

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS

ANA CAROLINA DE SOUZA DA ROSA

MECANISMOS DOPAMINÉRGICOS E GLUTAMATÉRGICOS ENVOLVIDOS NO
EFEITO MODULATÓRIO DA NOVIDADE SOBRE A PERSISTÊNCIA DA
MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO RECONSOLIDADA

Uruguaiana

2024

ANA CAROLINA DE SOUZA DA ROSA

**MECANISMOS DOPAMINÉRGICOS E GLUTAMATÉRGICOS ENVOLVIDOS NO
EFEITO MODULATÓRIO DA NOVIDADE SOBRE A PERSISTÊNCIA DA
MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO RECONSOLIDADA**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação Multicêntrico em Ciências
Fisiológicas da Universidade Federal do
Pampa, como requisito parcial para obtenção
do Título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Dra. Pâmela Billig Mello
Carpes.

Uruguaiana

2024

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

R788m Rosa, Ana Carolina de Souza da
MECANISMOS DOPAMINÉRGICOS E GLUTAMATÉRGICOS
ENVOLVIDOS NO EFEITO MODULATÓRIO DA NOVIDADE SOBRE A
PERSISTÊNCIA DA MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO RECONSOLIDADA
/ Ana Carolina de Souza da Rosa.
58 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Pampa, MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS, 2024.

"Orientação: Pâmela Billig Mello Carpes".

1. Reativação. 2. Persistência da memória. 3.
Dopamina. 4. Glutamato. 5. Hipocampo. I. Título.

ANA CAROLINA DE SOUZA DA ROSA

**MECANISMOS DOPAMINÉRGICOS E GLUTAMATÉRGICOS ENVOLVIDOS NO
EFEITO MODULATÓRIO DA NOVIDADE SOBRE A PERSISTÊNCIA DA
MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO RECONSOLIDADA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação Multicêntrico
em Ciências Fisiológicas da Universidade
Federal do Pampa, como requisito parcial
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências Fisiológicas.

Área de concentração: Ciências Fisiológicas.

Dissertação de mestrado defendida e aprovada em: 21/06/2024

Banca examinadora:

Prof.^a. Dr^a. Pâmela Billig Mello-Carpes
Orientadora
UNIPAMPA

Prof. Dr^a. Liane da Silva de Vargas
UNIPAMPA

Dr^a. Leticia Rossi Daré
UFTM

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por ter me mantido firme durante o mestrado, com saúde e força para chegar até o final. Também agradeço ao meu pai Ogum, ao qual sou devota, por toda energia, segurança e sabedoria que emana sobre mim. Ogunhê!

Sou muito grata à minha querida mãe, irmãos e tias por sempre estarem ao meu lado me apoiando ao longo desta trajetória, além de todo o esforço investido na minha formação. Em especial, à minha mãezinha, uma guerreira, que mesmo passando por momentos difíceis durante meu mestrado, sempre esteve ao meu lado me incentivando a não desistir.

Desejo um agradecimento especial à minha orientadora Pâmela por aceitar conduzir meu trabalho de pesquisa, como também contribuir muito com meu o desenvolvimento que iniciou lá na Iniciação Científica e tende a continuar. Agradeço pela excelente orientação que sempre exerce e pela paciência, compreensão, dedicação, incentivo e excelência que tem com seus alunos orientandos. Você é inspiração, Pâm!

Às minhas colegas e irmãs de trajetória, Gabriela e Karine, bem como o meu irmão Ben-Hur, agradeço por todas as contribuições durante o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pela paciência, incentivo, companheirismo e motivação durante os experimentos. Sem vocês, com certeza, tudo seria mais difícil.

À equipe do Grupo de Pesquisa em Fisiologia por todos os ensinamentos, projetos e pesquisas desenvolvidas, por fazer ciência básica de qualidade e desenvolver ótimos alunos com carreiras científicas brilhantes. Em especial, à minha equipe de ICs que estiveram presentes sempre que puderam. Anna Cecília, Bruno, Giulia, Gustavo, Pâmella e Larissa, vocês são demais!

E claro, a Universidade Federal do Pampa, à CAPES, ao CNPq, e a todos os meus professores do curso de mestrado do PPGMCF, gratidão pela contribuição e excelência de cada um!

Declaro que fui apoiada pelo Edital Carrefour 2022 - Ações afirmativas de concessão de bolsas de estudo e permanência para cursos de pós-graduação.

RESUMO

As memórias podem ser submetidas à reconsolidação, que ocorre após exposição a eventos de recuperação que reativam a memória. Isso desestabiliza temporariamente a informação consolidada, suscetível a interferências, resultando na modificação da memória original. A exposição à novidade facilita a formação e persistência da memória, envolvendo síntese e posterior captura de proteínas relacionadas à plasticidade. Assim, propomos investigar, inicialmente, o efeito da reativação, bem como da exposição à novidade sobre a reconsolidação e persistência da memória de reconhecimento de objetos (RO). Posteriormente, investigamos o envolvimento dos receptores D1/D5, da via de sinalização PKA e dos receptores glutamatérgicos na modulação da persistência da memória de RO promovida pela novidade, sistemas importantes para a modulação da memória pela novidade. A amostra foi composta por 350 ratos adultos machos Wistar que, após ambientados, todos os animais foram submetidos à tarefa de RO (sessão de treino, reativação, e testes de memória de reconsolidação ou persistência). No segundo estudo desta dissertação, todos os animais, antes da tarefa de RO, passaram pela cirurgia estereotáxica sob anestesia para implantação de cânulas-guia na região CA1 do hipocampo, para posterior infusão de drogas a fim de manipular farmacologicamente o sistema dopaminérgico, via PKA e sistema glutamatérgico. Após a reativação no RO, alguns animais foram expostos a um ambiente novo (novidade). Neste momento, para estudar o papel dos sistemas dopaminérgico e glutamatérgico, alguns animais receberam infusão de drogas. Para a análise dos resultados, o tempo de exploração dos objetos foi convertido em % do tempo total de exploração e um teste t de uma amostra (ou teste de Wilcoxon) foi usado para comparação com uma média teórica (50%). ANOVA de uma via ou Teste de Kruskal-wallis foi utilizado para comparação do índice de discriminação entre os grupos, bem como para os testes controles comportamentais. O nível de significância foi de $P \leq 0,05$. Nesta dissertação, demonstramos que a exposição à novidade após a reativação de um aprendizado melhora a reconsolidação memória, promovendo sua persistência através de mecanismos dependentes da ativação de PKA e AMPA. Além disso, parece que o efeito da novidade sobre a persistência da memória de RO reconsolidada não depende de ativação do sistema dopaminérgico no hipocampo.

Palavras-chave: Reativação; Persistência da memória; Dopamina; Glutamato; Hipocampo.

