enquanto a administração de antagonistas a favorece. No caso da administração de morfina pré ou pós-treino, o efeito amnésico pode ser revertido pela administração pré-teste da mesma dose de morfina ou de doses muito parecidas (Shiigi and Kaneto, 1990). O fenômeno de dependência de estado gerado pela Morfina é independente dos efeitos motores característicos dos agonistas opióides e da influência na ansiedade (Patti et al., 2006).

A dependência de estado causada pela morfina parece envolver o sistema glutamatérgico, uma vez que a administração de antagonistas do receptor NMDA na amígdala central, como o AP-5, bloqueia a indução do fenômeno (Ardjmand et al., 2011). Adicionalmente, outros estudos têm mostrado que o MK-801 potencializa o efeito amnésico gerado pela Morfina (Zarrindast et al., 2006a). A administração de morfina pode mudar a expressão da subunidade NR2B no sistema límbico e o córtex frontal, que poderia indicar que o fármaco atua diretamente na plasticidade neural (Johansson et al., 2010). Essas interações também se mostram importantes no fenômeno de dependência a opióides.

É importante mencionar que opióides endógenos participam naturalmente em diferentes fases da memória, entre eles podemos encontrar as endorfinas, encefalinas e a dinorfina. Esses peptídeos, como no caso da morfina, tem um efeito amnésico sobre a memória quando administrados pré ou pós-treino (Jafari et al., 2006). No entanto, esse efeito é revertido pela administração pré-teste nas mesmas doses, demonstrando sua função na dependência de estado endógena (Zarrindast et al., 2006c). Uma parte considerável do conhecimento sobre a função dos opióides endógenos na dependência de estado são produto de estudos usando a esquia inibitória e administrações locais na região CA1 do hipocampo (Houghoghi et al., 2009; Jafari-Sabet and Jannat-Dastjerdi, 2009).

Além da morfina, nicotina (Peters and McGee, 1982), cafeína (Kelemen and Creeley, 2003), canabinóides (Zarrindast et al., 2006b), etanol (Rezayof et al., 2007b), lítio (Zarrindast et al., 2007), muscimol (Jafari-Sabet and Jannat-Dastjerdi, 2009) e midazolam (Sanday et al., 2012) podem gerar dependência de estado em condições experimentais específicas. Neste trabalho também sugerimos a ANG II tanto produzida endogenamente, como quando administrada exogenamente, como indutor de dependência de estado por meio da reconsolidação da memória.

## **2.5. Reconsolidação da Memória**

Com o ressurgimento dos estudos sobre reconsolidação, com os trabalhos do Nader e LeDoux, uma nova porta se abria para a modificação de memórias fora da janela de consolidação por meio da evocação. Mais importante ainda, foi resgatada a natureza flexível da memória e estabelecido um novo paradigma que domina atualmente a pesquisa na área. Junto com as novas evidências da existência desse fenômeno,



surgiram diferentes perguntas: qual seria a função da reconsolidação? Que memórias teriam esta propriedade? Que mecanismos moleculares estavam associados ao processo e quais diferenças poderiam existir em relação com aqueles mostrados durante a consolidação? Com o tempo, uma boa parte dessas perguntas tem sido respondidas e outras ainda permanecem à espera. Nesta seção descreveremos as principais características da reconsolidação para depois centrar nossa atenção na sua possível função biológica.

### *2.5.1. Reconsolidação vs Extinção*

Uma questão metodológica importante da reconsolidação é saber quando a reativação, induzida geralmente pela apresentação do estímulo condicionado (EC), por exemplo o contexto no CAC ou um tom em condicionamentos aversivos a estímulos discretos, permitiria que a memória entrasse de fato no processo de reconsolidação e não em um de extinção (Inda et al., 2011). Essa distinção permite saber quando um tratamento farmacológico pode estar afetando o traço de memória original ou um novo traço paralelo produto da extinção. Diferentes abordagens comportamentais permitiram estabelecer que o tempo de reativação pode ser crucial para determinar o caminho que vai seguir a memória (Perez-Cuesta and Maldonado, 2009; Schiller and Johansen, 2009). Reativações curtas ativam mecanismos de degradação protéica associados com o processo chamado de “labilização” que permitiria a memória voltar para um estado lábil e suscetível a modificações, precisando posteriormente uma estabilização que seria a reconsolidação propriamente dita (Bevilaqua et al., 2008). No caso das reativações de longa duração, é gerado um processo de extinção que envolve um novo aprendizado que permite o estabelecimento de circuitos inibitórios que tem por função suprimir a

atividade da memória original (Izquierdo et al., 2004). Dessa forma, a memória da extinção é expressa no comportamento, mas coexiste com a memória aversiva prévia. Diferentes tempos são usados para as reativações de curta duração e os protocolos mudam de acordo com a padronização da reconsolidação em cada laboratório. No entanto existe consenso sobre algumas características da reconsolidação que são independentes do protocolo experimental. Tem sido demonstrado que o tempo de reativação para memórias remotas é maior que aqueles usados em memórias recentes (menos de 30 dias) (Frankland et al., 2006). De fato, esses tempos são mais similares com aqueles usados para induzir a extinção. Esse fenômeno parece estar associado com a dificuldade manifestada por memórias muito antigas para serem labilizadas, provavelmente por uma razão adaptativa: as memórias que perduram toda a vida (em humanos anos ou décadas, em ratos meses) poderiam ser muito importantes para o organismo e a sua estabilidade constante é favorecida.

Com tudo, os resultados mais esclarecedores que permitem diferenciar os processos de reconsolidação e extinção são produto de experimentos farmacológicos, principalmente mediante a infusão local ou sistêmica de inibidores de síntese protéica (Suzuki et al., 2004a). Contrário ao processo de extinção, tratamentos que visam inibir o processo de reconsolidação tem um efeito amnésico persistente (Duvarci and Nader, 2004). Ou seja, a memória não sofre recuperação espontânea ou renovação, resultado que permite concluir, que a modificação foi sobre o traço de memória original.

Adicionalmente, recentes estudos mostraram que existem mecanismos moleculares específicos que são ativados quando uma memória entra em processo de reconsolidação, ou quando começa se estabelecer a extinção. De la Fuente e colaboradores (2011)

encontraram que uma reativação de curta duração, que induz o processo de reconsolidação, aumenta a atividade do fator de transcrição NF- $\kappa$ B no hipocampo dorsal de camundongos. No entanto, com uma reativação de longa duração, que induz a extinção da memória, a calcineurina fosfatase inibe NF- $\kappa$ B. A administração de inibidores do NF- $\kappa$ B facilita a extinção.

### *2.5.2. A idade e força da memória*

Como mencionado anteriormente, memórias muito antigas podem ser resistentes aos protocolos que induzem a labilização da memória. Porém, memórias muito fortes podem ser também resistentes. Wang e colaboradores (2009), usando um condicionamento aversivo ao som, mostraram que uma característica das memórias fortes é a diminuição de receptores NMDA contendo a subunidade NR2B na amígdala. Essa diminuição poderia ocasionar numa perda da flexibilidade e plasticidade neural que não permitiria a modificação do circuito onde a memória foi armazenada. Dessa forma, a memória seria resistente à labilização. Como no caso de memórias antigas, memórias fortes poderiam ser muito importantes para o organismo, permitindo o estabelecimento de mecanismos para impedir sua modificação. Estudos têm mostrado que memórias fortes ou antigas poderiam ser labilizadas quando a reativação é concomitante com a presença de estímulos que representam novidade (Robinson et al., 2011). Finalmente, o fato de certos tipos de memórias não entrarem no processo de labilização poderia responder a pergunta se a reconsolidação é igual à evocação. Como foi mostrado acima, a evocação de uma memória pode ser independente da sua labilização. Memórias muito fortes ou antigas podem ser evocadas normalmente sem necessidade de serem reconsolidadas.

### *2.5.3. Aspectos Anátomo-Funcionais da reconsolidação da memória*

A amígdala tem sido amplamente estudada na aquisição, consolidação, evocação e reconsolidação de memórias aversivas, principalmente por meio de condicionamentos aversivos a estímulos discretos (Wang et al., 2005;Debiec et al., 2010;Agren et al., 2012). É bem estabelecido que a administração de bloqueadores de síntese protéica na amígdala basolateral pode inibir o processo de reconsolidação (Duvarci et al., 2008). No caso do CAC o mesmo resultado é produzido com a administração na região CA1 do hipocampo dorsal (Debiec et al., 2002). Em memórias de reconhecimentos de objetos, o hipocampo dorsal participa tanto da consolidação como da reconsolidação da tarefa (Rossato et al., 2007a). No entanto, padrões diferentes na sinalização da cinase reguladora de sinalização extracelular (ERK) são encontrados nos dois processos (Kelly et al., 2003a). No caso da esquivia inibitória, a administração de inibidores de síntese protéica no hipocampo parece afetar a consolidação, mas não a reconsolidação da memória (Cammарota et al., 2004). Em condicionamentos aversivos ao gosto, o córtex insular e amígdala parecem atuar diferencialmente durante a consolidação e reconsolidação da memória (Garcia-Delatorre et al., 2010).

### *2.5.4. Aspectos Neuroquímico-Farmacológicos da reconsolidação da memória*

Um número considerável de evidências mostram que molecularmente, a consolidação e a reconsolidação são processos parecidos, mas não idênticos. Baseado em estratégias de inibição com RNA antisense, tem sido demonstrado que a expressão do fator de

transcrição C/EBP $\beta$  no hipocampo é seletivo durante a aquisição ou reconsolidação da esquiiva inibitória (Milekic et al., 2007). Similarmente, a expressão de BDNF no hipocampo dorsal, mas não de Zif268, parece aumentar seletivamente durante a consolidação do CAC, durante a reconsolidação acontece ao contrário, sendo o Zif268 mais expresso (Lee, 2008). Usando a mesma tarefa de CAC, a inibição de Zif268 na amígdala prejudica a consolidação da memória (Yasoshima et al., 2006). Esses resultados sugerem que os mecanismos moleculares durante a consolidação e a reconsolidação podem ser eventos dissociados com características que mudam de acordo com a estrutura onde acontecem.

Um dos processos mais característicos da reconsolidação é a degradação protéica induzida pela reativação da memória. De fato, é o processo pelo qual a memória é desestabilizada. Essa degradação é dependente da via proteolítica ubiquitina-proteassoma (Kaang et al., 2009). Os níveis de proteína poliubiquitinilada aumentam após a reativação do CAC nos sinaptossomos, sinalizando a degradação protéica. Aproximadamente 6h após a reativação, os níveis de proteínas voltam para o estado basal, tempo que hipoteticamente coincide com o final da reconsolidação. Um dos alvos da degradação são as proteínas cinases associadas Shank e Guanilato (GKAP) que permitem a estabilidade do citoesqueleto celular. No entanto, as proteínas do complexo pós-sináptico 95 (PSD-95) que modulam a dinâmica de receptores na membrana não são degradadas (Kaang and Choi, 2011). A desestabilização da GKAP e preservação da PSD-95 apóiam a hipótese de uma reorganização das sinapses por meio da reativação, mas não a modificação ou desaparecimento total das mudanças previamente estabelecidas pelo aprendizado original.

Outra questão importante é se a reconsolidação precisa de síntese protéica no soma celular, ou a tradução de proteínas por meio de ARNm presente nos dendritos seria suficiente. Recentes resultados mostraram que a reconsolidação de memórias aversivas ativa preferencialmente a tradução de proteínas dendríticas (Mileusnic et al., 2005), esses resultados também foram apoiados por outro estudo que mostra que a estabilidade da memória após a reativação precisa de sínteses protéica, mas não de sínteses de ARNm (Parsons et al., 2006). Contudo, o papel principal da síntese de proteínas nos dendritos na reconsolidação ainda não está totalmente elucidado.

Fatores de transcrição (como a proteína ligante do elemento de resposta ao AMPc (CREB) ou o NF- $\kappa$ B) aumentam após a reativação da memória, e a sua inibição no hipocampo, na amígdala ou no córtex prefrontal pode prejudicar a reconsolidação em testes de condicionamento aversivo (Miller and Marshall, 2005; Tronson et al., 2012).

A fosforização dos diferentes fatores de transcrição é dependente de proteínas cinases. A ERK e a proteína cinase A (PKA), são de particular interesse pelos efeitos reguladores na transcrição da CREB e NF- $\kappa$ B (Tronson and Taylor, 2007). A ERK se mostra necessária na reconsolidação de memórias aversivas auditivas (Duvarci et al., 2005), reconhecimento de objetos (Kelly et al., 2003b) e condicionamentos de preferência de lugar (Girault et al., 2007). Por outro lado, a função da PKA parece restrita à reconsolidação de memórias aversivas auditivas e a sua inibição na amígdala basolateral gera a perda da memória. Efeito oposto é encontrado com ativadores da PKA que tem um efeito facilitatório no processo de reconsolidação (Tronson et al., 2006).

Dentro dos genes de ativação imediata, o Zif268 e o c-fos são ativados na amígdala e no núcleo accumbens após a reativação da memória do CAC (Hall et al., 2001). Na região CA1 do hipocampo, c-fos, JunB mas não c-Jun ou JunD, são ativados após a reativação a memória (Strekalova et al., 2003).

Outras proteínas como a citosina interleucina 1a sofrem uma diminuição entre 2 e 24h após o aprendizado do CAC, mas sua expressão aumenta 2h depois da evocação da tarefa, mostrando que atua em direções contrárias em diferentes fases da memória (Barnes et al., 2012). Mudanças no nível de subunidades de receptores, como a produzida pela endocitose da subunidade GLUR2 do receptor AMPA no hipocampo após a reativação, está associado com as fases iniciais do processo de reconsolidação (Jarome et al., 2012). Canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L (LVGCC) também têm sido implicados no processo de labilização (Suzuki et al., 2004b). De fato, a sua inibição com o fármaco nimodipina, impede tal processo e conseqüentemente a entrada da memória no estado ativo.

Atualmente temos um número considerável de estudos disponíveis na literatura sobre os mecanismos moleculares da reconsolidação e as principais estruturas onde ocorrem. No entanto, o conhecimento acerca de sua função biológica ainda é limitado. Esse tema será abordado na seguinte seção.

## **2.6. Função Biológica da Reconsolidação**

Três hipóteses sobre a função biológica da reconsolidação são predominantes: o fortalecimento, a manutenção da precisão e a atualização da memória. Em conjunto

representam perfeitamente a natureza flexível da memória e a oportunidade que a reconsolidação traz para a modificação de memórias previamente adquiridas. Neste trabalho, a hipótese da atualização será nosso foco.

### *2.6.1 Fortalecimento*

Nem sempre novos aprendizados são produto de apenas uma sessão de treino. Por exemplo, no Labirinto Aquático de Morris, a memória da localização da plataforma é formada pela exposição do animal a diferentes dias de treino. O conjunto das diferentes sessões permite que uma memória espacial seja formada. O aprendizado em cada sessão será mediado por um processo de consolidação? Em outras palavras, a tarefa é produto de varias consolidações ao longo do aprendizado? Algumas evidências têm mostrado que as diferentes sessões de aprendizado que compõem uma tarefa podem envolver mecanismos de consolidação, no entanto, existe outra possível explicação.

Jonathan Lee (2008) usando um CAC mostrou que o resultado final de dois dias de condicionamento é produzido por meio da reconsolidação. Durante uma segunda sessão de aprendizado, a memória proveniente da primeira sessão é labilizada, permitindo a incorporação de novas informações, nesse caso, fortalecendo a memória. A infusão de um antisense para Zif268 no hipocampo dorsal após o segundo aprendizado tem um efeito amnésico na memória, resultado que não é evidenciado com a infusão do antisense para BDNF. Se o segundo aprendizado é totalmente diferente, o aintisense para BDNF tem efeito amnésico. Como já mencionado, BDNF se mostra como um marcador de processos de consolidação e o Zif286 da reconsolidação. Finalmente, neste experimento fica claro que não somente a presença de novidade pode induzir a



labilização da memória, também outra sessão de aprendizado pode ser um estímulo suficientemente saliente para disparar o processo de reconsolidação. Esses achados representam uma nova forma de entender como as memórias podem ser fortalecidas por novas sessões de aprendizado e possíveis mecanismos que permitem a acumulação progressiva de conhecimentos.

### *2.6.2. Precisão*

Uma estratégia para evitar o esquecimento é a utilização ou evocação periódica de aquilo que aprendemos. Recentemente em nosso laboratório, foi sugerida que a reconsolidação seja um mecanismo para manter a precisão da memória. Uma característica da memória é a “generalização”, termo usado para descrever o processo pelo qual uma memória com o tempo vai perdendo os detalhes. Por exemplo, ainda poderíamos lembrar o que aconteceu em nosso aniversário passado, no entanto, a informação sobre o evento é incompleta. Provavelmente será difícil lembrar quem ligou para dar os parabéns ou quem estava presente durante a comemoração, dessa forma temos uma memória genérica do nosso aniversário, onde os detalhes são perdidos, mas a essência ainda existe. A generalização ocorre com mais força quando o tempo entre aquisição e evocação aumenta, de fato, está associada também ao processo de consolidação sistêmica. No momento que a memória deixa o hipocampo, os detalhes parecem que são perdidos. De Oliveira Alvares e colaboradores (2012) mostraram que diversas reativações entre o treino e o teste preveniam esse processo de generalização. De fato, as reativações periódicas permitiam que a memória continuasse dependente do hipocampo, resultados que ajudam entender como o processo de reconsolidação poderia

manter as memórias importantes detalhadas e a relevância da reativação na manutenção de informações armazenadas.