ABSTRACT

Memories can undergo reconsolidation after exposure to retrieval events that reactivate the memory. This event temporarily destabilizes the consolidated information, which is susceptible to interference and results in modifying the original memory. Exposure to novelty facilitates the formation and persistence of memory, involving synthesis and subsequent capture of proteins related to plasticity. Therefore, initially, we propose to investigate the effect of reactivation and exposure to novelty on the reconsolidation and persistence of object recognition memory (OR). Subsequently, we investigated the involvement of D1/D5 receptors, the PKA signaling pathway, and glutamatergic receptors in modulating the persistence of OR memory promoted by novelty, which are important systems for the modulation of memory by novelty. The sample consisted of 350 adult male Wistar rats; after being acclimated, all animals were subjected to the OR task (training session, reactivation, and reconsolidation or persistence memory tests). In the second study of this dissertation, all animals, before the OR task, underwent stereotaxic surgery under anesthesia to implant guide cannulas in the CA1 region of the hippocampus for subsequent drug infusion to pharmacologically manipulate the dopaminergic system, PKA via, and glutamatergic system. After reactivation in the OR, some animals were exposed to a new environment (novelty). At this time, some animals received an infusion of drugs to study the role of the dopaminergic and glutamatergic systems. To analyze the results, the object exploration time was converted into % of the total exploration time, and a one-sample t-test (or Wilcoxon test) was used for comparison with a theoretical average (50%). One-way ANOVA or Kruskal-Wallis test was used to compare the discrimination index between groups and for behavioral control tests. The significance level was $P \leq 0.05$. In this dissertation, we demonstrate that exposure to novelty after the reactivation of learning improves memory reconsolidation, promoting its persistence through mechanisms dependent on the activation of PKA and AMPA. Furthermore, it appears that the effect of novelty on the persistence of reconsolidated OR memory does not depend on the activation of the dopaminergic system in the hippocampus.

Keywords: Reactivation; Persistence of memory; Dopamine; Glutamate; Hippocampus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fases da memória de longa duração e representação esquemática da condição de redes neurais específicas (engramas) de acordo com o tempo.....	13
Figura 2: Mecanismos envolvidos na reconsolidação da memória de RO.	15
Figura 3: Hipótese de marcação e captura sináptica.	20
Figura 4: Delineamento experimental do estudo 1	26
Figura 5: Delineamento experimental do estudo 2	28
Figura 6 A-D: A exposição à novidade imediatamente após a reativação promove reconsolidação e persistência da memória de RO reconsolidada.....	35
Figura 7 A-E: Comparação do índice de discriminação dos animais nas diferentes sessões da tarefa de Reconhecimento de Objetos.	38
Figura 8 A-H: A exposição à novidade depende da via de sinalização PKA e receptores AMPA no hipocampo para promoção da persistência da memória de RO reconsolidada.	41
Figura 9 A-E: Índice de discriminação no teste de persistência é maior nos animais que tiveram ativação dos receptores NMDA no hipocampo.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: A exposição à novidade não altera a atividade locomotora e exploratória, nem o comportamento de ansiedade.	40
Tabela 2: A exposição à novidade, a cirurgia estereotáxica e a infusão não alteram a atividade locomotora e exploratória no Campo Aberto (CA), nem o comportamento de ansiedade dos animais no Labirinto em Cruz Elevado (LCE).	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MT	Memória de Trabalho
MCD	Memória de Curta Duração
MLD	Memória de Longa Duração
PRPs	Proteínas Relacionadas à Plasticidade
cAMP	Adenosina Monofosfato Cíclica
LTM	Long-term Memory
RO	Reconhecimento de Objetos
BDNF	Brain-derived Neurotrophic Factor
NMDA	N-metil-D-aspartico
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4- isoxazolpropiónico
LTP	Long-term Potention
PKA	Proteína Quinase dependente de AMPc
AMPc	Adenilato Ciclase
PKC	Proteína Quinase C
PI3K	Fosfatidil-inositol- 3-quinase
STC	Synaptic Tagging Capture
BT	Behavioral Tagging
VTA	Ventral Tegmental Area
CA1	Corno de Ammon 1
AP5	D-2-amino-5-phosphonopentanoate
uL	Microlitro
CA	Campo Aberto
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
NOVI	Novidade

Sumário

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	12
1.1	Definição, classificação e fases da memória	12
1.2	Memória de reconhecimento	16
1.3	Neurobiologia da reconsolidação da memória	17
1.4	Novidade e reconsolidação	18
2	JUSTIFICATIVA	22
3	OBJETIVOS	23
3.1	Objetivo geral	23
3.2	Objetivos específicos	23
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1	Animais e grupos experimentais	24
4.2	Delineamento experimental.....	24
4.3	Protocolos	28
4.4	Análise Estatística	33
5	RESULTADOS.....	35
5.1.1	A reativação da memória de reconhecimento promove reconsolidação, mas não a persistência da memória de RO reconsolidada.....	36
5.1.2	A exposição à novidade após a reativação da memória promove a persistência da memória de RO reconsolidada.....	37
5.1.3	O Índice de Discriminação é maior nos animais que tiveram reconsolidação e persistência da memória de RO reconsolidada	38
5.1.4	Nenhum dos procedimentos afetou os parâmetros de controle comportamental	39
5.2.1	O efeito da novidade na facilitação da persistência da memória reconsolidada não depende da ativação de receptores dopaminérgicos, mas é modulada pela via de sinalização PKA no hipocampo.....	42
5.2.2	A ativação de receptores glutamatérgicos AMPA é essencial para o efeito da novidade na persistência da memória de RO reconsolidada	43
5.2.3	O ID é maior em animais que tiveram ativação de receptores NMDA no hipocampo.....	44
5.2.4	Nenhum procedimento ou drogas infundidas no hipocampo afetaram os resultados de controles comportamentais	46
6	DISCUSSÃO	47
7	CONCLUSÃO	51
8	REFERÊNCIAS.....	52
	ANEXO I.....	57

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Definição, classificação e fases da memória

A memória pode ser definida como a capacidade de adquirir, formar e consolidar uma informação, para posterior recordação (I. Izquierdo, 2014; Mourão & Faria, 2015). Portanto, trata-se de um processo de armazenamento de informações provenientes das experiências vivenciadas, que podem ou não serem recordadas (I. Izquierdo, 2014). As memórias podem ser classificadas de algumas maneiras, incluindo o tempo de duração e o conteúdo que elas abrangem. De acordo com o conteúdo, as memórias podem ser divididas em: (i) episódicas, sendo estas referentes a experiências vivenciadas e declaradas, com informações contextualizadas em tempo e espaço (Danieli et al., 2023; I. Izquierdo, 2014; Moscovitch et al., 2016); e, (ii) semânticas, relacionadas ao conhecimento adquirido, conceitos, significados, teorias. Além destas, tem-se a memória procedural ou de procedimentos, conhecida como memória motora, que inclui habilidades motoras adquiridas que muitas vezes são executadas de maneira automática, sem a consciência explícita (I. Izquierdo, 2014; Mourão & Faria, 2015).

De acordo com o tempo de duração, as memórias são classificadas conforme o tempo em que são armazenadas e ficam acessíveis para recuperação. Essa classificação inclui a memória de trabalho (MT), um tipo de memória de curtíssimo prazo e breve retenção, referente à informação sensorial que é adquirida pelos nossos sentidos, durando de segundos até um minuto, aproximadamente (I. Izquierdo, 2014; McGaugh, 2000). A MT nos permite processar as informações em tempo real para resolução de problemas, tomada de decisões e realização de tarefas de vida diária, além de permitir que armazenemos temporariamente novas informações enquanto processamos e integramos ao nosso conhecimento prévio (I. Izquierdo, 2014), sendo, por isso, incluída dentre as nossas funções executivas. Para isso, a MT depende da atividade neural do córtex pré-frontal, região anterior do lobo frontal. O interessante é que este tipo de memória não forma arquivos.

As memórias de curta duração (MCD) são memórias que persistem no máximo por 6 horas, e utilizam-se de processos bioquímicos de curta duração que ocorrem no córtex entorrinal e hipocampo, sendo independentes de síntese proteica.

Este tipo de memória é essencial para recordarmos o que aconteceu há algumas horas e dar continuidade ao nosso tempo presente (I. Izquierdo, 2014; Squire & Bayley, 2007). Por outro lado, as memórias de longa duração (MLD) são armazenadas por períodos mais longos, de horas, até dias, meses, anos ou mesmo uma vida toda. Sua estabilização requer ativação várias enzimas que regulam a atividade de proteínas pré-existentes, ativação gênica e síntese de novas proteínas, sendo a formação deste tipo de memória dependente da síntese de proteínas relacionadas à plasticidade (PRPs). (I. Izquierdo, 2014; McGaugh, 2000; Roesler & McGaugh, 2010). Diversos estudos já demonstraram que mecanismos como o sistema de transdução de sinal cAMP são essenciais na consolidação das MLD dependentes do hipocampo (Shan et al., 2008). Todos estes processos bioquímicos e moleculares complexos envolvidos no armazenamento da MLD permitem que os neurônios desenvolvam plasticidade sináptica suficiente para ramificações e formação de conexões novas ou mais fortes (I. Izquierdo, 2014).

A MLD pode ser dividida em três fases. A primeira fase, denominada aquisição, refere-se ao momento em que a informação está sendo adquirida, a qual também é conhecida como aprendizagem (I. Izquierdo, 2014; McGaugh, 2000). O processo de aquisição depende da MT, já que envolve o processamento das informações sensoriais que estão sendo recebidas. Nas primeiras horas após sua aquisição, as MLD (LTM; do inglês *Long-Term Memory*) são lábeis e suscetíveis à interferência externa por numerosos fatores que influenciam tanto o conteúdo, como a força/persistência da memória (Figura 1) (I. Izquierdo, 2014; McGaugh, 2000).

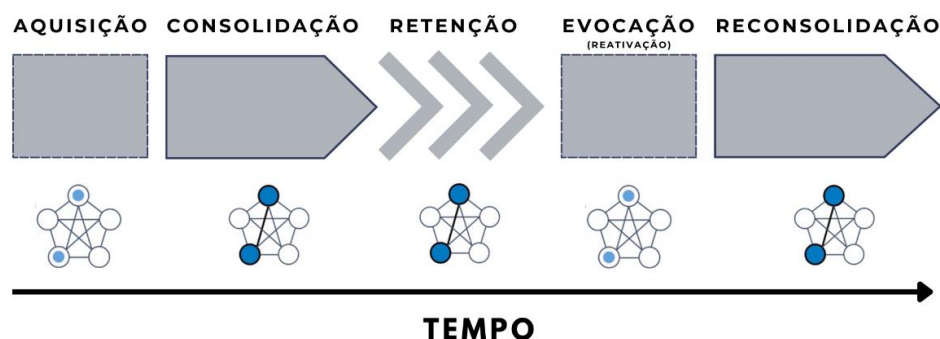


Figura 1: Fases da memória de longa duração e representação esquemática da condição de redes neurais específicas (engramas) de acordo com o tempo. (Da autora, 2024).

Conforme o processamento das informações ocorre, elas podem ser repassadas para outras áreas do cérebro ou não – se o forem se inicia o processo de consolidação da memória propriamente dita. Durante a consolidação da MLD, que, como mencionado, envolve expressão gênica e síntese de novas proteínas, o que requer tempo para ocorrer, a atividade eletroquímica de áreas como o hipocampo, garante a disponibilidade das informações adquiridas por meio da MCD. Esta segunda fase envolve diversos processos neurobiológicos complexos, que são necessários para que a informação seja armazenada; requer, portanto, um tempo maior para acontecer (Figura 1) (I. Izquierdo, 2014; McGaugh, 2000).

A consolidação da memória é passo chave para que no futuro ela possa ser evocada, e leva à estabilização temporária da informação anteriormente adquirida em redes neuronais, sendo dependente de síntese proteica e da funcionalidade do hipocampo (I. Izquierdo, 2014). Este processo pode ser explicado pelo termo “consolidação sináptica”, o qual refere-se às redes neuronais, sistemas de neurotransmissores, cascatas de sinalização e processos de transcrição gênica e tradução proteica essenciais para a formação da memória (Iván Izquierdo et al., 2006; McGaugh, 2000). A consolidação sináptica é considerada um processo rápido de mudanças moleculares que ocorrem nas redes neuronais ou traços mnemônicos (também conhecidas como engramas de memória, visto na figura 1), imediatamente após o aprendizado, e que requer mais ou menos 6 ou 8 horas para ocorrer. Este intervalo, inclusive, tem constituído uma janela de oportunidades para melhorar ou impedir a persistência de memórias de longa duração (Rossato et al., 2009).

A terceira fase é chamada de evocação, momento no qual a informação pode ser acessada, ou seja, o ato de recordar algo que foi previamente aprendido (I. Izquierdo, 2014). A consolidação e posterior evocação da memória, no entanto, não representa sua disponibilidade permanente ou imutável. Uma vez consolidadas, as memórias podem seguir por diferentes caminhos. Um deles é a reconsolidação, quando a evocação ocorre de maneira mais breve a partir de um evento de recuperação daquela memória, o que podemos chamar de reativação (I. Izquierdo, 2014). Assim, a reconsolidação da memória permite a incorporação de novas informações à memória original, ou seja, uma memória previamente consolidada em

uma rede neuronal sofre uma desestabilização (reativação) durante sua evocação, seguida de posterior reestabilização, permitindo a atualização e modificação da memória original (Nader et al., 2000). Semelhante à consolidação, o bloqueio da síntese proteica após a reativação da memória (evocação) leva à amnesia retrógrada, demonstrando que a reconsolidação também é dependente de síntese proteica. No entanto, diferente do processo de consolidação, a reconsolidação da memória é mediada por algumas diferenças em relação às estruturas cerebrais ativadas e cascatas moleculares envolvidas (Figura 1 e 2) (Orlandi et al., 2020).