### *2.6.3. Atualização*

Nossos aprendizados podem estar baseados na modificação de aprendizados prévios, além disso, estamos em ambientes com permanentes mudanças onde memórias fixas seriam pouco favoráveis. Por exemplo, podemos ter um caminho determinado para chegar da casa ao nosso trabalho, se esse caminho é modificado, parece pouco prático fazer uma nova memória com essas mudanças juntas, nesse caso é mais eficiente simplesmente atualizar a memória prévia com as novas informações. Dessa forma o encéfalo simplifica o processo e evita a formação de memórias com informação repetida, utilizando um traço pré-existente.

Tem sido mostrado que a presença de novidade durante a reativação poderia ser o principal fator que induz a labilização da memória e posterior reconsolidação (Robinson et al., 2011). De fato, a maioria das metodologias avaliando a atualização estão baseadas na reativação e a simultânea apresentação de alguma informação nova que vai ser incorporada na memória (Kryukov, 2008).

Em um dos estudos mais representativos sobre a atualização, Lee (2010) mostrou que a apresentação de um choque durante a reativação de uma memória contextual, permitia atualizar o contexto com a informação aversiva e gerar um condicionamento aversivo contextual. Neste mesmo artigo, foi proposto o papel seletivo do Zif268 na reconsolidação e do BDNF na consolidação da memória. A inibição com antisense do

Zif268 no hipocampo dorsal, após a reativação da memória contextual, tinha um efeito amnésico, mas esse efeito não foi promovido pelo antisense para BDNF onde o choque atualizou a memória do contexto. Com esse resultado foi possível concluir parcialmente que o estabelecimento do condicionamento era por meio da atualização do traço contextual e mediante mecanismos de reconsolidação e não de consolidação.

Outra forma de atualização e com grandes implicações clínicas surgiu dos experimentos de Monfils e colaboradores (2009). Usando um condicionamento aversivo ao som, animais passaram por uma sessão de reativação com uma breve apresentação do estímulo condicionado (ES), 10min, 1h, 6h ou 24h após a reativação, os animais foram submetidos a um protocolo de extinção. Animais com extinção 10min e 1h após a reativação não apresentaram nem recuperação espontânea, nem renovação da resposta em testes subsequentes. Os resultados são interpretados como a atualização do traço da memória original com a informação da extinção. Em comparação, a extinção feita fora da janela de reconsolidação se comporta como uma nova memória e com o tempo a memória original do condicionamento volta se expressar. Esses resultados ainda não conseguiram ser replicados satisfatoriamente (Ishii et al., 2012). No entanto, protocolos similares em humanos mostrou resultados consistentes (Schiller et al., 2010; Oyarzun et al., 2012).

A atualização também foi demonstrada na tarefa de reconhecimentos de objetos, onde a reconsolidação só pode ser induzida pela apresentação de um estímulo novo durante a reativação (Rossato et al., 2007b). A administração intra-hipocampal de anisomicina não tem efeito quando a memória é reativada nas mesmas condições do treino. No entanto, na presença de um objeto familiar e um novo objeto, a memória é

desestabilizada e vulnerável aos efeitos da anisomicina. Neste caso a memória é desestabilizada para permitir a incorporação da informação proveniente do novo objeto. Estudos com outras tarefas espaciais também conseguiram mostrar a função da atualização por meio da reconsolidação (Rodriguez-Ortiz et al., 2008).

O papel da atualização em memórias remotas ainda não é conclusivo. Tse e colaboradores (Tse et al., 2007; Tse et al., 2011) tem estudado amplamente os “esquemas”, representações corticais de conhecimentos previamente adquiridos. Quando um novo aprendizado segue as mesmas regras de outros antigos, esse novo aprendizado pode ser incorporado nessas representações corticais muito mais rápido em comparação com um aprendizado totalmente novo. O novo aprendizado coerente com o conhecimento prévio é brevemente dependente do hipocampo. De fato, a lesão do hipocampo 48h depois do treinamento não interfere com a evocação. Esses estudos ainda não têm uma relação direta com a reconsolidação, no entanto poderia ser um bom modelo para estudar a atualização de memórias remotas em estruturas corticais, principalmente porque a incorporação de novas informações no esquema provavelmente envolve a labilização da memória. Além disso, emergem interessantes questões acerca da interação entre hipocampo e o córtex. Por exemplo, qual seria o efeito da infusão do Zif268 no hipocampo dorsal após o aprendizado que vai ser incorporado no esquema? Poderia inibir a incorporação da nova informação? Seriam então os esquemas produto da atualização por reconsolidação?

De forma geral, a maioria dos estudos que avaliam a atualização da memória usam novas informações para serem incorporadas e mudanças contextuais. Os trabalhos citados anteriormente de Lee e Monfils são os únicos que envolvem uma atualização

emocional da memória. Neste trabalho, decidimos investigar se estados internos ou neuro-humorais poderiam atualizar o conteúdo da memória. Um estado interno alterado durante a reativação cumpre o requisito de estímulo novo que pode induzir a labilização e a subsequente reconsolidação. Essa incorporação endógena de informações permitiria que, posteriormente na evocação, a presença do mesmo estado interno fosse, por exemplo, necessário para uma adequada recuperação.

#### *2.6.3.1. Atualização ou Novo Aprendizado?*

Uma das primeiras críticas, e ainda persistente, ao processo de atualização por reconsolidação, é se na verdade está acontecendo a incorporação de novas informações dentro de um traço de memória prévio, ou as informações novas poderiam ser associadas à primeira memória e gerar um condicionamento de segunda ordem (Moore and Roche, 2007). Para controlar esta variável, os pesquisadores usam diferentes ferramentas para mostrar que a atualização é mediada pela reconsolidação, entre elas, a nimodipina mencionada anteriormente. Quando a nimodipina é administrada antes da sessão de reativação, o animal consegue evocar normalmente a memória, mas impede a labilização, conseqüentemente não se observa atualização nenhuma. Foi verificado que a nimodipina não afeta a consolidação da memória, deixando aberta a oportunidade para que eventuais novos aprendizados sejam estabelecidos durante a reativação (Suzuki et al., 2004c). Outra possibilidade é infusão local do inibidor de proteossomos Clasto-Lactacistina- $\beta$ -lactona ( $\beta$ -lac) (Lee, 2010).

## 2.7. Modulação Endógena da Reconsolidação

É lógico pensar que igual que ao processo de consolidação, a reconsolidação da memória tem seus próprios mecanismos de modulação endógena, no entanto, são poucos os estudos que tem explorado essa área (Akirav and Maroun, 2012). Frenkel e colaboradores (Frenkel et al., 2005b) usando um modelo de CAC no *Chasmagnathus* mostraram que estímulos naturais podem influenciar a reconsolidação da memória. Nesse experimento, um episódio de restrição de água concomitante com a sessão de reativação pode fortalecer uma memória fraca. Tal fortalecimento foi mediado pelo aumento nos níveis de ANG II no encéfalo. Em estudos posteriores foi sugerida que a ANG II, como um possível modulador endógeno da memória durante o processo de consolidação e reconsolidação, poderia mudar as condições na qual a memória vai ser expressa no futuro (Frenkel et al., 2010b).

Tendo em conta os poucos estudos sobre os mecanismos de modulação endógena da reconsolidação, tentamos responder as seguintes perguntas: seria possível estabelecer uma dependência de estado por meio da reconsolidação? Um estado neuro-humoral alterado poderia atualizar o conteúdo endógeno da memória? Esse estado neuro-humoral alterado poderia ser induzido por meio de estímulos naturais como a restrição de água e também por tratamentos farmacológicos classicamente usados na dependência de estado?

## 3. OBJETIVOS

### 3.1. Objetivo Geral

O objetivo do trabalho foi investigar a modulação endógena da reconsolidação, induzindo estados neuro-humorais alterados durante a reativação por meio de um estímulo natural (restrição de água) ou através de uma ferramenta farmacológica clássica utilizada no estudo da dependência de estado (Morfina). Nos dois casos, baseamos nossos pressupostos na hipótese da atualização e a possibilidade de incorporar novas informações endógenas em uma memória previamente adquirida.

### 3.2. Objetivos Específicos

3.2.1. Estudar se uma memória proveniente do CAC pode ser atualizada com um estado endógeno induzido por uma restrição de água durante a reativação da memória.

3.2.2. Estudar se a possível atualização com o estado endógeno, induzida pela restrição de água, pode ser prevenida com a inibição da labilização da memória por meio da administração sistêmica pré- reativação de nimodipina.

3.2.3. Verificar se a infusão no hipocampo dorsal de ANG II imediatamente após a reativação da memória poderia mimetizar os efeitos da restrição de água.

3.2.4. Estudar se a possível atualização com o estado endógeno, induzida pela restrição de água, pode ser prevenida com a infusão no hipocampo dorsal do antagonista AT1 Losartan e/ou AT2 PD123319 de ANG II imediatamente após a reativação da memória.

3.2.5. Verificar o efeito da atualização com o estado endógeno, induzida pela restrição de água, em uma memória fraca.

3.2.6. Verificar se a possível atualização com o estado endógeno induzida pela restrição de água poderia permanecer como uma dica interna e promover a evocação da memória em um contexto novo.

3.2.7. Estudar se a administração sistêmica de morfina após a reativação poderia gerar uma dependência de estado por meio da atualização neuro-humoral da memória.

3.2.8. Estudar se a possível atualização induzida pela administração de morfina pode ser prevenida pela inibição da labilização da memória (através da administração sistêmica pré- reativação de nimodipina).



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Artigo

Os resultados que fazem parte dessa dissertação estão apresentados conforme o manuscrito submetido no periódico *Journal of Neuroscience* o dia 31 de Outubro de 2012.

**Title:** Reconsolidation may establish state-dependent memories

**Abbreviated title:** State dependent memory & Reconsolidation

**Author names** Rodrigo O. Sierra,<sup>1,2</sup> Lindsey F. Cassini,<sup>1,2</sup> Fabiana Santana,<sup>1,2</sup> Ana P. Crestani,<sup>1,2</sup> Johanna M. Duran,<sup>1,2</sup> Josué Haubrich,<sup>1,2</sup> Lucas de Oliveira Alvares,<sup>1,2,3</sup> and Jorge A. Quillfeldt,<sup>1,2,3</sup>

**Author affiliations:** <sup>1</sup>Psychobiology and Neurocomputing Lab, Biophysics Department, Biosciences Institute, 91.501-970, and <sup>2</sup>Graduate Program in Neuroscience, Institute of Health Sciences, 90.046-900, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

<sup>3</sup>The authors have equally contributed to this work.

**Corresponding author:** Jorge A. Quillfeldt or Lucas de Oliveira Alvares, Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação, Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43422, Sala 208, CEP 91.501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: quillfe@ufrgs.br or lucas\_alvares@yahoo.com.

**Number of pages:** 29

**Number of figures:** 5

**Number of words:** 189 (Abstract), 348 (Introduction) and 727 (Discussion).

**Conflict of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgments:** This research was supported by fellowships and grants from the CAPES (MEC) – including a PNPd fellowship for LOA –, CNPq (MCT), PROPESQ (UFRGS), and FINEP (“Rede Instituto Brasileiro de Neurociências,” IBN-Net, No. 01.06.0842-00). We acknowledge Zelma Regina V. de Almeida for her kind technical assistance and Flávia Zacouteguy, Fabrício Dutra, Querusche Zanona and Janete Anselmo Franci for the helpful contributions to this paper.

## **Abstract**

Some memories enter into a labile state after retrieval, requiring to be reconsolidated in order to persist. One functional role of memory reconsolidation is to update existing memories. Particular endogenous states that are concomitant with reconsolidation could influence the storage and future expression of memory. Here, we explored whether an endogenous process activated during a natural/physiological experience or pharmacological interventions can update memory content. Using the Contextual Fear Conditioning paradigm in rats, we found that endogenous content of memory can be updated during reconsolidation by natural events such as water deprivation, transforming a previous memory in a state-dependent memory. This updating is mediated by Angiotensin AT1 receptors activation in dorsal hippocampus. Furthermore, local infusion of human Angiotensin II (ANG II) mimics the water deprivation effects on memory reconsolidation. The property of endogenous update appears to be a general memory process, since systemic morphine injection reproduce the same effects obtained by water deprivation and local angiotensin II infusion on making a previously acquired memory state-dependent. These findings trigger new insights about the influence of daily life events on memory and extend the classical view of endogenous modulation of memory consolidation.

## Introduction

The classical idea that memories are immutable after consolidation has been challenged. A considerable amount of evidence has shown that consolidated memories can enter into a new label/unstable state after retrieval, during which they are again susceptible to pharmacological and behavioral disruption, requiring a later restabilization process known as reconsolidation (Duvarci and Nader, 2004). It has been suggested that the biological function of memory reconsolidation may serve a wider purpose than simply restabilizing memories previously destabilized during reactivation (Lee, 2010). Specifically, reconsolidation has been proposed to support memory strengthening (Lee, 2008), updating (Hupbach et al., 2008) and keeping memory precision (de Oliveira Alvares et al., 2012) .

Recent reports have shown that reconsolidation can be modulated by endogenous processes activated during natural events like water or sleep deprivation (Shi et al., 2011;Frenkel et al., 2005a). In the crab *Chasmagnathus sp*, concurrent water deprivation improves reconsolidation via endogenous angiotensin and strengthens memory expression (Frenkel et al., 2005b). In humans, a natural mild stressor like cold pressor concomitant with memory reactivation, improves long-term expression in a paradigm of declarative memory (Cocoz et al., 2011). These observations indicate that new endogenous information may interact with previously acquired memory during reconsolidation and open the debate about the influences of natural or real life events in reconsolidation processes.

The concept of endogenous modulation of memory has significantly influenced research about the neurobiological mechanisms underpinning memory storage and expression (Cahill and McGaugh, 1996). Particularly, the state-dependent memory phenomenon has allowed the establishment of the neurohumoral state influence in different stages of memory (Izquierdo, 1980). However, this type of endogenous modulation has not been studied in relation to reconsolidation. We hypothesized that reconsolidation can support endogenous neurohumoral updating of an established memory and induce the state-dependent phenomenon as demonstrated upon consolidation.

Here we evaluated whether a particular endogenous state induced by a natural condition or pharmacological treatments can update the memory content during reconsolidation and identify its neurobiological mechanisms. To address this question, we used water deprivation as natural condition or morphine injection in a reconsolidation protocol of Contextual Fear Conditioning in rats.

## Material and Methods

*Subjects.* Male adult Wistar rats (270-320 g) from our breeding colony were used. Animals were housed in plastic cages, four to five per cage, under a 12 h light/dark cycle and at a constant temperature of 24° C, with water and food *ad libitum* before starting the experimental protocols. All experiments were conducted in accordance to local guidelines for animal care and the project was approved by the University's Ethics Committee.

*Stereotaxic surgery and cannulae placement.* Rats were deeply anesthetized by an i.p. injection of ketamine/xylazine (75 and 10 mg/Kg, respectively) and bilaterally implanted with 27-gauge guide cannulae aimed at AP 24.2 mm (from bregma), LL  $\pm$ 3.0 mm, DV 1.8 mm, positioned just 1.0 mm above the CA1 area of the dorsal hippocampus (Paxinos and Watson, 1998). After a 1-week recovery from surgery, animals were submitted to the behavioral procedures. Following the behavioral experiments, subjects were sacrificed and their brains dissected and preserved in 10% formaldehyde to verify for cannula position. Only animals with correct cannula placements were included in the statistical analysis.

*Drugs.* L-type voltage-gated calcium channels (LVGCCs) antagonist nimodipine and morphine sulfate from Sigma-Aldrich, were dissolved in sterile isotonic saline with 8% dimethylsulfoxide (DMSO) to a concentration of 16mg/kg/ml and 7.5mg/kg/ml respectively and injected subcutaneously (s.c.). Losartan (200 $\mu$ M), PD123319 (200 $\mu$ M) and human Angiotensin II (0.5nmol/side) from Sigma-Aldrich were dissolved in 0.1% DMSO (pH 7.2) and infused locally in the CA1 region of the dorsal hippocampus.

*Intrahippocampal infusion.* At the time of infusion, a 30-gauge infusion needle was fitted into guide cannulae, with its tip protruding 1.0 mm beyond the guide cannula end and aimed at the pyramidal cell layer of CA1 of the dorsal hippocampus. A volume of 0.5  $\mu$ l was bilaterally infused at a slow rate (20  $\mu$ l/h) and the needle was removed only after another additional 30 sec.

*Behavioral procedure.* Each experiment consisted of four phases: conditioning, reactivation, test 1 and test 2 as described below:

Contextual Fear Conditioning (CFC): The conditioning chamber consisted of an illuminated Plexiglas box, 25x25 cm, with a metallic grid floor (Context A). During training, rats were placed in the chamber for 3 min, received 2 foot shocks (0.7 or 0.4 mA 2 sec) separated by a 30 sec interval, and 60 sec after last shock they were placed back into their home cages.

Reactivation session: Subjects were reexposed to the Context A without footshocks during 180 sec for inducing memory retrieval.

For the experiments investigating the effects of natural events during memory reconsolidation, the experimental group was reactivated under a previously 18 h of water deprivation. This deprivation was maintained during 6 h after memory reactivation (Fig. 1a). Control group was not deprived. Depending on the experiment performed, nimodipine was s.c injected 30 min before the memory reactivation session.



For the experiments investigating the effects of intrahippocampal Angiotensin II infusion on memory reconsolidation, animals were infused with human Angiotensin II or vehicle immediately after memory reactivation.

For the experiment investigating the effects of intrahippocampal infusion of Angiotensin II antagonists in animals under a water deprivation condition, the same water deprivation protocol was used but, immediately after memory reactivation, deprivation groups were infused with Losartan, PD 123319 or vehicle. Control groups were infused with the same drugs without water deprivation.