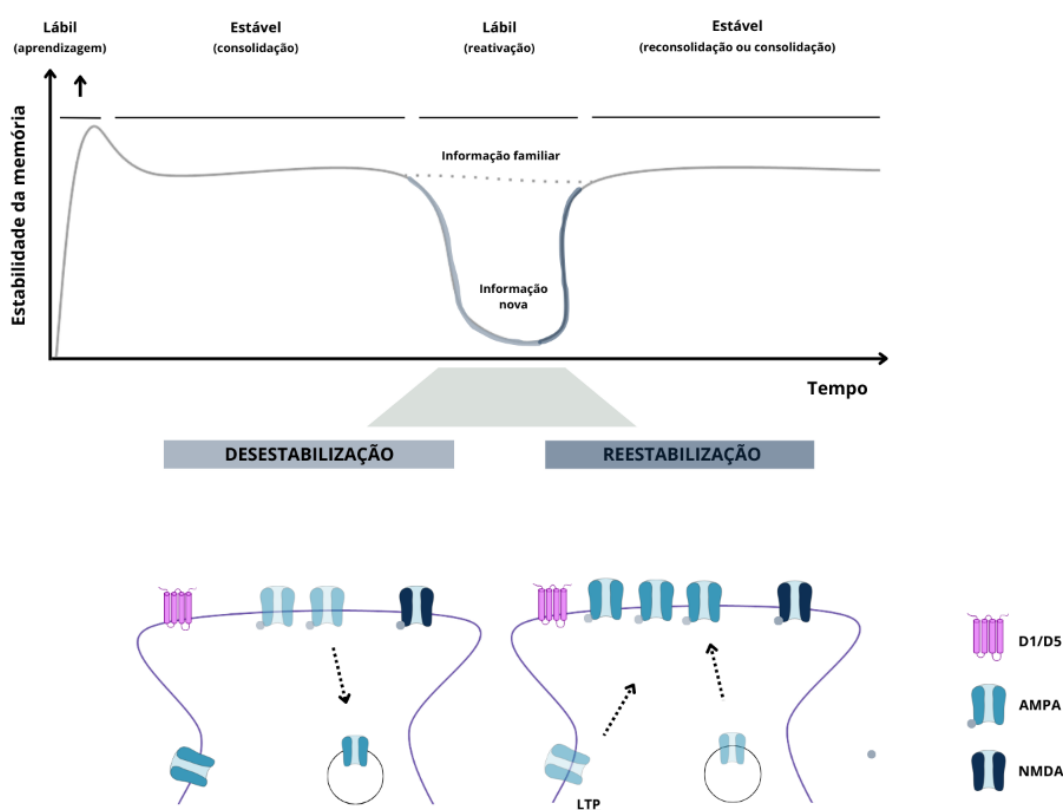


Figura 2: Mecanismos envolvidos na reconsolidação da memória de RO. Após a aprendizagem, as memórias são gradualmente estabilizadas através da consolidação. Quando expostas a eventos de recuperação e dependendo das condições prevalentes durante este processo (isto é, percepção de novas informações), as memórias consolidadas são vulneráveis a interferências farmacológicas ou comportamentais, exigindo uma fase de reconsolidação para seu armazenamento. Durante a desestabilização do traço mnemônico, há o armazenamento de receptores AMPA, no entanto os receptores dopaminérgicos D1/D5 e alguns subtipos de receptores NMDA são essenciais para a desestabilização da memória de RO. Após, inicia-se o processo de reestabilização, onde há a inserção de receptores AMPA na membrana pós-sináptica no hipocampo dorsal para atualização do traço de memória, processo conhecido como LTP, que sustenta o armazenamento da MLD. (Adaptado de Gonzalez, Radiske et al, 2019).

1.2 Memória de reconhecimento

A memória de reconhecimento é uma memória declarativa que nos garante a capacidade de identificar e distinguir características específicas de um evento (Squire et al., 2007). Este tipo de memória exige que as características específicas de um determinado evento sejam identificadas, discriminadas e comparadas com as características de memórias previamente adquiridas (Steckler et al., 1998), sendo de extrema importância, pois proporciona uma vantagem adaptativa da experiência prévia para a solução de questões inerentes à sobrevivência.

O teste de reconhecimento de objetos (RO) é usualmente usado para avaliar este tipo de aprendizado em roedores (Moses et al., 2005). Este paradigma é altamente comparável à nossa experiência humana diária, pois permite a comparação com memórias previamente adquiridas (Steckler et al., 1998), garantindo ao indivíduo a habilidade de lidar com a complexidade das situações do cotidiano, como a localização de objetos de interesse (Wang, 2018). A consolidação deste tipo de memória requer integridade funcional de várias estruturas cerebrais, incluindo o hipocampo (Wang, 2018). No entanto, o tempo de encontro com os objetos na tarefa de RO frequentemente é muito breve, e este tipo de estímulo geralmente envolve pouca ativação emocional, o que, em roedores, leva ao decaimento da memória com o tempo (Mello-Carpes et al., 2016; Wang, 2018). Portanto, este é um modelo interessante para estudar intervenções que possam contribuir com a persistência deste tipo de memória.

Como previamente mencionado, após consolidadas, as memórias podem ser submetidas à reconsolidação, que ocorre após a exposição a eventos de recuperação que reativam a memória (Nader et al., 2000). Essa recuperação desestabiliza temporariamente a informação previamente consolidada, que passa por um novo processo de consolidação, suscetível a interferências e que pode resultar na modificação da MLD original (Orlandi et al., 2020). De fato, parte das funções biológicas da reconsolidação seria manter a relevância de informações armazenadas; neste contexto, a reativação seriam um indicador que a memória é importante e deve se manter o mais detalhada possível para facilitar a sua correta evocação (Lee, 2010).

1.3 Neurobiologia da reconsolidação da memória

Sabe-se que a função essencial da reconsolidação da memória é a atualização de informações, e, por isso, o papel da nova informação adjacente à evocação é de fundamental importância, pois pode potencializar ou interferir na reestabilização da informação previamente armazenada no hipocampo (Lee, 2010). No entanto, para participação funcional do hipocampo na reconsolidação da memória, é necessária a detecção de novidade no momento da reativação (Figura 2) (Maria Carolina Gonzalez, Rossato, et al., 2019; Lee, 2010).

A reconsolidação da memória depende de várias moléculas envolvidas na manutenção da potenciação a longo prazo, mecanismo eletrofisiológico importante para estabilização das MLD (Maria Carolina Gonzalez, Radiske, et al., 2019). Já foi demonstrado que o Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF; do inglês *Brain Derived Neurotrophic Factor*), uma neurotrofina envolvida na formação da MLD de reconhecimento no hipocampo, modula o traço da memória de reconhecimento na reconsolidação (Radiske et al., 2017).

Além do BDNF, outros fatores neurobiológicos têm sido investigados nesse aspecto. O sistema glutamatérgico também tem um papel importante na modulação reconsolidação da memória (Moncada et al., 2011; Vianna et al., 2000). A fim de contestar a importância do sistema glutamato na reconsolidação, deve-se examinar os componentes básicos deste sistema (mais notavelmente, receptores glutamatérgicos). Receptores de glutamato têm uma história estabelecida de importância para a plasticidade sináptica da aprendizagem e da memória (Moncada et al., 2011; Radiske et al., 123 C.E.). Especificamente, receptores N-metil-D-aspartico (NMDA) e receptores α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-receptores do ácido isoxazolepropionico (AMPA) são cruciais para um tipo de plasticidade chamada de potenciação de longo prazo (LTP, do inglês *Long-Term Potention*) (Nader & Hardt, 2009). A expressão dos receptores glutamatérgicos AMPA é necessária para indução da LTP, além de estarem envolvidos na reestabilização do traço mnemônico pela sua inserção na membrana pós-sináptica em sinapses hipocampais durante a reconsolidação (Figura 2) (Maria Carolina Gonzalez, Radiske, et al., 2019). Já a ativação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA inicia cascatas de sinalização que alteram a expressão gênica e a força sináptica, promovendo a aprendizagem e a

consolidação da memória. A ativação do receptor NMDA tem sido necessária para a reconsolidação (Moncada et al., 2011; O'Carroll & Morris, 2004; Vianna et al., 2000). Já foi descrito, por exemplo, que a administração de um antagonista dos receptores NMDA na região ventro-medial do córtex pré-frontal após a reativação da memória resulta na ruptura da reconsolidação em uma tarefa de reconhecimento de objetos (Akirav & Maroun, 2006).

O sistema dopaminérgico também desempenha um papel essencial na modulação da plasticidade sináptica e formação de memória no hipocampo (C. R.G. Furini et al., 2014). Está bem estabelecido que diferentes famílias de receptores dopaminérgicos medeiam a interação da dopamina: família D1 (receptores D1 e D5) e família D2 (receptores D2, D3 e D4). No entanto, os receptores da família D1 regulam significativamente a plasticidade sináptica e a memória dependente do hipocampo (Bethus et al., 2010). Os receptores D1 e D5 modulam diferentes sub-regiões do hipocampo, como o giro denteado, região CA1 e subículo, que desempenham papéis diferentes na modulação da informação (Bethus et al., 2010; Lemon & Manahan-Vaughan, 2006). Estudos anteriores já demonstraram que a funcionalidade dos receptores D1 e D5 é essencial para que ocorra a desestabilização da memória de RO (María Carolina Gonzalez et al., 2021; Rossato et al., 2015). Ainda, é importante destacar que, embora o mesmo neurotransmissor os ative, os receptores D1 e D5 culminam em cascatas de sinalização distintas; os receptores D1 modulam indiretamente a proteína quinase dependente de AMPc (PKA) através da sinalização da adenilato ciclase (AMPc), enquanto os receptores D5 mediam acoplamento ao sistema P (PI3K), que regula a proteína quinase C (PKC). A droga antagonista da família D1 SCH 23390 não discrimina entre D1 e receptores D5, mas existem drogas que atuam em seus segundos mensageiros específicos (PKA e PKC); assim, é possível adotar estratégias farmacológicas a fim de verificar se um bloqueio ou estimulação específica de via de um ou outro receptor altera os processos de diferentes memórias, inferindo o papel de cada tipo de receptor (da Silva de Vargas et al., 2017; Ihalaenen et al., 1999).

1.4 Novidade e reconsolidação

Sabendo que a consolidação da memória ocorre em uma janela temporal após a aquisição, e que diferentes fatores podem influenciar esse processo, como

também a persistência da memória, estratégias visando melhorar uma memória a partir desta janela temporal têm sido investigadas (Ballarini et al., 2009). Estudos prévios demonstraram que a exposição à novidade facilita a aprendizagem, melhorando a consolidação da memória e persistência de diferentes tipos de MLD (Lima et al., 2021; Menezes et al., 2015; Moncada & Viola, 2007). Este fenômeno é baseado na hipótese de marcação e captura sináptica (STC; do inglês *Synaptic Tagging and Capture*), que afirma que uma experiência fraca, que inicialmente formaria apenas uma memória de curta duração, sem envolver síntese de novas proteínas, pode capturar proteínas relacionadas à plasticidade (PRPs) quando uma experiência forte, que induz a síntese proteica, for associada a ela, formando uma MLD (Figura 3) (Frey & Morris, 1998; Moncada & Viola, 2007).

Neste mesmo contexto, já é estabelecido que a exposição a um ambiente novo durante uma janela de tempo crítica é capaz de induzir a síntese de proteína as e promover a formação de uma MLD a partir de um aprendizado fraco. Este processo comportamental é denominado de marcação comportamental (BT; do inglês *behavioral tagging*), sendo amplamente estudado adjacente à consolidação da memória. Estudos anteriores demonstram que a exposição a uma novidade pode modular o aprendizado fraco paralelo, em uma janela de tempo específica, promovendo a consolidação da MLD (Moncada & Viola, 2007) e a persistência ao longo de dias (Rossato et al., 2007). Sabendo disso, ainda resta o questionamento: A exposição à novidade na janela temporal da reconsolidação também tem efeitos positivos sobre a persistência da memória reconsolidada, já que ele é capaz de melhorar a consolidação?

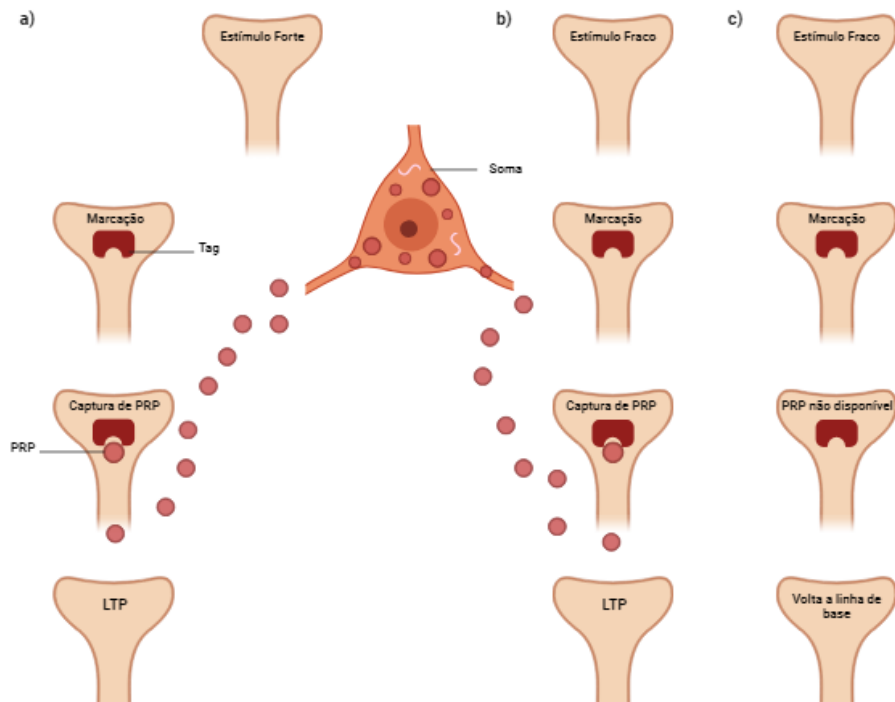


Figura 3: Hipótese de marcação e captura sináptica. a) A forte tetanização de uma via sináptica leva a dois eventos dissociáveis: a configuração local da etiqueta (tag - marcação) e a síntese de proteínas relacionadas à plasticidade difusíveis (PRPs). Os PRPs são então capturados por sinapses marcadas, e isso é necessário para a manutenção da LTP. A exposição à novidade promove a síntese de PRPs. b) Um conjunto de sinapses fracamente estimulado que tem acesso aos PRPs também conseguirá manter a LTP. O aprendizado no RO pode servir de exemplo, capturando as PRPs. c) Sem a disponibilidade de PRPs, a marcação das sinapses e a LTP não serão sustentadas. (Adaptado de Redondo&Morris, 2011).