For the experiment investigating the effects of morphine injection on memory reconsolidation, animals were s.c injected with morphine or vehicle immediately after memory reactivation.

Test 1: Animals were tested for 4 min in either context A or a novel context on day 4 depending on the experiment performed. In the experiments with water deprivation, both experimental and control groups were evaluated without deprivation. Experiments with intrahippocampal human Angiotensin II or systemic injection of morphine, experimental and control groups were injected with vehicle 15 or 40 min pre-test respectively.

Test 2: Animals were tested for 4 min in either context A or a novel context on day 5, depending on the experiment performed. In the experiments with water deprivation, groups reactivated with deprivation were tested with a new water deprivation state. The time of deprivation was similar to the reactivation session. Control groups were tested

under the same conditions of test 1 (without deprivation). Animals with intrahippocampal human Angiotensin II or systemic injection of morphine during reactivation received the same drug 15 or 40 min pre-test, respectively. Control groups were tested with pre-test injection of vehicle.

Open Field Test (OF): The OF chamber consisted in a 50 cm high, 60×40 cm plywood box with a frontal glass wall and a linoleum floor divided in 12 equal rectangles. Animals were exposed for 3min and the number of crossings between sectors was registered. Crossings was considered a measure of motor performance.

*Statistical analysis.* For between or within-group comparisons was applied Repeated Measures ANOVA followed of Fisher post-hoc test. In experiments without reactivation session, test in a novel context and OF test, independent *t*-test was applied for between group comparison and paired *t*-test for within-group comparisons when necessary. Significance was set at  $P < 0.05$ .

## Results

### **Water deprivation concomitant with memory reactivation can update the endogenous memory content through reconsolidation**

To study the updating of memory content by water deprivation, rats were submitted to CFC task and 48 h after training the memory was reactivated under water deprivation state. Twenty-four hours later, animals were tested without water deprivation (test 1) and retested 24h after under a new water deprivation state (test 2) (Fig. 1a). Repeated measures ANOVA revealed significant effects of time ( $F_{2,38} = 6.965$ ,  $p = 0.002$ ) and group x time interaction ( $F_{2,38} = 5.017$ ,  $p = 0.011$ ). Post-hoc analyses showed that the water deprivation group expressed less freezing levels when compared with the control group during test 1 ( $p < 0.05$ ). Additionally, water deprivation group expressed less freezing during test 1 when compared with reactivation session ( $p < 0.001$ ) and test 2 ( $p < 0.001$ ) (Fig. 2a). This suggests that the information of water deprivation after memory reactivation was incorporated into memory content and consequently, the presence of this endogenous information became necessary for adequate memory retrieval. These results are consistent with the state-dependent memory phenomenon. Some reports have shown that the presence of neurohumoral and hormonal changes that occur during or after training can be necessary during retrieval (Izquierdo and Dias, 1983a). Then, it may generate a consistent endogenous state between memory acquisition/consolidation and retrieval sessions (Izquierdo and Dias, 1983b). Here, this consistent endogenous state was established between reconsolidation and the memory retrieval sessions.

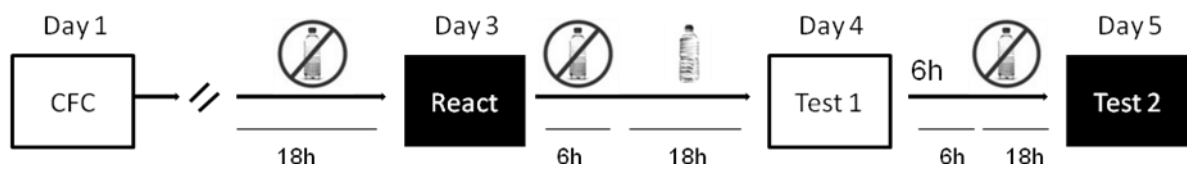
Then, we asked whether the water deprivation effect was dependent of memory reactivation. No effect of water deprivation protocol was found if the reactivation

session is omitted between the groups (control group x water deprivation) in test 1 ( $p = 0.615$ , independent  $t$ -test) and test 2 ( $p = 0.391$ , independent  $t$ -test) (Fig. 2b). These results suggest that the reactivation session is necessary for the incorporation of new endogenous information on a previous memory.

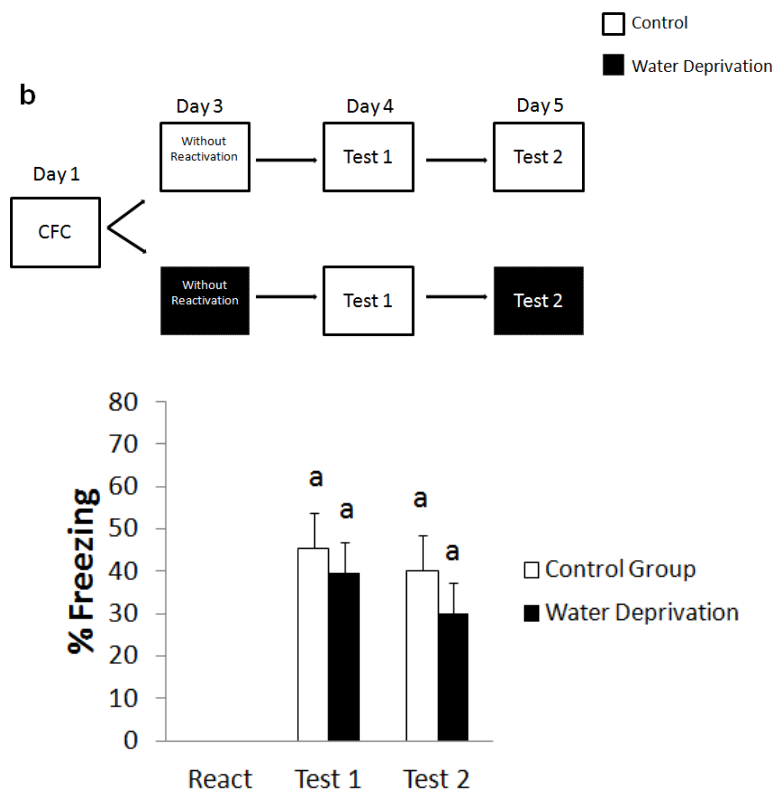
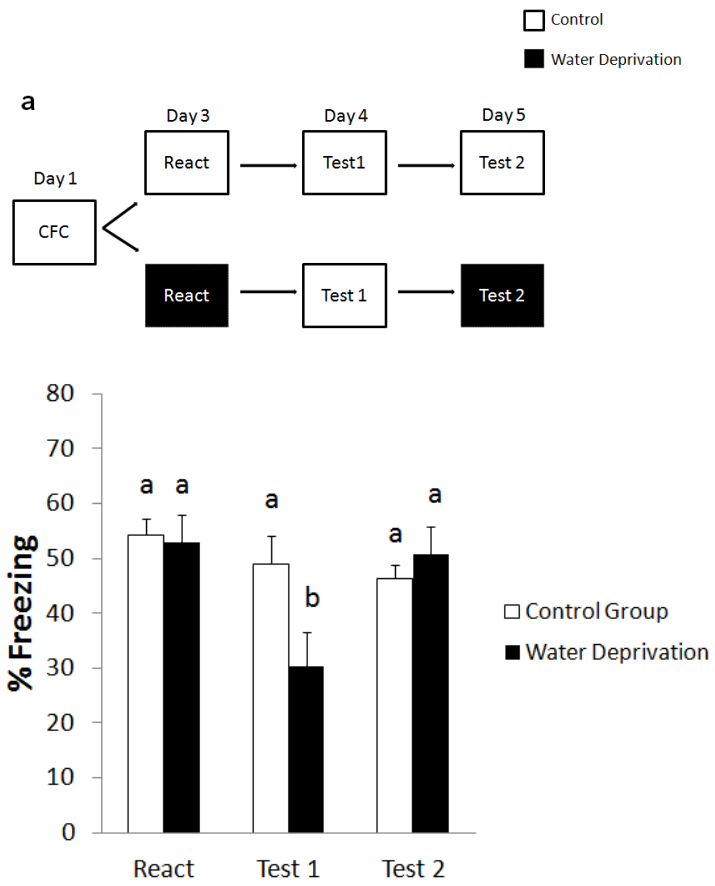
If the water deprivation effect on memory reactivation is mediated by reconsolidation process, then the inhibition of memory labilization should prevent this result. To address this question, nimodipine was subcutaneously injected 30 min before memory reactivation. Nimodipine prevents labilization of a reactivated memory during retrieval, without affecting memory retrieval or storage (Suzuki et al., 2004). Repeated measures ANOVA revealed significant effects of group x time interaction ( $F_{2,64} = 7.961$ ,  $p = 0.000$ ). Post-hoc analyses showed that the water deprivation group injected with vehicle expressed less freezing levels when compared with the deprivation group injected with nimodipine during test 1 ( $p < 0.05$ ). Similarly, water deprivation group injected with vehicle expressed less freezing when compared with control group injected with vehicle ( $p < 0.05$ ) in test 1. Additionally, water deprivation group injected with vehicle expressed less freezing during test 1 when compared with reactivation ( $p < 0.01$ ) and test 2 session ( $p < 0.01$ ) (Fig. 2c). These results confirm that the endogenous memory update with water deprivation is mediated by the labilization/reconsolidation process.

No effect in motor performance was found between groups in animals with 18h of water deprivation before the open field test ( $p = 0.697$ , independent  $t$ -test) (Fig. 2d), showing that our water deprivation protocol has no effects in motor performance.

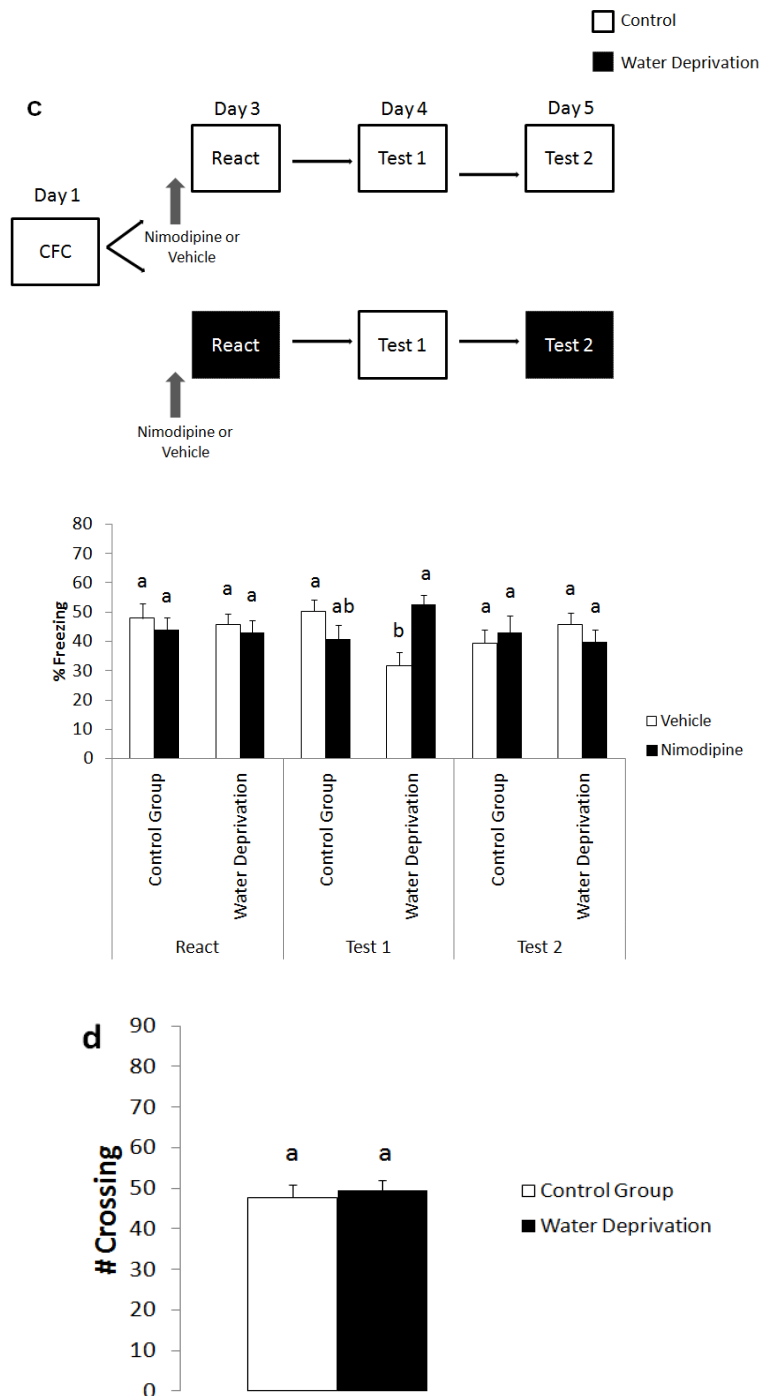
In our knowledge, this is the first evidence that an endogenous state can be incorporated into a previously acquired memory during retrieval through reconsolidation mechanisms. This memory is then turned into a state-dependent memory with the endogenous state acting as an internal cue.



**Figure 1. Schematic Design of water deprivation protocol.** Experimental group was water deprived during 18h previously to memory reactivation session. Six hours after reactivation, the water was available. In the test 1, animals were evaluated without water deprivation. Six hours after test 1, animals were again water deprived. In the test 2, animals were evaluated under water deprivation state. Control group was not water deprived in any session of the experiment.



Legenda na próxima página



**Figure 2. Endogenous memory content can be updated during reconsolidation by natural events.**

Graphs show percent of freezing time, expressed as mean  $\pm$  SEM. Open field graph show crossing number. The experimental design is shown in the top of each panel. **a**, Water deprivation group shows a significant decrease of memory expression during test 1, this phenomenon is reverted by a new water deprivation event during test 2. **b**, Omitting the reactivation session, water deprivation has no effect. **c**, Nimodipine injection before reactivation prevents the water deprivation effect on memory reconsolidation. **d**, Water deprivation during 18h has no effects in motor performance. Means with different letters (a or b) are significantly different ( $p < 0.05$ ) from each other.  $n = 6-11$  per group.

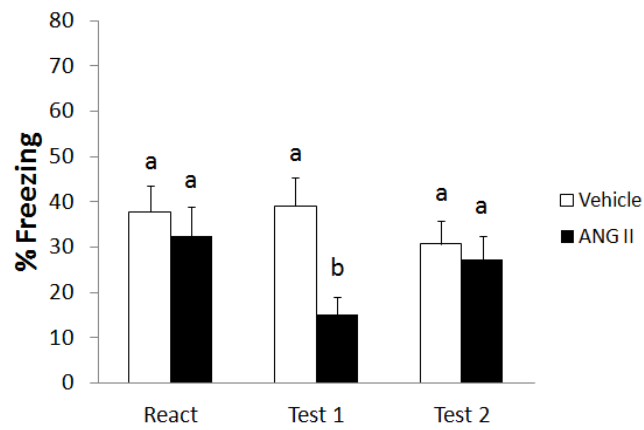
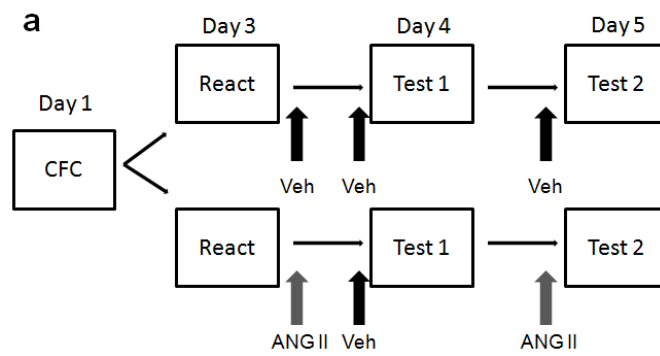


## **Angiotensin II and AT1 receptor in dorsal hippocampus mediates the effects of water deprivation during memory reconsolidation**

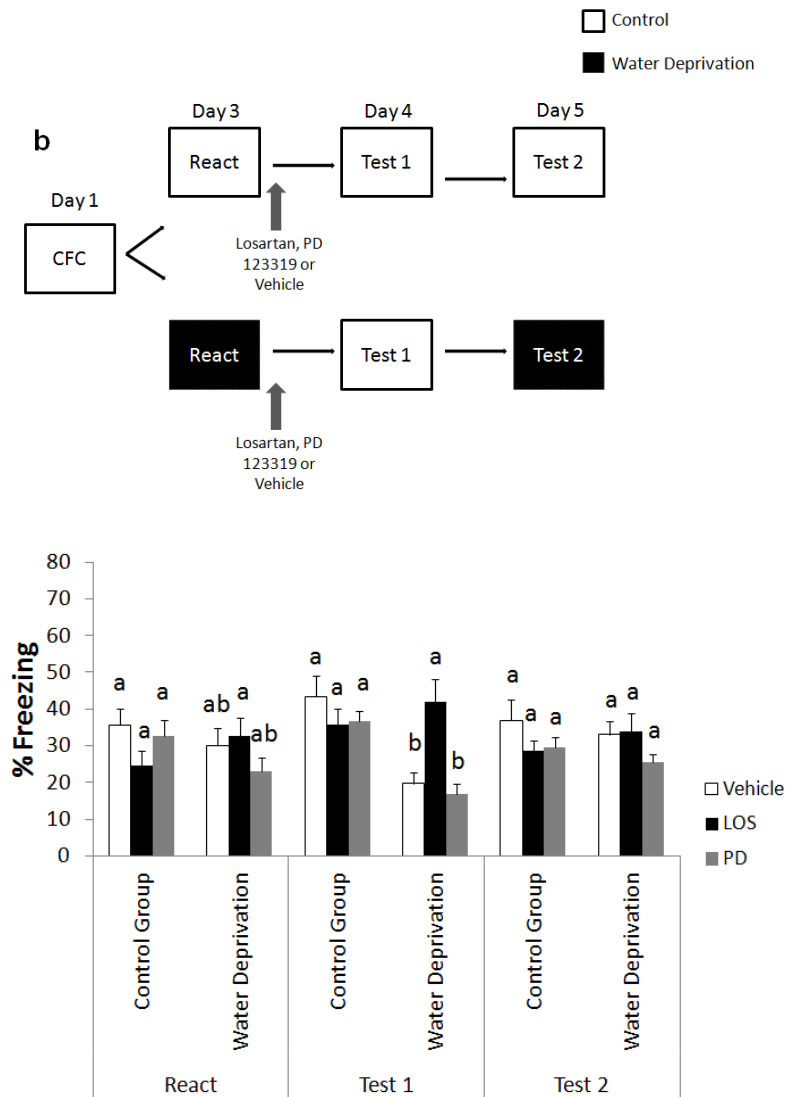
Central renin-angiotensin system (RAS) plays an important role in osmoregulatory and dipsogenic systems (Hazon et al., 1989). The RAS is involved in learning and memory, but the actual role of angiotensin II (ANG II) in this process remains unclear. Dorsal hippocampus shows high levels of ANG II and different AT receptor subtypes (Haas et al., 1980). A recent study has shown that the ANG II plays an important role in the future memory expression by acting on consolidation and reconsolidation in crabs (Frenkel et al., 2005). We hypothesized that the water deprivation effects on memory reconsolidation could be associated with the increase of Angiotensin II levels in dorsal hippocampus. Then, we would expect that the local infusion of ANG II could be sufficient to undergo a state-dependent memory. To address this question, rats were conditioned as previously described and injected with ANG II after memory reactivation. The treated group received vehicle 15 min before the test 1 and ANG II 15 min before the test 2. Control group received vehicle in all sessions of the experiment. Repeated measures ANOVA revealed significant effect of group x time interaction ( $F_{2,32} = 3.567, p = 0.039$ ). Post-hoc analyses indicated that the ANG II group expressed less freezing levels when compared with the vehicle during test 1 ( $p < 0.05$ ), as found before with a water deprivation protocol. Additionally, ANG II group expressed less freezing during test 1 when compared with reactivation session ( $p < 0.01$ ) and test 2 ( $p < 0.05$ ) (Fig. 3a). These results confirm our hypothesis that the effect of water deprivation during memory reactivation can be supported by the increased ANG II levels in dorsal hippocampus.