Processos que utilizam um segundo evento comportamental em uma janela de tempo específica antes ou após o aprendizado, como a exposição à novidade, vem sendo amplamente estudados e utilizados para melhorar a memória (Menezes et al., 2015; Wang, 2018). Também, a persistência de MLD depende de mecanismos de BT (Ballarini et al., 2009). Recentemente, publicamos um estudo que mostra que a ativação de receptores dopaminérgicos D1 e da via de sinalização PKA no hipocampo são essenciais para o efeito da novidade na persistência da memória de reconhecimento (Lima et al., 2021). A exposição à novidade envolve liberação de dopamina no hipocampo e promove persistência da memória de RO pela modulação da consolidação (Duszkiewicz et al., 2019). Este mecanismo envolve a ativação de neurônios dopaminérgicos da área tegumentar ventral (VTA; do inglês *Ventral Tegmental Area*), cujos axônios inervam a região CA1 do hipocampo, estimulando

receptores dopaminérgicos D1 nessa estrutura, resultando em rápida síntese e liberação imediata do BDNF no hipocampo. A ativação do sistema dopaminérgico culmina com o fortalecimento de sinapses hipocampais que participam da consolidação e persistência da memória por pelo menos duas a três semanas a mais (Lima et al., 2021; Rossato et al., 2009). É importante entender se esse efeito também ocorre por mecanismos de reconsolidação.

Por isso, além dos seus efeitos na modulação da consolidação do aprendizado, atualmente têm sido pesquisados os efeitos da novidade na reconsolidação, a partir da reativação da memória de RO. A via de sinalização PKA, 2º mensageiro de receptor dopaminérgico D1 hipocampal, parece ser essencial para síntese de proteínas e estabelecimento de etiquetas (*tags*) sinápticas de BT durante a reconsolidação (Orlandi et al., 2020), visto que, quando inibida, resulta em amnésia da memória de RO espacial, mesmo quando a novidade está envolvida na reativação (Orlandi et al., 2020). A ativação de receptores NMDA no hipocampo também está envolvida na síntese de PRPs, desencadeada por várias tarefas de aprendizado dependentes do hipocampo (Moncada et al., 2011). Estudos anteriores demonstraram que a ativação dos receptores glutamatérgicos é crucial para definir a etiqueta (*tag*) de aprendizagem, e essa maquinaria requer a via de sinalização PKA (Moncada et al., 2011). Além disso, receptores AMPA recentemente vêm sendo citados como essenciais para a reconsolidação da memória de RO, além de estar envolvido na labilização do traço mnemônico (Cristiane R.G. Furini et al., 2020).

Apesar dos conhecimentos supracitados, que denotam o papel de diversos mecanismos neurobiológicos envolvidos na modulação da reconsolidação pela novidade, destacando a importância da via PKA e sistema glutamatérgico, pouco sabemos sobre o envolvimento destes mecanismos nos efeitos na persistência da memória reconsolidada no nosso paradigma de RO.

2 JUSTIFICATIVA

Em estudos anteriores, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a exposição à novidade é um importante modulador da consolidação e persistência de diferentes tipos de memória (Lima et al., 2021; Menezes et al., 2015). Além disso, nosso grupo publicou recentemente um estudo que demonstra o envolvimento do sistema dopaminérgico no efeito da novidade, através da ativação do receptor D1 e via de sinalização PKA (Lima et al., 2021). Estudo de outro grupo também indica que a via de sinalização PKA é importante na modulação da reconsolidação pela novidade (Orlandi et al., 2020). O envolvimento do sistema glutamatérgico na marcação comportamental induzida pela novidade também vem sendo estudado e parece ter um papel importante na modulação da consolidação da memória pela novidade, através do envolvimento dos receptores NMDA e AMPA (Moncada et al., 2011; Vianna et al., 2000). No entanto, pouco se sabe sobre o envolvimento destes mecanismos na modulação da reconsolidação da memória e seus efeitos na persistência da memória de RO reconsolidada pela novidade.

Este estudo pretende ampliar o conhecimento da linha de pesquisa Neurofisiologia e Comportamento, especificamente da neurobiologia da memória, através do entendimento dos mecanismos neuroquímicos envolvidos nos efeitos de uma estratégia não invasiva na reconsolidação e persistência de um aprendizado reconsolidado. Estes entendimentos são passos importantes para posterior aplicabilidade de uma estratégia não invasiva para melhora da retenção e persistência da memória em pessoas saudáveis e para tratamentos relacionados à déficits mnemônicos, assim como para o futuro desenvolvimento de terapias farmacológicas que atuem nas vias de sinalização envolvidas, uma vez que estas estejam elucidadas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Investigar o envolvimento do sistema dopaminérgico e da via de sinalização PKA, assim como do sistema glutamatérgico, no efeito modulatório da exposição à novidade sobre a reconsolidação e persistência da memória de reconhecimento de objetos reconsolidada.

3.2 Objetivos específicos

- Confirmar que a exposição à novidade na janela temporal da reconsolidação facilita a reconsolidação e a persistência da memória de reconhecimento de objetos reconsolidada em ratos Wistar;

- Verificar se a estimulação farmacológica não seletiva dos receptores dopaminérgicos da família D1 e estimulação farmacológica seletiva dos receptores NMDA têm efeitos semelhantes à exposição à novidade, sobre a persistência da memória de reconhecimento de objetos reconsolidada em ratos Wistar;

- Verificar os efeitos da estimulação e inibição hipocampal farmacológica do receptor da família D1, assim como da inibição de PKA (segundo mensageiro dos receptores D1), após a exposição à novidade, sobre a persistência da memória de reconhecimento de objetos reconsolidada em ratos Wistar;

- Verificar os efeitos da inibição hipocampal farmacológica do receptor NMDA após a exposição à novidade sobre a persistência da memória de reconhecimento de objetos reconsolidada em ratos Wistar;

- Verificar os efeitos da inibição hipocampal farmacológica do receptor AMPA após a exposição à novidade sobre a persistência da memória de reconhecimento de objetos reconsolidada em ratos Wistar.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais e grupos experimentais

A amostra deste estudo foi composta por **350** ratos adultos machos da raça Wistar (3 meses de idade; 300-350g de peso corporal). Os animais foram alocados em caixas plásticas especiais com capacidade para 4 animais, forradas com maravalha autoclavada e mantidos em um ciclo claro/escuro de 12h (luz a partir das 7h e escuro a partir das 19h), com água e ração à vontade, uma temperatura ambiente de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar a $50 \pm 10\%$. As caixas foram trocadas e limpas a cada 2 dias. Trata-se de um estudo com animais experimentais, desta forma tamanho amostral (número de animais por grupo) foi definido com base em estudos da área, sendo que o máximo de precaução foi tomado, com o intuito de reduzir o número de animais utilizados e minimizar o seu sofrimento (Maria Carolina Gonzalez, Radiske, et al., 2019; Maria Carolina Gonzalez, Rossato, et al., 2019; Orlandi et al., 2020; Rossato et al., 2019). Todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas dos “*Principles of laboratory animal care*” (NIH publication Nº 85-23, revised 1996) e aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal do Pampa (protocolo 028/2022 - Anexo I). Os animais foram mantidos em condições padrão de Biotério.

4.2 Delineamento experimental

Trata-se de um estudo randomizado cego, o qual teve como objetivo geral investigar o envolvimento do sistema dopaminérgico e da via de sinalização PKA, bem como do sistema glutamatérgico, no efeito modulatório da exposição à novidade sobre a persistência da memória de reconhecimento de objetos reconsolidada.

4.2.1 **Estudo 1:** Investigação do efeito modulatório da novidade sobre a reconsolidação da memória de RO e persistência da memória reconsolidada.

4.2.1.1 **Procedimentos:** Os animais foram divididos em 4 grupos (n = 26-31/grupo), conforme delineamento experimental ilustrado na figura 4:

- i. **Controle:** os animais foram treinados na tarefa de RO, submetidos a uma sessão de reativação da memória, e, 24h após a reativação foram testados na tarefa de RO.
- ii. **Controle + Persistência:** os animais foram treinados na tarefa de RO, submetidos a uma sessão de reativação da memória, e, 7 dias após o treino eles foram testados na tarefa de RO.
- iii. **Novidade:** os animais foram treinados na tarefa de RO, submetidos a uma sessão de reativação da memória, e, imediatamente após a sessão de reativação, foram expostos à uma novidade (ambiente novo) durante 5 minutos; 24h após a reativação eles foram testados na tarefa de RO.
- iv. **Novidade + Persistência:** os animais foram treinados na tarefa de RO, submetidos a uma sessão de reativação da memória, e, imediatamente após a sessão de reativação, foram expostos à uma novidade (ambiente novo) durante 5 minutos; 7 dias após a reativação eles foram testados na tarefa de RO.

Na sessão de teste de memória de RO cada um dos grupos foi subdividido em 3 grupos, cuja memória foi testada com diferentes conjuntos de objetos, sendo um objetivo novo (D) associado a: (i) um ao qual o animal foi exposto na sessão de aprendizagem e na de reativação (A); (ii) um ao qual foi exposto apenas na sessão de aprendizagem (B); ou (iii) um ao qual foi exposto apenas na sessão de reativação (C).



Figura 4: Delineamento experimental do estudo 1: Ratos machos adultos foram submetidos à habituação da tarefa de memória de RO durante 4 dias, 20 min por dia. 24h após a habituação todos os animais foram submetidos ao treino no RO, permitindo explorar os objetos A e B previamente desconhecidos por 5 min. 24 h após o treino, todos os animais foram submetidos a sessão de reativação durante 5 min, onde o objeto A (familiar) permaneceu na caixa acompanhado do objeto C (novo). Imediatamente após a reativação os animais dos grupos novidade foram submetidos à exposição a um ambiente novo. O teste de memória de longa duração foi realizado 24 h após a reativação, com animais do grupo controle e novidade, quando eles foram aleatoriamente distribuídos em 3 subgrupos e tiveram 5 min para explorar livremente os objetos A (reativado) e D (novo) – grupo 1; B (familiar do treino) e D (novo) – grupo 2; ou C (familiar da reativação) e D (novo) – grupo 3. O teste de persistência da memória de RO foi realizado 7 dias após a reativação, com outros animais, do grupo Controle + Persistência e Novidade + Persistência, permitindo 5 min de livre exploração aos objetos A (reativado) e D (novo) – grupo 1; B (familiar do treino) e D (novo) – grupo 2; e C (familiar da reativação) e D (novo) – grupo 3.

4.2.2 Estudo 2: Investigação do envolvimento do sistema dopaminérgico (através da manipulação farmacológica dos receptores D1 e via de sinalização PKA) e do sistema glutamatérgico (através da manipulação farmacológica dos receptores AMPA e NMDA) na modulação da reconsolidação e na persistência da memória de RO pela novidade.

4.2.2.1 Procedimentos: Os animais foram divididos em 8 grupos (n = 14-30/grupo), conforme delineamento experimental ilustrados na figura 5:

- i. **Controle:** os animais foram treinados na tarefa de RO, submetidos a uma sessão de reativação da memória, recebendo infusão intrahipocampal de solução salina imediatamente após a reativação; 7 dias após a reativação eles foram testados na tarefa de RO;
- ii. **Novidade:** os animais foram treinados na tarefa de RO, submetidos a uma sessão de reativação da memória, e imediatamente após a reativação

foram expostos à uma novidade (ambiente novo) durante 5 minutos, recebendo infusão intrahipocampal de solução salina; 7 dias após a reativação eles foram testados na tarefa de RO;

- iii. **Novidade + SCH23390:** os animais passaram pelos mesmos procedimentos do grupo (ii), no entanto, logo após a exposição à novidade, ao invés de salina, receberam infusão intrahipocampal de SCH23390 (antagonista não-seletivo dos receptores D1/D5);
- iv. **Novidade + Rp-cAMPS:** os animais passaram pelos mesmos procedimentos do grupo (ii), no entanto, logo após a exposição à novidade, ao invés de veículo, receberam infusão intrahipocampal de Rp-cAMPS (inibidor de PKA, segundo mensageiro dos receptores D1);
- v. **SKF 38393:** os animais foram treinados na tarefa de RO e submetidos a uma sessão de reativação da memória, recebendo infusão intrahipocampal de SKF 38393 (agonista D1/D5) imediatamente após a sessão de reativação no RO; 7 dias após a reativação eles foram testados na tarefa de RO;
- vi. **Novidade + AP5:** os animais passaram pelos mesmos procedimentos do grupo (ii), no entanto, logo após a exposição à novidade, ao invés de veículo, receberam infusão intrahipocampal de AP5 (antagonista dos receptores NMDA);
- vii. **Novidade + NBQX:** os animais passaram pelos mesmos procedimentos do grupo (ii), no entanto, logo após a exposição à novidade, ao invés de veículo, receberam infusão intrahipocampal de NBQX (antagonista dos receptores AMPA);
- viii. **NMDA:** os animais foram treinados na tarefa de RO e submetidos a uma sessão de reativação da memória, recebendo infusão intrahipocampal de NMDA (agonista glutamatérgico), imediatamente após a sessão de reativação no RO; 7 dias após a reativação eles foram testados na tarefa de RO;

Na sessão de teste da persistência da memória de RO reconsolidada, 7 dias após a reativação, cada um dos grupos foi subdividido em 3 subgrupos, cuja memória

será testada com diferentes conjuntos de objetos, sendo um objeto novo (D) associado a: (i) um objeto ao qual o animal foi exposto na sessão de aprendizagem e na de reativação (A); (ii) um objeto ao qual o animal foi exposto apenas na sessão de aprendizagem inicial (B); ou, (iii) um objeto ao qual o animal foi exposto apenas na sessão de reativação (C).