To test in which receptor would be responsible for the water deprivation effect on memory reconsolidation, we infused the antagonist of either AT1 or AT2 receptor in the dorsal hippocampus. Rats were submitted to CFC and deprivation protocol as described above. After memory reactivation, either the antagonist of AT1 receptors Losartan, the antagonist of AT2 receptors PD 123319 or vehicle were infused into dorsal hippocampus. Test 1 was performed without water deprivation and test 2 under deprivation state. Control group was not deprived in any session. Repeated measures ANOVA revealed significant effects of group x drug interaction ( $F_{2,43} = 3.463$ ,  $p = 0.040$ ), time ( $F_{2,86} = 23.188$ ,  $p = 0.000$ ), group x time interaction ( $F_{2,86} = 8.067$ ,  $p = 0.000$ ), time x drug interaction ( $F_{4,86} = 3.123$ ,  $p = 0.018$ ) and time x group x drug interaction ( $F_{4,86} = 2.753$ ,  $p = 0.033$ ). Post-hoc analyses showed that animals with water deprivation infused with vehicle ( $p < 0.05$ ) and water deprivation infused with PD 123319 ( $p < 0.01$ ) expressed less freezing levels when compared with the deprivation group infused with Losartan during test 1. Similarly, water deprivation group infused with vehicle expressed less freezing when compared with control group infused with vehicle ( $p < 0.01$ ). The water deprivation group infused with PD 123319 expressed less freezing levels when compared with control group infused with PD 123319 ( $p < 0.05$ ). Additionally, water deprivation group infused with vehicle expressed less freezing during test 1 when compared with test 2 session ( $p < 0.001$ ) but not when compared with reactivation session ( $p = 0.465$ ). The same pattern was shown by the group with water deprivation infused with PD 123319, expressing less freezing during test 1 when compared with test 2 session ( $p < 0.05$ ) but not when compared with reactivation session ( $p = 0.946$ ). The water deprivation group infused with Losartan expressed less freezing during reactivation when compared with test 1 ( $p < 0.001$ ) and test 2 ( $p < 0.05$ ).

Taken together, these results show that (i) ANG II infusion in the hippocampus is sufficient to promote the water deprivation effect, inducing a state-dependent memory; and (ii) such effect is mediated by the AT1 receptors.



Legenda na próxima página



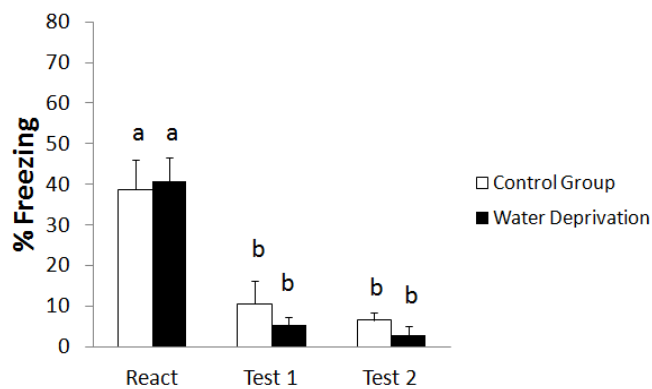
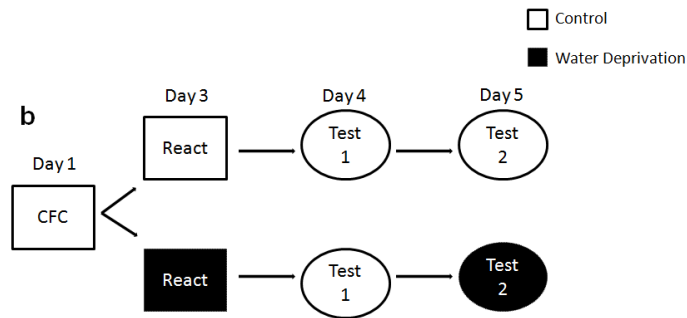
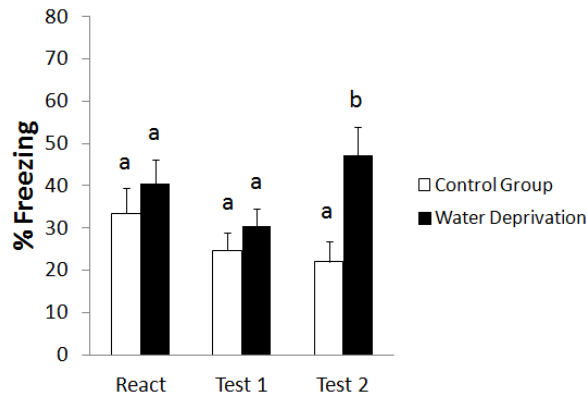
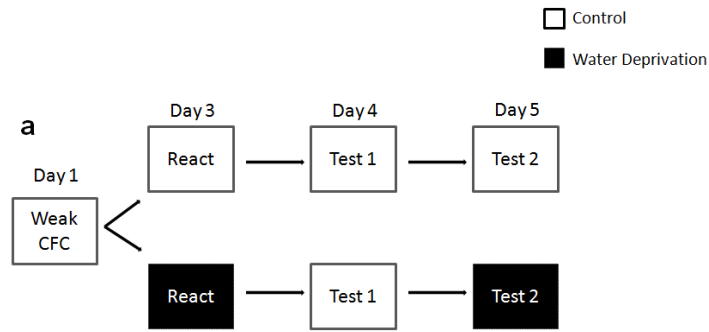
**Figure 3. Angiotensin II and AT1 receptor in dorsal hippocampus mediates the endogenous updating.** All graphs show percent of freezing time, expressed as mean  $\pm$  SEM. The experimental design is shown in the top of each panel. **a**, ANG II mimics the water deprivation effects on memory reconsolidation. **b**, The antagonist of ANG II Losartan reverts the water deprivation effect on memory reconsolidation. Means with different letters (a or b) are significantly different ( $p < 0.05$ ) from each other.  $n = 7-10$  per group.

**Water deprivation as internal cue strengthens the expression of a weak memory, but is not sufficient to induce memory retrieval in a novel context**

Previous studies have postulated that interoceptive cues experienced under a given drug or hormonal state might act as contextual cue for retrieval (Spear, 1978; Riccio and Concannon, 1981). This conception was consistently confirmed in classical experiment of state-dependent memory (Bormann and Overton, 1993). If the water deprivation event works like an internal cue during memory retrieval, this information could enhance the expression of a weak memory and/or induce retrieval in a novel context after memory reconsolidation. In order to evaluate these possibilities, two experiments were performed. First, rats were submitted to a weak protocol of CFC (0.4 mA) and 48 h after, reactivated under water deprivation condition and tested as described above. Repeated measures ANOVA revealed significant effect of group x time interaction ( $F_{2,32} = 3.904, p = 0.030$ ). Post-hoc analyses showed that the control group expressed less freezing levels in test 2 when compared with the water deprivation group ( $p < 0.05$ ). Additionally, water deprivation group expressed less freezing during test 1 when compared with test 2 ( $p < 0.01$ ) (Fig. 4a). This result suggests that water deprivation state may act like an internal cue during memory retrieval, enhancing the expression of a state-dependent weak memory.

In the second experiment, rats were submitted to CFC (0.7 mA) on water deprivation protocol. Training and reactivation were performed in the same context and tests

sessions in a novel context. Control groups were not deprived in any sessions of the experiment. No significant difference was detected in reactivation session ( $p = 0.837$ , independent  $t$ -test), test 1 ( $p = 0.382$ , independent  $t$ -test) and test 2 ( $p = 0.246$ , independent  $t$ -test) (Fig 4b). This result shows that the endogenous information as internal cue is not sufficient to induce memory retrieval in a novel context by itself.



**Figure 4. Water deprivation as internal cue strengthens the expression of a weak memory.** All graphs show percent of freezing time, expressed as mean  $\pm$  SEM. The experimental design is shown in the top of each panel. **a**, Water deprivation group in a weak CFC training shows a increase of memory expression during test 2. **b**, No water deprivation effect is verified when test sessions are performed in a novel context. Means with different letters (a or b) are significantly different ( $p < 0.05$ ) from each other.  $n = 7-9$  per group.



## **Endogenous state induced by systemic injection of morphine can update the memory content during reconsolidation**

To assess whether the memory update induced by water deprivation is a general memory property, we used a different approach to verify if it would render similar results on memory reconsolidation. Classically, the state-dependent memory has been evaluated with the pre or post-acquisition injection of different pharmacological agents and posteriorly, with the pre-test administration of the same drug (Khavandgar et al., 2002a; Homayoun et al., 2003; Rezayof et al., 2008; Jafari-Sabet and Jannat-Dastjerdi, 2009; Sanday et al., 2012). It is well known that either post-training (Zarrindast et al., 2007) or pre-test (Colpaert et al., 2001) injection of morphine impair memory. However, if morphine is injected in both post training and pre test, there is no memory impairment (Rezayof et al., 2009). This phenomenon is known as morphine state-dependent learning (Nishimura et al., 1990; Khavandgar et al., 2002).

If previous existing memory can be transformed in a state-dependent memory through reconsolidation, we predicted that morphine administration after reactivation would establish the state-dependent phenomenon between reconsolidation and retrieval. To explore this prediction, rats were submitted to the same conditioning procedure, but they received morphine (s.c.) injection immediately after reactivation. Animals were tested with vehicle injected 40 min pre-test 1 and morphine injected 40 min pre-test 2. Control groups received vehicle in all sessions of the experiment. Repeated measures ANOVA revealed significant effects of time ( $F_{2,36} = 5.524, p = 0.008$ ) and time x drug interaction ( $F_{2,36} = 13.607, p = 0.000$ ). Post-hoc analyses showed that morphine group

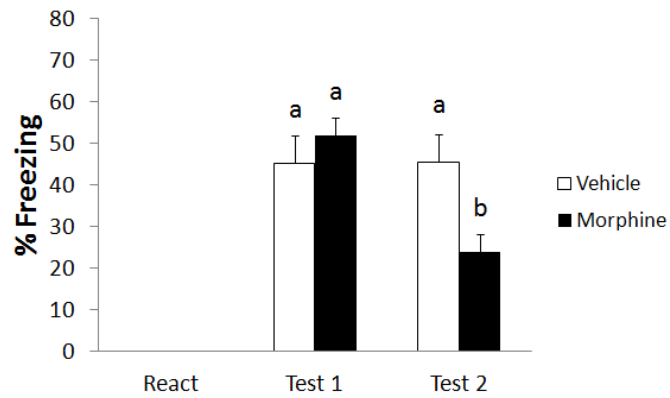
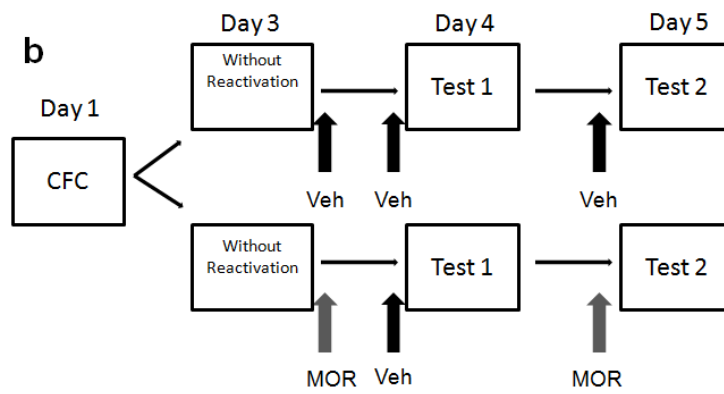
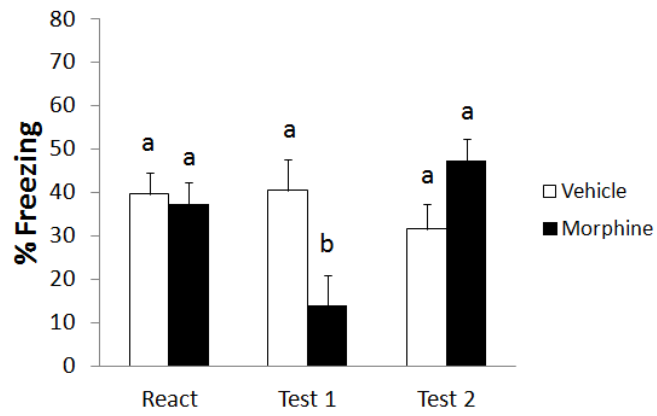
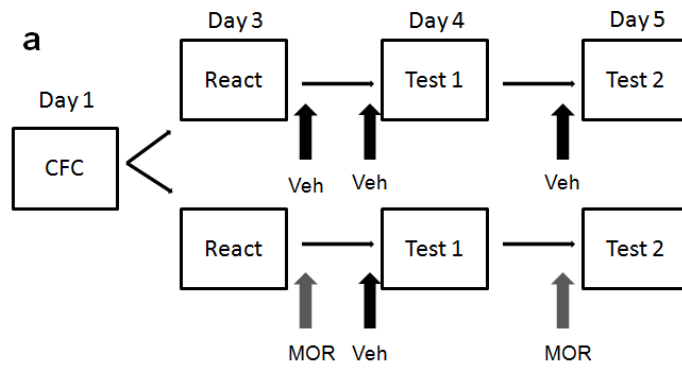
expressed less freezing levels when compared with the vehicle group in test 1 ( $p < 0.05$ ). Additionally, morphine group expressed less freezing when compared with reactivation session ( $p < 0.001$ ) and test 2 session ( $p < 0.001$ ) (Fig. 5a). In accordance with our previous results upon water deprivation or ANG II infusion, we found similar state-dependent effect induced by memory reconsolidation using an exogenous procedure, suggesting that this endogenous updating is a general memory process.

If the reactivation session is omitted, no significant difference was found during test 1 ( $p = 0.512$ , independent  $t$ -test), but the pre-test injection of morphine in test 2 showed the amnesic effect on memory retrieval ( $p = 0.021$ , independent  $t$ -test) (Fig. 5b).

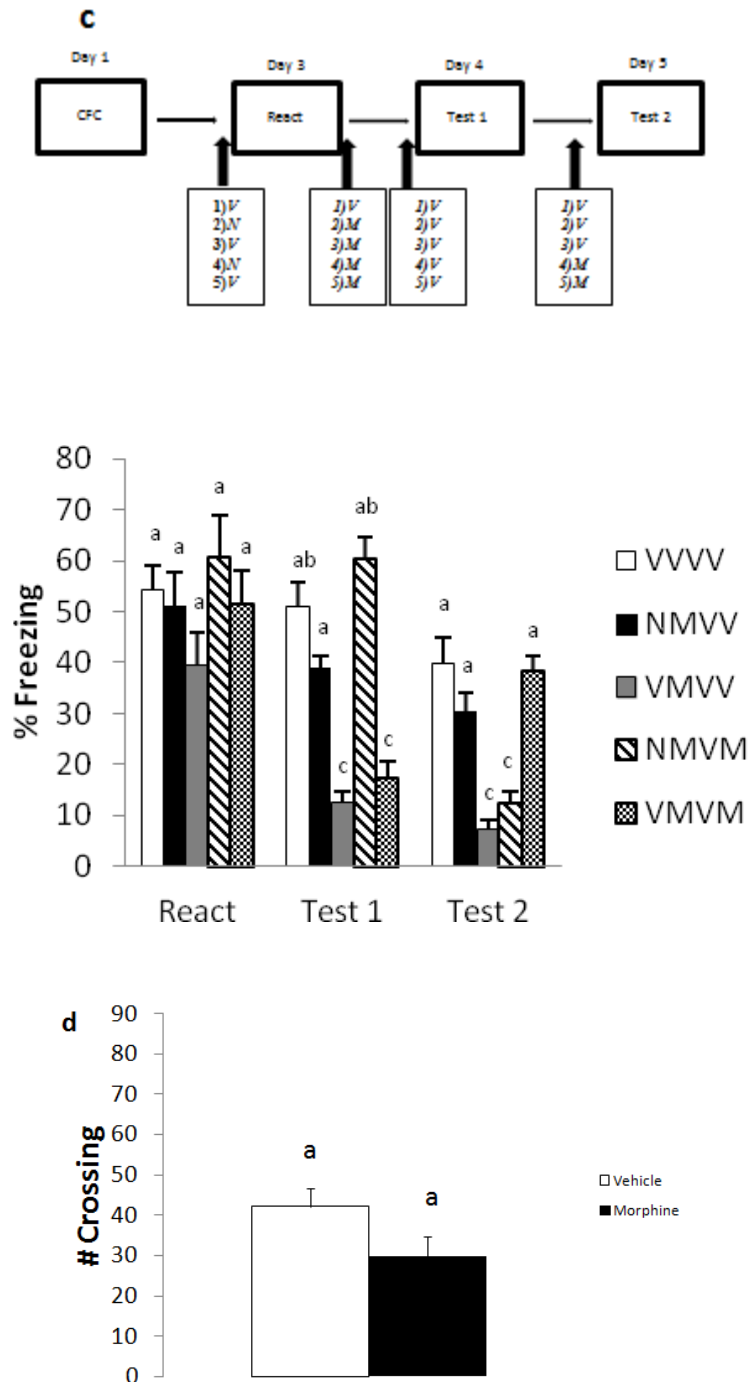
To confirm that the morphine state-dependent memory effect was mediated by the reconsolidation process, we used the same protocol described above, but injecting nimodipine (s.c.) 30 min before memory reactivation. Animals were divided in five groups: nimodipine pre-reactivation, morphine post-reactivation and vehicle pre-test 1 and 2 (NMVV); vehicle pre-reactivation, morphine post-reactivation and vehicle pre-test 1 and 2 (VMVV); nimodipine pre-reactivation, morphine post-reactivation, vehicle pre-test 1 and morphine pre-test 2 (NMVM); vehicle pre-reactivation, morphine post-reactivation, vehicle pre-test 1 and morphine pre-test 2 (VMVM); finally a totally control group that received vehicle in all sessions of the experiment (VVVV). Repeated measures ANOVA revealed significant effects of treatment ( $F_{(4,40)} = 11.535$ ,  $p = 0.000$ ), time ( $F_{(2,80)} = 46.034$ ,  $p = 0.000$ ) and time x treatment ( $F_{(8,80)} = 9.658$ ,  $p = 0.000$ ). Post-hoc test showed that VMVV and VMVM groups expressed less freezing levels when compared with all other groups during test 1 ( $p < 0.05$ ). Additionally, NMVV expressed less freezing levels when compared with NMVM group ( $p < 0.05$ ). During test 2, VMVM and NMVM groups expressed less freezing levels when compared with all other groups ( $p < 0.05$ ). The VMVV group expressed less freezing levels during test 1

and test 2 when compared with reactivation session ( $p < 0.001$ ). The NMVM group expressed less freezing levels during test 2 ( $p < 0.001$ ) when compared with test 1, but not comparing with the reactivation session ( $p > 0.05$ ). The group VMVM expressed less freezing levels during test 1 when compared with test 2 ( $p < 0.001$ ) and reactivation session ( $p < 0.001$ ) (Fig. 5c). As described in our previous experiments, nimodipine prevented memory labilization and consequently the endogenous updating. In addition, we reproduced the state-dependent phenomenon and the amnestic pre-test morphine administration reported in other studies (Khajehpour et al., 2008). These results confirm that endogenous updating with morphine is dependent of memory reconsolidation.

No difference was found between morphine and control group in motor performance ( $p = 0.088$ , independent  $t$ -test) (Fig. 5d), showing that our results cannot be attributed by any motor effect.



Legenda na próxima página



**Figure 5. Systemic morphine injection can also induce endogenous updating.** Graphs show percent of freezing time, expressed as mean  $\pm$  SEM. Open field graph show crossing number. The experimental design is shown in the top of each panel. **a**, Morphine injection after memory reactivation impairs memory retrieval during test 1. This phenomenon is reverted with the injection of the same doses of morphine before testing 2. **b**, Omitting the reactivation session, morphine impairs memory retrieval during test 2. **c**, Nimodipine injection before memory reactivation prevents the impairment of morphine on memory reconsolidation and the state-dependent phenomenon. **d**, Systemic morphine injection has no effects in motor performance. Means with different letters (a, b or c) are significantly different ( $p < 0.05$ ) from each other. V; vehicle, N; nimodipine, M; morphine.  $n = 7-10$  per group.

## **Discussion**

Our data shows that the endogenous memory content can be updated during reconsolidation by natural events, turning it into a state-dependent memory (Figure 2). In a water deprivation state, the updating appears to be associated with the increase of ANG II levels and AT1 receptors signaling in dorsal hippocampus (Figure 3). The internal state generated by water deprivation is incorporated as an endogenous cue that can modulate the memory expression in different ways. In the case of a weak memory, the endogenous updating strengthens memory expression in the presence of this internal state. However, the endogenous state alone is not sufficient to promote memory retrieval by itself (Figure 4). Morphine injection after reactivation also turned memory dependent on a pre-test morphine treatment in order to express it properly (Figure 5). Neurohumoral state is then changed either by an endogenous condition or the exogenous treatment. When taking place concomitantly with memory reactivation or reconsolidation, such neurohumoral changes can be incorporated into the previously acquired memory. Furthermore, the same condition will be required in order to retrieve this memory.

Water deprivation influence a whole plethora of physiological functions such as increase of corticoid secretion (Mornagui et al., 2010) and arginine-vasopressin levels (Knight et al., 2010), osmolality disregulation (Stricker et al., 2002), increase of plasma renin activity (Nagai et al., 1993) and sodium concentration (De Luca et al., 2010), decreased of urinary volume (Jorgensen et al., 1993) and alterations in brain expression of angiotensin-converting enzyme (Bourassa and Speth, 2010). However, we show that the results on making state-dependent memories were supported by the RAS system.

Water deprivation effects were reproduced by infusing ANG II in the hippocampus. Furthermore, such effect was blocked by the AT1 receptor antagonist Losartan, strongly suggesting that water deprivation increases endogenous ANGII in dorsal hippocampus and may update the memory trace through the activation of AT1 receptors.

Possibly, these results can be influenced by other processes associated with RAS system. Boccia and colleagues (2007) demonstrated that the inhibition of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) after memory reactivation impairs memory retention in mice. Interestingly, this nuclear factor is activated by ANG II in *Chasmagnathus sp* (Frenkel et al., 2002). Considering that the RAS system has been highly preserved during evolution and NF- $\kappa$ B transcription factor plays an important role in memory reconsolidation (Yang et al., 2011; Si et al., 2012), it is possible that NF- $\kappa$ B could be a process taking place downstream of the AT1 receptors activation in order to support the establishment of a state-dependent memory through reconsolidation.

In the present study, we used nimodipine to certify that the underpinning mechanism for the memory modification was a reconsolidation process. If an established memory becomes labile and requires reconsolidation in order to persist, then blocking destabilization would also prevent reconsolidation. One could argue that the effect found in this study was mediated by second order conditioning, creating a new independent association through a consolidation process, (i.e. water deprivation  $\rightarrow$  context  $\rightarrow$  footshock) instead of updating an existing association through reconsolidation. Nimodipine prevents reconsolidation but do not interfere with the acquisition, consolidation or retrieval processes (Suzuki et al., 2004). Then, if our results were supported by the consolidation process, no effects of nimodipine would be

expected. In the present study, nimodipine injection prevented memory to become state-dependent.

This is the first evidence that a reconsolidation mechanism can incorporate the neurohumoral state during reactivation or reconsolidation and influence future memory expression. Memory was updated by incorporating the internal environment information during reconsolidation under a water deprived state into a previously acquired memory. Hence, the same internal environment state became necessary for an adequate retrieval. For weak memories, it acts as an additional cue complementing the contextual information in order to promote memory retrieval. However, in the absence of contextual information, the internal cue is not sufficient to retrieve fear memory by itself in a novel context. The convergent effects of both post-reactivation and pre-test water deprivation and morphine injection, suggest that the endogenous update is a general memory property that enables reconsolidation-induced state-dependent memories.

These findings trigger new insights about the influence of daily life events on memory and extend the classical view of endogenous modulation of memory. A memory reactivated in a specific endogenous state may become dependent of this state in order to be properly retrieved later. Thus, hormonal and neurohumoral modulation concomitant to memory reconsolidation can be a promising approach to treat pathological memories.



## References

Boccia M, Freudenthal R, Blake M, de IF, V, Acosta G, Baratti C, Romano A (2007) Activation of hippocampal nuclear factor-kappa B by retrieval is required for memory reconsolidation. *J Neurosci* 27:13436-13445.

Bormann NM, Overton DA (1993) Morphine as a conditioned stimulus in a conditioned emotional response paradigm. *Psychopharmacology (Berl)* 112:277-284.

Bourassa EA, Speth RC (2010) Water deprivation increases angiotensin-converting enzyme but not AT(1) receptor expression in brainstem and paraventricular nucleus of the hypothalamus of the rat. *Brain Res* 1319:83-91.

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

Coccoz V, Maldonado H, Delorenzi A (2011) The enhancement of reconsolidation with a naturalistic mild stressor improves the expression of a declarative memory in humans. *Neuroscience* 185:61-72.

Colpaert FC, Koek W, Bruins Slot LA (2001) Evidence that mnesic states govern normal and disordered memory. *Behav Pharmacol* 12:575-589.

De Luca LAJ, Pereira-Derderian DT, Vendramini RC, David RB, Menani JV (2010) Water deprivation-induced sodium appetite. *Physiol Behav* 100:535-544.

de Oliveira Alvares L, Einarsson EO, Santana F, Crestani AP, Haubrich J, Cassini LF, Nader K, Quillfeldt JA (2012) Periodically reactivated context memory retains its precision and dependence on the hippocampus. *Hippocampus* 22:1092-1095.

DeLoof S, De SC, Montel V, Chatelain A (1999) Effects of water deprivation on atrial natriuretic peptide secretion and density of binding sites in adrenal glands and kidneys of maternal and fetal rats in late gestation. *Eur J Endocrinol* 141:160-168.

Duvarci S, Nader K (2004) Characterization of fear memory reconsolidation. *J Neurosci* 24:9269-9275.

Frenkel L, Freudenthal R, Romano A, Nahmod VE, Maldonado H, Delorenzi A (2002) Angiotensin II and the transcription factor Rel/NF-kappaB link environmental water shortage with memory improvement. *Neuroscience* 115:1079-1087.

Frenkel L, Maldonado H, Delorenzi A (2005a) Memory strengthening by a real-life episode during reconsolidation: an outcome of water deprivation via brain angiotensin II. *Eur J Neurosci* 22:1757-1766.

Frenkel L, Maldonado H, Delorenzi A (2005b) Retrieval improvement is induced by water shortage through angiotensin II. *Neurobiol Learn Mem* 83:173-177.

Haas HL, Felix D, Celio MR, Inagami T (1980) Angiotensin II in the hippocampus. A histochemical and electrophysiological study. *Experientia* 36:1394-1395.

Hazon N, Balment RJ, Perrott M, O'Toole LB (1989) The renin-angiotensin system and vascular and dipsogenic regulation in elasmobranchs. *Gen Comp Endocrinol* 74:230-236.

Homayoun H, Khavandgar S, Zarrindast MR (2003) Morphine state-dependent learning: interactions with alpha2-adrenoceptors and acute stress. *Behav Pharmacol* 14:41-48.

Hupbach A, Hardt O, Gomez R, Nadel L (2008) The dynamics of memory: context-dependent updating. *Learn Mem* 15:574-579.

Izquierdo I (1980) Effect of beta-endorphin and naloxone on acquisition, memory, and retrieval of shuttle avoidance and habituation learning in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 69:111-115.

Izquierdo I, Dias RD (1983a) Endogenous state-dependency:memory regulation by post-training and pre-testing administration of ACTH, beta -endorphin, adrenaline and tyramine. *Braz J Med Biol Res* 16:55-64.

Izquierdo I, Dias RD (1983b) Memory as a state dependent phenomenon: role of ACTH and epinephrine. *Behav Neural Biol* 38:144-149.

Jafari-Sabet M, Jannat-Dastjerdi I (2009) Muscimol state-dependent memory: involvement of dorsal hippocampal mu-opioid receptors. *Behav Brain Res* 202:5-10.

Jorgensen PE, Poulsen SS, Nexø E, Christensen S (1993) Effect of water deprivation, desmopressin (DDAVP) infusion, and oral loads of water, Na<sup>+</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> on urinary excretion of epidermal growth factor in the rat. *Regul Pept* 44:17-24.

Khajehpour L, Rezayof A, Zarrindast MR (2008) Involvement of dorsal hippocampal nicotinic receptors in the effect of morphine on memory retrieval in passive avoidance task. *Eur J Pharmacol* 584:343-351.

Khavandgar S, Homayoun H, Torkaman-Boutorabi A, Zarrindast MR (2002) The effects of adenosine receptor agonists and antagonists on morphine state-dependent memory of passive avoidance. *Neurobiol Learn Mem* 78:390-405.

Knight WD, Ji LL, Little JT, Cunningham JT (2010) Dehydration followed by sham rehydration contributes to reduced neuronal activation in vasopressinergic supraoptic neurons after water deprivation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299:R1232-R1240.

Lee JL (2008) Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nat Neurosci* 11:1264-1266.

Lee JL (2010) Memory reconsolidation mediates the updating of hippocampal memory content. *Front Behav Neurosci* 4:168.

Mornagui B, Rezg R, Grissa A, Duvareille M, Gharib C, Kamoun A, El-Fazaa S, Gharbi N (2010) Influence of nitric oxide synthase inhibition on vasopressin and corticosterone secretion during water deprivation in rats. *J Physiol Biochem* 66:271-281.

Nagai K, Stoynev AG, Nagai N, Nakagawa H (1993) Reduced increase in plasma renin activity on water-deprivation in blind hereditary microphthalmic rats. *Neurosci Lett* 149:217-220.

Nishimura M, Shiigi Y, Kaneto H (1990) State dependent and/or direct memory retrieval by morphine in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 100:27-30.

Paxinos G, Watson C (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego.

Rezayof A, Alijanpour S, Zarrindast MR, Rassouli Y (2008) Ethanol state-dependent memory: involvement of dorsal hippocampal muscarinic and nicotinic receptors. *Neurobiol Learn Mem* 89:441-447.

Rezayof A, Khajehpour L, Zarrindast MR (2009) The amygdala modulates morphine-induced state-dependent memory retrieval via muscarinic acetylcholine receptors. *Neuroscience* 160:255-263.

Riccio DC, Concannon JT (1981) ACTH and the reminder phenomena. In: *Endogenous peptides and learning processes* (Martinez, ed), New York.

Sanday L, Zanin KA, Patti CL, Tufik S, Frussa-Filho R (2012) Role of state-dependency in memory impairment induced by acute administration of midazolam in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 37:1-7.

Shi HS, Luo YX, Xue YX, Wu P, Zhu WL, Ding ZB, Lu L (2011) Effects of sleep deprivation on retrieval and reconsolidation of morphine reward memory in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 98:299-303.

Si J, Yang J, Xue L, Yang C, Luo Y, Shi H, Lu L (2012) Activation of NF-kappaB in Basolateral Amygdala Is Required for Memory Reconsolidation in Auditory Fear Conditioning. *PLoS One* 7:e43973.

Spear NE (1978) *The processing of memories targeting and retention*. Erlbaum.

Stricker EM, Callahan JB, Huang W, Sved AF (2002) Early osmoregulatory stimulation of neurohypophyseal hormone secretion and thirst after gastric NaCl loads. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282:R1710-R1717.

Suzuki A, Josselyn SA, Frankland PW, Masushige S, Silva AJ, Kida S (2004) Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J Neurosci* 24:4787-4795.

Yang J, Yu J, Jia X, Zhu W, Zhao L, Li S, Xu C, Yang C, Wu P, Lu L (2011) Inhibition of nuclear factor-kappaB impairs reconsolidation of morphine reward memory in rats. *Behav Brain Res* 216:592-596.

Zarrindast MR, Nouri M, Ahmadi S (2007) Cannabinoid CB1 receptors of the dorsal hippocampus are important for induction of conditioned place preference (CPP) but do not change morphine CPP. *Brain Res* 1163:130-137.

## 5. DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que uma memória pode ser atualizada endogenamente durante a reconsolidação, estabelecendo uma dependência de estado entre a reativação e a evocação da memória. No caso da restrição de água, os resultados parecem estar associados ao aumento de ANG II e a sinalização pelo receptor AT1 no hipocampo dorsal. A atualização com a restrição pode modular a expressão da memória de diferentes formas dependendo da sua intensidade. Com o treino forte (0.7mA), a presença do estado interno durante o teste se mostra necessária para uma adequada evocação. No entanto, com o treino fraco, o estado interno atua como um estímulo incondicionado adicional que pode fortalecer a expressão da memória na presença do estado endógeno. Importante, só o estado endógeno gerado pela restrição não promove a evocação da memória em um contexto novo, mostrando-se dependente das características do contexto. A atualização endógena parece ser um processo geral da memória, de fato, a mesma dependência de estado foi mostrada com a administração pós-reativação e pré-teste de morfina, uma ferramenta farmacológica clássica no estudo da dependência de estado durante a consolidação. Contudo, podemos afirmar que as mudanças neuro-humorais presentes durante a reconsolidação podem ser incorporadas em uma memória previamente adquirida. A presença dos mesmos estímulos durante a evocação torna-se um fator determinante para uma adequada expressão da memória.

São bem conhecidos os efeitos da restrição de água em animais. Dentro das diferentes mudanças associadas com a restrição crônica hídrica, encontramos o aumento da secreção de corticóides, aumentos nos níveis de argenina e vasopresina, desregulação da osmolaridade, aumento da atividade plasmática de renina, diminuição da concentração



sódica, diminuição no volume urinário e alterações encefálicas na expressão da ECA. No entanto, os efeitos da restrição sobre a memória em nosso experimento parecem estar associados especificamente com mudanças na liberação de ANG II no hipocampo dorsal. De fato, o protocolo de restrição que usamos não tem efeitos no desempenho motor do animal nem quando a sessão de reativação foi omitida, mostrando que os efeitos aqui encontrados parecem ser sobre a memória. Adicionalmente, a infusão de ANG II diretamente no hipocampo dorsal conseguiu reproduzir os efeitos da restrição de água na reconsolidação. Tais efeitos foram prevenidos pela administração do antagonista de receptores AT1 Losartan.

Os mecanismos pelos quais a ativação dos receptores AT1 modulam a atualização endógena ainda não estão elucidados. Entretanto, conjecturamos que esse processo seja mediado por fatores de transcrição como o NF- $\kappa$ B. Como mencionado na introdução deste trabalho, no caranguejo *Chasmagnathus*, o NF- $\kappa$ B é ativado pela cascata molecular produto da atividade de receptores para ANG II. Tendo em vista que o sistema SRA é altamente preservado em diferentes espécies, hipotetizamos que esse fator de transcrição seja regulado pela atividade de receptores AT1. Em nosso experimento, o Losartan poderia inibir a atividade do NF- $\kappa$ B e, conseqüentemente, impedir a atualização da memória. O NF- $\kappa$ B é fundamental no processo de reconsolidação da memora, No entanto, ainda não foi estudada sua função especificamente na atualização da mesma. Estudos posteriores poderão estabelecer esta relação.

É importante ressaltar que os antagonistas infundidos no hipocampo não interferiram na reconsolidação da memória na ausência de restrição de água. Entretanto, em restrição hídrica, o antagonista AT1 inibiu a atualização da memória.

Uma questão importante destes achados é se a restrição poderia também gerar uma dependência de estado endógeno durante a consolidação. Experimentos adicionais mostraram que o protocolo de restrição antes do treino não tem efeitos na expressão futura da memória, e a dependência de estado induzida por esse estímulo foi específica para o processo de reconsolidação (anexo I). São numerosos os experimentos que mostram diferenças entre os mecanismos de consolidação e reconsolidação da memória. A restrição de água já tinha sido avaliada na consolidação com resultados contraditórios. Uma possibilidade é que o sistema SRA tenha funções de modulação diferentes em cada um desses processos.

Um dos grandes questionamentos sobre a existência da reconsolidação se origina da possibilidade de novas associações serem estabelecidas durante a sessão de reativação por meio de um condicionamento de segunda ordem, sendo difícil saber se os efeitos encontrados são mediados por consolidação ou reconsolidação. Neste trabalho utilizamos a nimodipina, um antagonista dos canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L, usada como uma ferramenta para inibir o processo de labilização. Estudos anteriores mostram que a nimodipina não inibe a consolidação ou evocação da memória. Se nossos resultados foram mediados pela consolidação, não esperaríamos nenhum efeito da nimodipina. No entanto, a administração pré-reativação do fármaco reverte os efeitos da restrição de água. Esse resultado permite afirmar que a atualização

do traço original da memória com a nova informação endógena é mediado pela reconsolidação.

Nossos resultados mostram que a reconsolidação pode ser modulada de diferentes formas dependendo da força da memória. Durante o treino forte, a atualização forma uma memória que só é expressa adequadamente quando o mesmo estado endógeno está presente. No entanto, no treino fraco, essa atualização fortalece a expressão da memória na presença do estado endógeno. Portanto, nos dois casos pode ser evidenciada a dependência de estado. Provavelmente durante o teste 1 no protocolo do treino fraco, os grupos expressam o mínimo de congelamento possível, não sendo evidenciada a redução como acontece com o treino forte, mas durante o teste 2, a presença da restrição atua como um estímulo condicionado adicional que fortalece a expressão da memória. Portanto, no teste 2, a presença dessa informação proporciona mais detalhes ao grupo da atualização e, conseqüentemente, pode expressar melhor a memória aversiva.

O processo de atualização endógena parece ser um processo geral da memória. Demonstramos que a administração de morfina reproduziu o fenômeno da dependência de estado. No entanto, não podemos generalizar que os mesmos tratamentos usados no estudo da dependência de estado durante a consolidação podem promover a dependência de estado na reconsolidação. De fato, como foi mencionado anteriormente, a restrição de água antes do treino não tem efeitos na memória. No futuro, o mesmo efeito de atualização deve ser avaliado, por exemplo, em memórias não aversivas.

O presente trabalho permite ampliar o conhecimento sobre os processos neuro-humorais que controlam o armazenamento e expressão da memória. Adicionalmente, mostramos

como estímulos naturais podem interagir com uma memória desestabilizada pela reativação. O processo de atualização endógena pode ser incluso dentro das possíveis funções biológicas da reconsolidação e constituir um novo paradigma para o estudo da incorporação de novas informações em memórias previamente adquiridas.

Numa perspectiva clínica, a atualização endógena permite entender alguns processos de memória presentes em psicopatologias como a depressão, onde o fenômeno de dependência de estado tem sido bastante estudado. Além disso, uma extensiva investigação deve ser iniciada sobre ao potencial uso da modulação endógena da memória durante a reconsolidação para a redução de memórias aversivas como aquelas presentes no transtorno de estresse pós-traumático.

## 6. CONCLUSÕES

Por meio do nosso protocolo conseguimos entender alguns dos processos que podem modular endogenamente a memória durante a reconsolidação, em particular:

6.1. A Restrição de água durante a reativação pode modular endogenamente a memória e condicionar a sua futura expressão pelo estabelecimento de uma dependência de estado entre a reativação e a evocação da memória;

6.2. A inibição da libilização com a nimodipina impede os efeitos da restrição sobre a memória, mostrando que os resultados encontrados são mediados pelo processo de reconsolidação;

6.3. O aumento de ANG II no hipocampo dorsal durante a reconsolidação, parece ser responsável pelos efeitos da restrição;

6.4. O antagonista de receptores AT1 Losartan previne a atualização endógena com o estado gerado pela restrição;

6.5. Com o treino forte, o estado endógena se mostra como necessário, após a atualização, para a evocação adequada da memória. Com o treino fraco, a presença do estado fortalece a expressão da memória;

6.6. Só a presença do estado endógeno não pode promover a evocação da memória em um contexto novo. A dependência de estado è, por sua vez, dependente do contexto;

6.7. A administração após a reativação de morfina também estabeleceu a dependência de estado, precisando da mesma dose pré-teste para a memória se expressar adequadamente;

6.8. A dependência de estado induzida pela morfina pode ser prevenida com a inibição da labilização da memória por meio da nimodipina.

A Tabela 1. mostra um resumo dos objetivos deste trabalho e os principais resultados provenientes dos experimentos desenvolvidos.

Tabela 1.

<b>Objetivos Específicos</b>	<b>Experimento/Figura</b>	<b>Resultado</b>
3.2.1. Estudar se uma memória proveniente do CAC pode ser atualizada com um estado endógeno induzido por uma restrição de água durante a reativação da memória.	<i>Fig 2a</i>	6.1. A Restrição de água durante a reativação pode modular endogenamente a memória e condiciona a sua futura expressão pelo estabelecimento de uma dependência de estado entre a reativação e a evocação da memória;
3.2.2. Estudar se a possível atualização com o estado endógeno, induzida pela restrição de água, pode ser prevenida com a inibição da labilização da memória por meio da administração sistêmica pré-reativação de nimodipina.	<i>Fig 2c</i>	6.2. A inibição da labilização com a nimodipina impede os efeitos da restrição sobre a memória, mostrando que os resultados encontrados são mediados pelo processo de reconsolidação;
3.2.3. Verificar se a infusão no hipocampo dorsal de ANG II imediatamente após a reativação da memória poderia mimetizar os efeitos da restrição de água.	<i>Fig 3a</i>	6.3. O aumento de ANG II no hipocampo dorsal durante a reconsolidação, parece ser responsável pelos efeitos da restrição;
3.2.4. Estudar se a possível atualização com o estado endógeno, induzida pela restrição de água, pode ser prevenida com a infusão no hipocampo dorsal do antagonista AT1 Losartan e/ou AT2 PD123319 de ANG II imediatamente após a reativação da memória.	<i>Fig 3b</i>	6.4. O antagonista de receptores AT1 Losartan previne a atualização endógena com o estado gerado pela restrição;
3.2.5. Verificar o efeito da atualização com o estado endógeno, induzida pela restrição de água, em uma memória fraca.	<i>Fig 4a</i>	6.5. Com o treino forte, o estado endógeno se mostra como necessário, após a atualização, para a evocação adequada da memória. Com o treino fraco, a presença do estado fortalece a expressão da memória;
3.2.6. Verificar se a possível atualização com o estado endógeno induzida pela restrição de água poderia ficar como uma dica interna e promover a evocação da memória em um contexto novo.	<i>Fig 4b</i>	6.6. Só a presença do estado endógeno não pode promover a evocação da memória em um contexto novo. A dependência de estado é, por sua vez, dependente do contexto;
3.2.7. Estudar se a administração sistêmica de morfina após a reativação poderia gerar uma dependência de estado por meio da atualização neuro-humoral da memória.	<i>Fig 5a</i>	6.7. A administração após a reativação de morfina também estabeleceu a dependência de estado, precisando da mesma dose pré-teste para a memória se expressar adequadamente;
3.2.8. Estudar se a possível atualização induzida pela administração de morfina pode ser prevenida pela inibição da labilização da memória (através da administração sistêmica pré-reativação de nimodipina).	<i>Fig 5c</i>	6.8. A dependência de estado induzida pela morfina pode ser prevenida com a inibição da labilização da memória por meio da nimodipina.

## 7. REFERÊNCIAS

Abel T, Nguyen PV, Barad M, Deuel TA, Kandel ER, Bourchouladze R (1997) Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell* 88:615-626.

Agren T, Engman J, Frick A, Bjorkstrand J, Larsson EM, Furmark T, Fredrikson M (2012) Disruption of reconsolidation erases a fear memory trace in the human amygdala. *Science* 337:1550-1552.

Ahlers ST, Gordon TL, Riccio DC (1991) The effects of preexposure to the drug on state dependent retention. *Physiol Behav* 50:365-371.

Akirav I, Maroun M (2012) Stress modulation of reconsolidation. *Psychopharmacology (Berl)*.

Albensi BC (2007) The NMDA receptor/ion channel complex: a drug target for modulating synaptic plasticity and excitotoxicity. *Curr Pharm Des* 13:3185-3194.

Alberini CM (2005) Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends Neurosci* 28:51-56.

Alvares LO, Einarsson EO, Santana F, Crestani AP, Haubrich J, Cassini LF, Nader K, Quillfeldt JA (2012) Periodically reactivated context memory retains its precision and dependence on the hippocampus. *Hippocampus* 22:1092-1095.

Ambrogio LC, Baldi E, Bucherelli C, Tassoni G (1993) Forced extinction as a means to evaluate consolidation gradient of a passive avoidance response in the rat. *Physiol Behav* 53:873-877.



Ardjmand A, Rezayof A, Zarrindast MR (2011) Involvement of central amygdala NMDA receptor mechanism in morphine state-dependent memory retrieval. *Neurosci Res* 69:25-31.

Babb SJ, Crystal JD (2006) Episodic-like memory in the rat. *Curr Biol* 16:1317-1321.

Bachmann J, Feldmer M, Ganten U, Stock G, Ganten D (1991) Sexual dimorphism of blood pressure: possible role of the renin-angiotensin system. *J Steroid Biochem Mol Biol* 40:511-515.

Bammer G (1982) Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: a review and some new results. *Neurosci Biobehav Rev* 6:247-296.

Barnes P, Kirtley A, Thomas KL (2012) Quantitatively and qualitatively different cellular processes are engaged in CA1 during the consolidation and reconsolidation of contextual fear memory. *Hippocampus* 22:149-171.

Bekinschtein P, Cammarota M, Izquierdo I, Medina JH (2008a) BDNF and memory formation and storage. *Neuroscientist* 14:147-156.

Bekinschtein P, Cammarota M, Katche C, Slipczuk L, Rossato JI, Goldin A, Izquierdo I, Medina JH (2008b) BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:2711-2716.

Berlese DB, Sauzem PD, Carati MC, Guerra GP, Stiegemeier JA, Mello CF, Rubin MA (2005) Time-dependent modulation of inhibitory avoidance memory by spermidine in rats. *Neurobiol Learn Mem* 83:48-53.

Besnard A, Caboche J, Laroche S (2012) Reconsolidation of memory: A decade of debate. *Prog Neurobiol* 99:61-80.

Bevilaqua LR, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M (2008) Reconsolidation and the fate of consolidated memories. *Neurotox Res* 14:353-358.

Bodnoff SR, Humphreys AG, Lehman JC, Diamond DM, Rose GM, Meaney MJ (1995) Enduring effects of chronic corticosterone treatment on spatial learning, synaptic plasticity, and hippocampal neuropathology in young and mid-aged rats. *J Neurosci* 15:61-69.

Bonini JS, Bevilaqua LR, Zinn CG, Kerr DS, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M (2006) Angiotensin II disrupts inhibitory avoidance memory retrieval. *Horm Behav* 50:308-313.

Bouton ME (1993) Context, time, and memory retrieval in the interference paradigms of Pavlovian learning. *Psychol Bull* 114:80-99.

Bracs PU, Gregory P, Jackson DM (1984) Passive avoidance in rats: disruption by dopamine applied to the nucleus accumbens. *Psychopharmacology (Berl)* 83:70-75.

Brioni JD, Nagahara AH, McGaugh JL (1989) Involvement of the amygdala GABAergic system in the modulation of memory storage. *Brain Res* 487:105-112.

Brooks DC (2000) Recent and remote extinction cues reduce spontaneous recovery. *Q J Exp Psychol B* 53:25-58.

Brooks DC, Bouton ME (1993) A retrieval cue for extinction attenuates spontaneous recovery. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 19:77-89.

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

Cammarota M, Bevilaqua LR, Medina JH, Izquierdo I (2004) Retrieval does not induce reconsolidation of inhibitory avoidance memory. *Learn Mem* 11:572-578.

Chen DY, Stern SA, Garcia-Osta A, Saunier-Rebori B, Pollonini G, Bambah-Mukku D, Blitzler RD, Alberini CM (2011) A critical role for IGF-II in memory consolidation and enhancement. *Nature* 469:491-497.

Ciobica A, Bild W, Hritcu L, Haulica I (2009) Brain renin-angiotensin system in cognitive function: pre-clinical findings and implications for prevention and treatment of dementia. *Acta Neurol Belg* 109:171-180.

Clark KB, Krahl SE, Smith DC, Jensen RA (1995) Post-training unilateral vagal stimulation enhances retention performance in the rat. *Neurobiol Learn Mem* 63:213-216.

Collingridge GL, Randall AD, Davies CH, Alford S (1992) The synaptic activation of NMDA receptors and Ca<sup>2+</sup> signalling in neurons. *Ciba Found Symp* 164:162-171.

Concannon JT, Carr M (1982) Pre-test epinephrine injections reverse DDC-induced retrograde amnesia. *Physiol Behav* 29:443-448.

Costa JC, Costa KM, do Nascimento JL (2010) Scopolamine- and diazepam-induced amnesia are blocked by systemic and intraseptal administration of substance P and choline chloride. *Peptides* 31:1756-1760.

Cotman CW, Monaghan DT, Ganong AH (1988) Excitatory amino acid neurotransmission: NMDA receptors and Hebb-type synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 11:61-80.

Crystal JD (2009) Elements of episodic-like memory in animal models. *Behav Processes* 80:269-277.

Dalmaz C, Introini-Collison IB, McGaugh JL (1993) Noradrenergic and cholinergic interactions in the amygdala and the modulation of memory storage. *Behav Brain Res* 58:167-174.

Dantzer R, Koob GF, Bluthé RM, Le MM (1988) Septal vasopressin modulates social memory in male rats. *Brain Res* 457:143-147.

Darbandi N, Rezayof A, Zarrindast MR (2008) Modulation of morphine state-dependent learning by muscarinic cholinergic receptors of the ventral tegmental area. *Physiol Behav* 94:604-610.

Dash PK, Hebert AE, Runyan JD (2004) A unified theory for systems and cellular memory consolidation. *Brain Res Brain Res Rev* 45:30-37.

Dashniani MG, Beseliia GV, Maglakelidze GA, Burdzhanaдзе MA, Chkhikvishvili NT (2009) Effects of the selective lesions of cholinergic septohippocampal neurons on different forms of memory and learning process. *Georgian Med News* 81-85.

de Quervain DJ, Roozendaal B, McGaugh JL (1998) Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature* 394:787-790.

de IF, V, Freudenthal R, Romano A (2011) Reconsolidation or extinction: transcription factor switch in the determination of memory course after retrieval. *J Neurosci* 31:5562-5573.

Debiec J, Diaz-Mataix L, Bush DE, Doyere V, LeDoux JE (2010) The amygdala encodes specific sensory features of an aversive reinforcer. *Nat Neurosci* 13:536-537.

Debiec J, LeDoux JE, Nader K (2002) Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. *Neuron* 36:527-538.

Delorenzi A, Pedreira ME, Romano A, Garcia SI, Pirola CJ, Nahmod VE, Maldonado H (1996) Angiotensin II enhances long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. *Brain Res Bull* 41:211-220.

Dudai Y, Eisenberg M (2004) Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron* 44:93-100.

Duncan CP (1949) The retroactive effect of electroshock on learning. pp 32-44.

Durkin TP (1992) GABAergic mediation of indirect transsynaptic control over basal and spatial memory testing-induced activation of septo-hippocampal cholinergic activity in mice. *Behav Brain Res* 50:155-165.

Duvarci S, Nader K (2004) Characterization of fear memory reconsolidation. *J Neurosci* 24:9269-9275.

Duvarci S, Nader K, LeDoux JE (2005) Activation of extracellular signal-regulated kinase- mitogen-activated protein kinase cascade in the amygdala is required for memory reconsolidation of auditory fear conditioning. *Eur J Neurosci* 21:283-289.

Duvarci S, Nader K, LeDoux JE (2008) De novo mRNA synthesis is required for both consolidation and reconsolidation of fear memories in the amygdala. *Learn Mem* 15:747-755.

Evered MD, Robinson MM (1981) The renin-angiotensin system in drinking and cardiovascular responses to isoprenaline in the rat. *J Physiol* 316:357-367.

Faiman CP, de Erasquin GA, Baratti CM (1992) Modulation of memory retrieval by pre-testing vasopressin: involvement of a central cholinergic nicotinic mechanism. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 14:607-613.

Fawzi AB, Zhang H, Weig B, Hawes B, Graziano MP (1997) Nociceptin activation of the human ORL1 receptor expressed in Chinese hamster ovary cells: functional homology with opioid receptors. *Eur J Pharmacol* 336:233-242.

Frankland PW, Ding HK, Takahashi E, Suzuki A, Kida S, Silva AJ (2006) Stability of recent and remote contextual fear memory. *Learn Mem* 13:451-457.

Frenkel L, Maldonado H, Delorenzi A (2005) Memory strengthening by a real-life episode during reconsolidation: an outcome of water deprivation via brain angiotensin II. *Eur J Neurosci* 22:1757-1766.

Frenkel L, Suarez LD, Maldonado H, Delorenzi A (2010) Angiotensin modulates long-term memory expression but not long-term memory storage in the crab *Chasmagnathus*. *Neurobiol Learn Mem* 94:509-520.

Fulton D, Kemenes I, Andrew RJ, Benjamin PR (2005) A single time-window for protein synthesis-dependent long-term memory formation after one-trial appetitive conditioning. *Eur J Neurosci* 21:1347-1358.

Garcia-Delatorre P, Rodriguez-Ortiz CJ, Balderas I, Bermudez-Rattoni F (2010) Differential participation of temporal structures in the consolidation and reconsolidation of taste aversion extinction. *Eur J Neurosci* 32:1018-1023.

Georgiev VP, Yonkov DI, Kambourova TS (1988) Interactions between angiotensin II and baclofen in shuttle-box and passive avoidance performance. *Neuropeptides* 12:155-158.

Girault JA, Valjent E, Caboche J, Herve D (2007) ERK2: a logical AND gate critical for drug-induced plasticity? *Curr Opin Pharmacol* 7:77-85.

Glaser V, Carlini VP, Gabach L, Ghersi M, de Barioglio SR, Ramirez OA, Perez MF, Latini A (2010) The intra-hippocampal leucine administration impairs memory consolidation and LTP generation in rats. *Cell Mol Neurobiol* 30:1067-1075.

Hall J, Thomas KL, Everitt BJ (2001) Cellular imaging of zif268 expression in the hippocampus and amygdala during contextual and cued fear memory retrieval: selective activation of hippocampal CA1 neurons during the recall of contextual memories. *J Neurosci* 21:2186-2193.

Hamann S (2001) Cognitive and neural mechanisms of emotional memory. *Trends Cogn Sci* 5:394-400.

Hardt O, Einarsson EO, Nader K (2010) A bridge over troubled water: reconsolidation as a link between cognitive and neuroscientific memory research traditions. *Annu Rev Psychol* 61:141-167.

Harris JA, Jones ML, Bailey GK, Westbrook RF (2000) Contextual control over conditioned responding in an extinction paradigm. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 26:174-185.

Harrison LM, Kastin AJ, Zadina JE (1998) Opiate tolerance and dependence: receptors, G-proteins, and antiopiates. *Peptides* 19:1603-1630.

Hebb AL, Poulin JF, Roach SP, Zacharko RM, Drolet G (2005) Cholecystokinin and endogenous opioid peptides: interactive influence on pain, cognition, and emotion. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29:1225-1238.

Herry C, Garcia R (2002) Prefrontal cortex long-term potentiation, but not long-term depression, is associated with the maintenance of extinction of learned fear in mice. *J Neurosci* 22:577-583.

Holahan MR, White NM (2004) Amygdala inactivation blocks expression of conditioned memory modulation and the promotion of avoidance and freezing. *Behav Neurosci* 118:24-35.

Holland AC, Kensinger EA (2010) Emotion and autobiographical memory. *Phys Life Rev* 7:88-131.

Homayoun H, Khavandgar S, Zarrindast MR (2003) Morphine state-dependent learning: interactions with alpha2-adrenoceptors and acute stress. *Behav Pharmacol* 14:41-48.

Houghoghi V, Rezayof A, Zyaian S, Zarrindast MR (2009) Intradorsal hippocampal microinjection of lithium reverses morphine-induced impairment of memory in mice: interactions with dopamine receptor mechanism(s). *Behav Pharmacol* 20:680-687.



Ikram H (1996) The renin-angiotensin system and cardiac remodelling after acute myocardial infarction. *Heart* 76:68-72.

Ilyutchenok RY, Dubrovina NI (1995) Memory retrieval enhancement by kappa opioid agonist and mu, delta antagonists. *Pharmacol Biochem Behav* 52:683-687.

Inda MC, Muravieva EV, Alberini CM (2011) Memory retrieval and the passage of time: from reconsolidation and strengthening to extinction. *J Neurosci* 31:1635-1643.

Introini-Collison I, Saghafi D, Novack GD, McGaugh JL (1992) Memory-enhancing effects of post-training dipivefrin and epinephrine: involvement of peripheral and central adrenergic receptors. *Brain Res* 572:81-86.

Introini-Collison IB, Miyazaki B, McGaugh JL (1991) Involvement of the amygdala in the memory-enhancing effects of clenbuterol. *Psychopharmacology (Berl)* 104:541-544.

Isaac JT, Nicoll RA, Malenka RC (1999) Silent glutamatergic synapses in the mammalian brain. *Can J Physiol Pharmacol* 77:735-737.

Ishii D, Matsuzawa D, Matsuda S, Tomizawa H, Sutoh C, Shimizu E (2012) No erasure effect of retrieval-extinction trial on fear memory in the hippocampus-independent and dependent paradigms. *Neurosci Lett* 523:76-81.

Izquierdo I (2011) *Memória*. Artmed Porto Alegre.

Izquierdo I (1980) Effect of beta-endorphin and naloxone on acquisition, memory, and retrieval of shuttle avoidance and habituation learning in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 69:111-115.

Izquierdo I, Beamish DG, Anisman H (1979) Effect of an inhibitor of dopamin-beta-hydroxylase on the acquisition and retention of four different avoidance tasks in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 63:173-178.

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.

Izquierdo I, Cammarota M, Vianna MM, Bevilaqua LR (2004) The inhibition of acquired fear. *Neurotox Res* 6:175-188.

Izquierdo I, Dias RD (1983) Memory as a state dependent phenomenon: role of ACTH and epinephrine. *Behav Neural Biol* 38:144-149.

Izquierdo I, McGaugh JL (2000) Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. *Behav Pharmacol* 11:517-534.

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

Izquierdo I, Medina JH, Vianna MR, Izquierdo LA, Barros DM (1999) Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav Brain Res* 103:1-11.

Izquierdo I, Netto CA (1985) The brain beta-endorphin system and behavior: the modulation of consecutively and simultaneously processed memories. *Behav Neural Biol* 44:249-265.

Izquierdo I, Netto CA, Dalmaz C, Chaves ML, Pereira ME, Siegfried B (1988) Construction and reconstruction of memories. *Braz J Med Biol Res* 21:9-25.

Izquierdo I, Quillfeldt JA, Zanatta MS, Quevedo J, Schaeffer E, Schmitz PK, Medina JH (1997) Sequential role of hippocampus and amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats. *Eur J Neurosci* 9:786-793.

Izquierdo LA, Barros DM, Vianna MR, Coitinho A, deDavid e Silva, Choi H, Moletta B, Medina JH, Izquierdo I (2002) Molecular pharmacological dissection of short- and long-term memory. *Cell Mol Neurobiol* 22:269-287.

Jackson B, Mendelsohn FA, Johnston CI (1991) Angiotensin-converting enzyme inhibition: prospects for the future. *J Cardiovasc Pharmacol* 18 Suppl 7:S4-S8.

Jacobs WJ, Nadel L (1999) The first panic attack: a neurobiological theory. *Can J Exp Psychol* 53:92-107.

Jafari MR, Zarrindast MR, Djahanguiri B (2006) Influence of cholinergic system modulators on morphine state-dependent memory of passive avoidance in mice. *Physiol Behav* 88:146-151.

Jafari-Sabet M, Jannat-Dastjerdi I (2009) Muscimol state-dependent memory: involvement of dorsal hippocampal mu-opioid receptors. *Behav Brain Res* 202:5-10.

James R., Misanin, Ralph R. Miller, Donald J. Lewis (1968) Retrograde Amnesia Produced by Electroconvulsive Shock after Reactivation of a Consolidated Memory Trace. pp 554-555.

Jarome TJ, Kwapis JL, Werner CT, Parsons RG, Gafford GM, Helmstetter FJ (2012) The timing of multiple retrieval events can alter GluR1 phosphorylation and the requirement for protein synthesis in fear memory reconsolidation. *Learn Mem* 19:300-306.

Ji JZ, Wang XM, Li BM (2003) Deficit in long-term contextual fear memory induced by blockade of beta-adrenoceptors in hippocampal CA1 region. *Eur J Neurosci* 17:1947-1952.

Johansson T, Elfverson M, Zhou Q, Nyberg F (2010) Allosteric modulation of the NMDA receptor by neurosteroids in rat brain and the impact of long term morphine administration. *Biochem Biophys Res Commun* 401:504-508.

Kaang BK, Choi JH (2011) Protein Degradation during Reconsolidation as a Mechanism for Memory Reorganization. *Front Behav Neurosci* 5:2.

Kaang BK, Lee SH, Kim H (2009) Synaptic protein degradation as a mechanism in memory reorganization. *Neuroscientist* 15:430-435.

Kelemen WL, Creeley CE (2003) State-dependent memory effects using caffeine and placebo do not extend to metamemory. *J Gen Psychol* 130:70-86.

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* 23:5354-5360.

Kentros CG, Agnihotri NT, Streater S, Hawkins RD, Kandel ER (2004) Increased attention to spatial context increases both place field stability and spatial memory. *Neuron* 42:283-295.

Kerr DS, Bevilacqua LR, Bonini JS, Rossato JI, Kohler CA, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M (2005) Angiotensin II blocks memory consolidation through an AT2 receptor-dependent mechanism. *Psychopharmacology (Berl)* 179:529-535.

Kida S, Josselyn SA, Pena de OS, Kogan JH, Chevere I, Masushige S, Silva AJ (2002) CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. *Nat Neurosci* 5:348-355.

Kim JJ, Haller J (2007) Glucocorticoid hyper- and hypofunction: stress effects on cognition and aggression. *Ann N Y Acad Sci* 1113:291-303.

Klann E, Sweatt JD (2008) Altered protein synthesis is a trigger for long-term memory formation. *Neurobiol Learn Mem* 89:247-259.

Kosten TR (1990) Neurobiology of abused drugs. Opioids and stimulants. *J Nerv Ment Dis* 178:217-227.

Kroes MC, Strange BA, Dolan RJ (2010) Beta-adrenergic blockade during memory retrieval in humans evokes a sustained reduction of declarative emotional memory enhancement. *J Neurosci* 30:3959-3963.

Kryukov VI (2008) The role of the hippocampus in long-term memory: is it memory store or comparator? *J Integr Neurosci* 7:117-184.

Lechner HA, Squire LR, Byrne JH (1999) 100 years of consolidation--remembering Muller and Pilzecker. *Learn Mem* 6:77-87.

Lee JL (2008) Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nat Neurosci* 11:1264-1266.

- Lee JL (2010) Memory reconsolidation mediates the updating of hippocampal memory content. *Front Behav Neurosci* 4:168.
- Lever AF (1989) Renin: endocrine, paracrine, or part-paracrine control of blood pressure? *Am J Hypertens* 2:276-285.
- Lewis DJ (1979) Psychobiology of active and inactive memory. pp 1054-1083.
- Lipp J (1991) Possible mechanisms of morphine analgesia. *Clin Neuropharmacol* 14:131-147.
- Liu Y, Zhang J (2000) Recent development in NMDA receptors. *Chin Med J (Engl)* 113:948-956.
- Locatelli F, Romano A (2005) Differential activity profile of cAMP-dependent protein kinase isoforms during long-term memory consolidation in the crab *Chasmagnathus*. *Neurobiol Learn Mem* 83:232-242.
- Lubow RE, De la Casa LG (2002) Superlatent inhibition and spontaneous recovery: differential effects of pre- and postconditioning CS-alone presentations after long delays in different contexts. *Anim Learn Behav* 30:376-386.
- Mah CJ, Albert DJ, Jamieson JL (1972) Memory storage: evidence that consolidation continues following electroconvulsive shock. *Physiol Behav* 8:283-286.
- Malleret G, Alarcon JM, Martel G, Takizawa S, Vronskaya S, Yin D, Chen IZ, Kandel ER, Shumyatsky GP (2010) Bidirectional regulation of hippocampal long-term synaptic plasticity and its influence on opposing forms of memory. *J Neurosci* 30:3813-3825.

Martignoni E, Costa A, Sinforiani E, Liuzzi A, Chiodini P, Mauri M, Bono G, Nappi G (1992) The brain as a target for adrenocortical steroids: cognitive implications. *Psychoneuroendocrinology* 17:343-354.

McGaugh JL (1985) Peripheral and central adrenergic influences on brain systems involved in the modulation of memory storage. *Ann N Y Acad Sci* 444:150-161.

McGaugh JL (2000) Memory--a century of consolidation. *Science* 287:248-251.

McGaugh JL (2004) Memory reconsolidation hypothesis revived but restrained: theoretical comment on Biedenkapp and Rudy (2004). *Behav Neurosci* 118:1140-1142.

McGaugh JL (2006) Make mild moments memorable: add a little arousal. *Trends Cogn Sci* 10:345-347.

McGaugh JL, Introini-Collison IB (1987) Hormonal and neurotransmitter interactions in the modulation of memory storage: involvement of the amygdala. *Int J Neurol* 21-22:58-72.

McGaugh JL, Introini-Collison IB, Juler RG, Izquierdo I (1986) Stria terminalis lesions attenuate the effects of posttraining naloxone and beta-endorphin on retention. *Behav Neurosci* 100:839-844.

McGaugh JL, McIntyre CK, Power AE (2002) Amygdala modulation of memory consolidation: interaction with other brain systems. *Neurobiol Learn Mem* 78:539-552.

Medina JH, Schroder N, Izquierdo I (1999) Two different properties of short- and long-term memory. *Behav Brain Res* 103:119-121.

Messier C, Destrade C (1988) Improvement of memory for an operant response by post-training glucose in mice. *Behav Brain Res* 31:185-191.

Micheau J, Messier C, Jaffard R (1995) Glucose enhancement of scopolamine-induced increase of hippocampal high-affinity choline uptake in mice: relation to plasma glucose levels. *Brain Res* 685:99-104.

Milekic MH, Pollonini G, Alberini CM (2007) Temporal requirement of C/EBPbeta in the amygdala following reactivation but not acquisition of inhibitory avoidance. *Learn Mem* 14:504-511.

Mileusnic R, Lancashire CL, Rose SP (2005) Recalling an aversive experience by day-old chicks is not dependent on somatic protein synthesis. *Learn Mem* 12:615-619.

Miller CA, Marshall JF (2005) Molecular substrates for retrieval and reconsolidation of cocaine-associated contextual memory. *Neuron* 47:873-884.

Monfils MH, Cowansage KK, Klann E, Ledoux JE (2009) Extinction-reconsolidation boundaries: key to persistent attenuation of fear memories. *Science* 324:951-955.

Moore JL, Roche RA (2007) Reconsolidation revisited: a review and commentary on the phenomenon. *Rev Neurosci* 18:365-382.

Morgan MA, Schulkin J, LeDoux JE (2003) Ventral medial prefrontal cortex and emotional perseveration: the memory for prior extinction training. *Behav Brain Res* 146:121-130.



Nadel L, Samsonovich A, Ryan L, Moscovitch M (2000) Multiple trace theory of human memory: computational, neuroimaging, and neuropsychological results. *Hippocampus* 10:352-368.

Nader K, Einarsson EO (2010) Memory reconsolidation: an update. *Ann N Y Acad Sci* 1191:27-41.

Nader K, Hardt O (2009) A single standard for memory: the case for reconsolidation. *Nat Rev Neurosci* 10:224-234.

Nader K, Schafe GE, Le Doux JE (2000a) Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* 406:722-726.

Nader K, Schafe GE, LeDoux JE (2000b) The labile nature of consolidation theory. *Nat Rev Neurosci* 1:216-219.

Nakagawa Y, Ishibashi Y, Yoshii T, Tagashira E (1995) Muscimol induces state-dependent learning in Morris water maze task in rats. *Brain Res* 681:126-130.

Napolitano M, Marfia GA, Vacca A, Centonze D, Bellavia D, Di ML, Frati L, Bernardi G, Gulino A, Calabresi P (1999) Modulation of gene expression following long-term synaptic depression in the striatum. *Brain Res Mol Brain Res* 72:89-96.

O'Connell C, Gallagher HC, O'Malley A, Bourke M, Regan CM (2000) CREB phosphorylation coincides with transient synapse formation in the rat hippocampal dentate gyrus following avoidance learning. *Neural Plast* 7:279-289.

O'Mara SM, Commins S, Anderson M (2000) Synaptic plasticity in the hippocampal area CA1-subiculum projection: implications for theories of memory. *Hippocampus* 10:447-456.

Ogren SO (1986) Analysis of the avoidance learning deficit induced by the serotonin releasing compound p-chloroamphetamine. *Brain Res Bull* 16:645-660.

Okuyama A, Nonomura N, Nakamura M, Namiki M, Sonoda T (1988) Renin-angiotensin system. *Arch Androl* 21:169-180.

Ota KT, Pierre VJ, Ploski JE, Queen K, Schafe GE (2008) The NO-cGMP-PKG signaling pathway regulates synaptic plasticity and fear memory consolidation in the lateral amygdala via activation of ERK/MAP kinase. *Learn Mem* 15:792-805.

Overton DA (1978) Basic mechanisms of state-dependent learning. *Psychopharmacol Bull* 14:67-68.

Oyarzun JP, Lopez-Barroso D, Fuentemilla L, Cucurell D, Pedraza C, Rodriguez-Fornells A, de Diego-Balaguer R (2012) Updating fearful memories with extinction training during reconsolidation: a human study using auditory aversive stimuli. *PLoS One* 7:e38849.

Packard MG, Teather LA (1998) Amygdala modulation of multiple memory systems: hippocampus and caudate-putamen. *Neurobiol Learn Mem* 69:163-203.

Parsons RG, Gafford GM, Baruch DE, Riedner BA, Helmstetter FJ (2006) Long-term stability of fear memory depends on the synthesis of protein but not mRNA in the amygdala. *Eur J Neurosci* 23:1853-1859.

Patti CL, Kameda SR, Carvalho RC, Takatsu-Coleman AL, Lopez GB, Niigaki ST, Abilio VC, Frussa-Filho R, Silva RH (2006) Effects of morphine on the plus-maze discriminative avoidance task: role of state-dependent learning. *Psychopharmacology (Berl)* 184:1-12.

Perez-Cuesta LM, Maldonado H (2009) Memory reconsolidation and extinction in the crab: mutual exclusion or coexistence? *Learn Mem* 16:714-721.

Peters R, McGee R (1982) Cigarette smoking and state-dependent memory. *Psychopharmacology (Berl)* 76:232-235.

Phillips MI, Summers C (1998) Angiotensin II in central nervous system physiology. *Regul Pept* 78:1-11.

Plihal W, Pietrowsky R, Born J (1999) Dexamethasone blocks sleep induced improvement of declarative memory. *Psychoneuroendocrinology* 24:313-331.

Pollock DM, Banks RO (1991) Perspectives on renal blood flow autoregulation. *Proc Soc Exp Biol Med* 198:800-805.

Quirk GJ (2002) Memory for extinction of conditioned fear is long-lasting and persists following spontaneous recovery. *Learn Mem* 9:402-407.

Ragozzino ME, Gold PE (1995) Glucose injections into the medial septum reverse the effects of intraseptal morphine infusions on hippocampal acetylcholine output and memory. *Neuroscience* 68:981-988.

Rezayof A, Khajehpour L, Zarrindast MR (2009) The amygdala modulates morphine-induced state-dependent memory retrieval via muscarinic acetylcholine receptors. *Neuroscience* 160:255-263.

Rezayof A, Motevasseli T, Rassouli Y, Zarrindast MR (2007a) Dorsal hippocampal dopamine receptors are involved in mediating ethanol state-dependent memory. *Life Sci* 80:285-292.

Rezayof A, Motevasseli T, Rassouli Y, Zarrindast MR (2007b) Dorsal hippocampal dopamine receptors are involved in mediating ethanol state-dependent memory. *Life Sci* 80:285-292.

Riccio DC, Millin PM, Bogart AR (2006) Reconsolidation: a brief history, a retrieval view, and some recent issues. *Learn Mem* 13:536-544.

Robillard JE, Segar JL, Smith FG, Jose PA (1992) Regulation of sodium metabolism and extracellular fluid volume during development. *Clin Perinatol* 19:15-31.

Robinson MJ, Ross EC, Franklin KB (2011) The effect of propranolol dose and novelty of the reactivation procedure on the reconsolidation of a morphine place preference. *Behav Brain Res* 216:281-284.

Rodriguez-Ortiz CJ, Bermudez-Rattoni F (2007) Memory Reconsolidation or Updating Consolidation?

Rodriguez-Ortiz CJ, Garcia-Delatorre P, Benavidez E, Ballesteros MA, Bermudez-Rattoni F (2008) Intrahippocampal anisomycin infusions disrupt previously consolidated spatial memory only when memory is updated. *Neurobiol Learn Mem* 89:352-359.

Roozendaal B (2002) Stress and memory: opposing effects of glucocorticoids on memory consolidation and memory retrieval. *Neurobiol Learn Mem* 78:578-595.

Roozendaal B, Bohus B, McGaugh JL (1996) Dose-dependent suppression of adrenocortical activity with metyrapone: effects on emotion and memory. *Psychoneuroendocrinology* 21:681-693.

Roozendaal B, McEwen BS, Chattarji S (2009) Stress, memory and the amygdala. *Nat Rev Neurosci* 10:423-433.

Roozendaal B, McGaugh JL (1997) Basolateral amygdala lesions block the memory-enhancing effect of glucocorticoid administration in the dorsal hippocampus of rats. *Eur J Neurosci* 9:76-83.

Roozendaal B, McGaugh JL (2011) Memory modulation. *Behav Neurosci* 125:797-824.

Rosenegger D, Lukowiak K (2010) The participation of NMDA receptors, PKC, and MAPK in the formation of memory following operant conditioning in *Lymnaea*. *Mol Brain* 3:24.

Rossato JI, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Medina JH, Cammarota M (2009) Dopamine controls persistence of long-term memory storage. *Science* 325:1017-1020.

Rossato JI, Bevilaqua LR, Myskiw JC, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M (2007) On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Learn Mem* 14:36-46.

Rubin MA, Stiegemeier JA, Volkweis MA, Oliveira DM, Fenili AC, Boemo RL, Jurach A, Mello CF (2001) Intra-amygdala spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. *Eur J Pharmacol* 423:35-39.

Saavedra JM (1992) Brain and pituitary angiotensin. *Endocr Rev* 13:329-380.

Sanday L, Zanin KA, Patti CL, Tufik S, Frussa-Filho R (2012) Role of state-dependency in memory impairment induced by acute administration of midazolam in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 37:1-7.

Sara SJ (1985) Noradrenergic modulation of selective attention: its role in memory retrieval. *Ann N Y Acad Sci* 444:178-193.

Schafe GE, LeDoux JE (2000) Memory consolidation of auditory pavlovian fear conditioning requires protein synthesis and protein kinase A in the amygdala. *J Neurosci* 20:RC96.

Schelling G (2002) Effects of stress hormones on traumatic memory formation and the development of posttraumatic stress disorder in critically ill patients. *Neurobiol Learn Mem* 78:596-609.

Schiller D, Johansen J (2009) Prelimbic prefrontal neurons drive fear expression: a clue for extinction--reconsolidation interactions. *J Neurosci* 29:13432-13434.

Schiller D, Monfils MH, Raio CM, Johnson DC, Ledoux JE, Phelps EA (2010) Preventing the return of fear in humans using reconsolidation update mechanisms. *Nature* 463:49-53.

Sepehrizadeh Z, Bahrololoumi SM, Ahmadi S, Hashemi BS, Zarrindast MR, Sahebgharani M (2008) Decreased AMPA GluR2, but not GluR3, mRNA expression in rat amygdala and dorsal hippocampus following morphine-induced behavioural sensitization. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 35:1321-1330.

Serota RG (1971) Acetoxycycloheximide and transient amnesia in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68:1249-1250.

Shiigi Y, Kaneto H (1990) Facilitation of memory retrieval by pre-test morphine and its state dependency in the step-through type passive avoidance learning test in mice. *Jpn J Pharmacol* 54:79-81.

Sousa N, Lukoyanov NV, Madeira MD, Almeida OF, Paula-Barbosa MM (2000) Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience* 97:253-266.

Stanton PK (1996) LTD, LTP, and the sliding threshold for long-term synaptic plasticity. *Hippocampus* 6:35-42.

Stevens CF (1994) CREB and memory consolidation. *Neuron* 13:769-770.

Strange BA, Dolan RJ (2004) Beta-adrenergic modulation of emotional memory-evoked human amygdala and hippocampal responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:11454-11458.

Strange BA, Hurlmann R, Dolan RJ (2003) An emotion-induced retrograde amnesia in humans is amygdala- and beta-adrenergic-dependent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13626-13631.

Strange BA, Kroes MC, Roiser JP, Tan GC, Dolan RJ (2008) Emotion-induced retrograde amnesia is determined by a 5-HTT genetic polymorphism. *J Neurosci* 28:7036-7039.

Strekalova T, Zorner B, Zacher C, Sadovska G, Herdegen T, Gass P (2003) Memory retrieval after contextual fear conditioning induces c-Fos and JunB expression in CA1 hippocampus. *Genes Brain Behav* 2:3-10.

Suzuki A, Josselyn SA, Frankland PW, Masushige S, Silva AJ, Kida S (2004) Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J Neurosci* 24:4787-4795.

Szapiro G, Vianna MR, McGaugh JL, Medina JH, Izquierdo I (2003) The role of NMDA glutamate receptors, PKA, MAPK, and CAMKII in the hippocampus in extinction of conditioned fear. *Hippocampus* 13:53-58.

Teyler TJ, Discenna P (1984) Long-term potentiation as a candidate mnemonic device. *Brain Res* 319:15-28.

Thompson RF (1976) The search for the engram. *Am Psychol* 31:209-227.

Tronson NC, Taylor JR (2007) Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nat Rev Neurosci* 8:262-275.

Tronson NC, Wiseman SL, Neve RL, Nestler EJ, Olausson P, Taylor JR (2012) Distinctive roles for amygdalar CREB in reconsolidation and extinction of fear memory. *Learn Mem* 19:178-181.



Tronson NC, Wiseman SL, Olausson P, Taylor JR (2006) Bidirectional behavioral plasticity of memory reconsolidation depends on amygdalar protein kinase A. *Nat Neurosci* 9:167-169.

Tse D, Langston RF, Kakeyama M, Bethus I, Spooner PA, Wood ER, Witter MP, Morris RG (2007) Schemas and memory consolidation. *Science* 316:76-82.

Tse D, Takeuchi T, Kakeyama M, Kajii Y, Okuno H, Tohyama C, Bitto H, Morris RG (2011) Schema-dependent gene activation and memory encoding in neocortex. *Science* 333:891-895.

Tsoory MM, Vouimba RM, Akirav I, Kavushansky A, Avital A, Richter-Levin G (2008) Amygdala modulation of memory-related processes in the hippocampus: potential relevance to PTSD. *Prog Brain Res* 167:35-51.

Van der Zee EA, Luiten PG (1999) Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: a review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory. *Prog Neurobiol* 58:409-471.

Vianna MR, Izquierdo LA, Barros DM, Walz R, Medina JH, Izquierdo I (2000) Short- and long-term memory: differential involvement of neurotransmitter systems and signal transduction cascades. *An Acad Bras Cienc* 72:353-364.

Vinson GP, Saridogan E, Puddefoot JR, O'Mahony OA, Mahmood T, Djahanbakhch O (1999) Renin-angiotensin systems and reproduction. *Gynecol Endocrinol* 13:56-70.

von Bohlen und HO (2003) Angiotensin IV in the central nervous system. *Cell Tissue Res* 311:1-9.

von Bohlen und HO, Albrecht D (2006) The CNS renin-angiotensin system. *Cell Tissue Res* 326:599-616.

Wagner J., Chavkin CI (2002) Neuropharmacology of Endogenous Opioid Peptides. In: *Neuropsychopharmacology - 5th Generation of Progress Pennsylvania*.

Wallenstein GV, Vago DR, Walberer AM (2002) Time-dependent involvement of PKA/PKC in contextual memory consolidation. *Behav Brain Res* 133:159-164.

Wang SH, de Oliveira AL, Nader K (2009) Cellular and systems mechanisms of memory strength as a constraint on auditory fear reconsolidation. *Nat Neurosci* 12:905-912.

Wang SH, Ostlund SB, Nader K, Balleine BW (2005) Consolidation and reconsolidation of incentive learning in the amygdala. *J Neurosci* 25:830-835.

Wayman GA, Tokumitsu H, Davare MA, Soderling TR (2011) Analysis of CaM-kinase signaling in cells. *Cell Calcium* 50:1-8.

Wiltgen BJ, Brown RA, Talton LE, Silva AJ (2004) New circuits for old memories: the role of the neocortex in consolidation. *Neuron* 44:101-108.

Wolf OT, Kuhlmann S, Buss C, Hellhammer DH, Kirschbaum C (2004) Cortisol and memory retrieval in humans: influence of emotional valence. *Ann N Y Acad Sci* 1032:195-197.

Wood PL (1995) The co-agonist concept: is the NMDA-associated glycine receptor saturated in vivo? *Life Sci* 57:301-310.

Wright JW, Harding JW (1992) Regulatory role of brain angiotensins in the control of physiological and behavioral responses. *Brain Res Brain Res Rev* 17:227-262.

Wright JW, Harding JW (2004) The brain angiotensin system and extracellular matrix molecules in neural plasticity, learning, and memory. *Prog Neurobiol* 72:263-293.

Wright JW, Krebs LT, Stobb JW, Harding JW (1995) The angiotensin IV system: functional implications. *Front Neuroendocrinol* 16:23-52.

Wright JW, Reichert JR, Davis CJ, Harding JW (2002) Neural plasticity and the brain renin-angiotensin system. *Neurosci Biobehav Rev* 26:529-552.

Yasoshima Y, Sako N, Senba E, Yamamoto T (2006) Acute suppression, but not chronic genetic deficiency, of c-fos gene expression impairs long-term memory in aversive taste learning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:7106-7111.

Yeh SH, Lin CH, Lee CF, Gean PW (2002) A requirement of nuclear factor-kappaB activation in fear-potentiated startle. *J Biol Chem* 277:46720-46729.

Zarrindast MR, Jafari-Sabet M, Rezaayat M, Djahanguiri B, Rezaoyf A (2006) Involvement of NMDA receptors in morphine state-dependent learning in mice. *Int J Neurosci* 116:731-743.

Zarrindast MR, Rezaoyf A (2004) Morphine state-dependent learning: sensitization and interactions with dopamine receptors. *Eur J Pharmacol* 497:197-204.

Zarrindast MR, Shendy MM, Ahmadi S (2007) Nitric oxide modulates state dependency induced by lithium in an inhibitory avoidance task in mice. *Behav Pharmacol* 18:289-295.

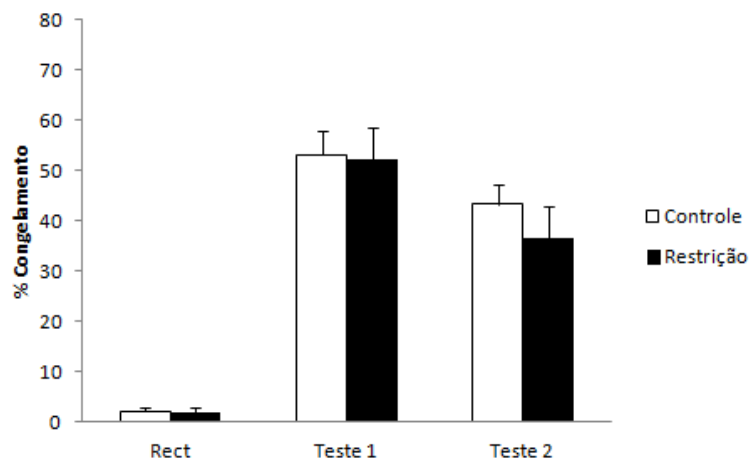
Zhuo J, Moeller I, Jenkins T, Chai SY, Allen AM, Ohishi M, Mendelsohn FA (1998)  
Mapping tissue angiotensin-converting enzyme and angiotensin AT1, AT2 and AT4  
receptors. *J Hypertens* 16:2027-2037.

## 8. ANEXO

### 8.1. Anexo I

Efeitos da restrição sobre a consolidação da memória.

Para verificar se o nosso protocolo de restrição de água poderia estabelecer uma dependência de estado durante a consolidação da memória, animais foram deixados em restrição 18 h antes do treino e condicionados sob esse estado. Posteriormente foram avaliados com e sem restrição seguindo o mesmo protocolo usado na reconsolidação.



Não foi encontrada diferença nenhuma entre os grupos durante os testes. Esse resultado permite concluir que a restrição de água não é um estímulo que pode induzir dependência de estado durante a consolidação, contrastando com nossos resultados durante a reconsolidação da memória.