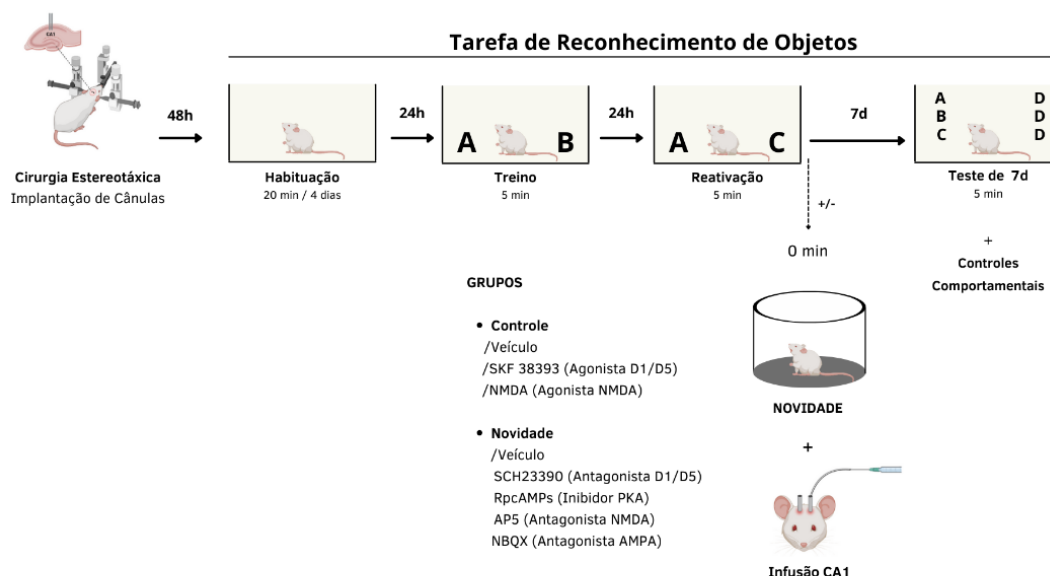


Figura 5: Delineamento experimental do estudo 2: Inicialmente, ratos Wistar machos adultos foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas guia na região CA1 do hipocampo. Após recuperação, os animais foram submetidos à habituação da tarefa de memória de RO durante 4 dias, 20 min por dia. 24h após a habituação todos os animais foram submetidos ao treino no RO, permitindo explorar os objetos A e B previamente desconhecidos por 5 min. 24 h após o treino, todos os animais foram submetidos a sessão de reativação durante 5 min, onde o objeto A (familiar) permaneceu na caixa acompanhado do objeto C (novo). Os animais dos grupos novidade foram submetidos à exposição a um ambiente imediatamente após a reativação. 5 min após a reativação, ou imediatamente após a novidade, os animais receberam a infusão de veículo ou droga específica, de acordo com o grupo. O teste de persistência da memória de RO foi realizado 7 dias após a reativação.

4.3 Protocolos

4.3.1 Manipulação dos animais

Os animais passaram por sessões de manipulação durante 1 semana antes da cirurgia estereotáxica, quando os mesmos foram levados até a sala de experimentação, retirados de suas gaiolas e manuseados durante 5 minutos, para familiarização com a pesquisadora e demais membros da equipe, seus contatos e

seus cheiros.

4.3.2 Cirurgia estereotáxica

Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas guia de 0,2 mm de calibre na região CA1 do hipocampo dorsal (Rossato et al., 2010), de acordo com as coordenadas para a região CA1 do hipocampo do Atlas de Paxinos e Watson: ântero-anterior - 4,2 mm, látero-lateral $\pm$ 3,0 mm, dorso-ventral - 3,0 mm (Paxinos & Charles Watson, 2007) – apenas no caso da coordenada dorso-ventral, foi utilizada a medida de 2,0 mm para inserção da cânula, com o objetivo de reduzir o dano ao tecido cerebral. Após, no momento da infusão das drogas de interesse, profundidade adicional foi considerada para que a estrutura-alvo fosse atingida. As cânulas foram fixadas com cimento dental e os animais ficaram sob observação para recuperação pós-operatória por 4 dias.

Todo o procedimento foi realizado com os animais previamente anestesiados com cetamina e xilazina, administrados intraperitonealmente (i.p.), nas doses de 75mg/kg e 10mg/kg, respectivamente. Os procedimentos operatórios envolveram cuidados com assepsia, instrumental cirúrgico e manutenção da temperatura corporal e hidratação dos animais. Após o término da cirurgia estereotáxica, os animais receberam a injeção subcutânea de anti-inflamatório Meloxicam (0,2mg/kg) a fim de diminuir sinais de dor e inflamação no pós-operatório (PO). Perdas de animais no PO foram observadas, sendo algumas por conta de cânulas mais baixas, o que poderia dar acesso à outra região que não fosse a CA1, o que não era nosso objetivo; e a maioria delas, por consequência do próprio procedimento cirúrgico.

4.3.3 Tarefa de Reconhecimento de Objetos (RO) - habituação, treino e reativação da memória

A habituação, treino, reativação e o teste de memória de RO (Ennaceur, 2010; Rossato et al., 2007) foram realizados em uma caixa de madeira com a parte frontal de vidro transparente (60cm x 60cm). O procedimento inicial consistiu na habituação

dos animais a caixa, para familiarização ao ambiente, de modo que cada rato foi colocado individualmente, durante 4 dias consecutivos, 20 min/dia, no interior da caixa, para exploração livre antes do primeiro ensaio de reconhecimento de objetos. Após os dias de habituação, dois objetos diferentes (A e B) foram colocados na caixa para que os animais explorassem livremente durante 5 min (sessão de treino). Os objetos utilizados são feitos de plástico, vidro e outros materiais com as mesmas características, como altura (não superior a 10 cm), profundidade e textura, de forma que os animais não apresentassem preferência nata por um dos objetos. Após 24 horas do treino, um dos objetos foi aleatoriamente substituído por um novo objeto (C) e os animais foram colocados novamente no aparato por mais 5 min para livre exploração, para reativação da memória e evocação do objeto A, ao qual os animais já haviam sido expostos no dia do treino, além da atualização ou consolidação da memória de RO dada a presença do objeto C, desconhecido ao animal (sessão de reativação).

4.3.4 Exposição à novidade

Para estudar os efeitos modulatórios da novidade na reconsolidação da memória, alguns animais foram expostos a uma novidade imediatamente após a sessão de reativação no RO. Para tal, foram colocados em um aparato circular (90 cm de diâmetro e 50 cm de altura), previamente desconhecido, para livre exploração durante 5 minutos (Menezes et al., 2015).

4.3.5 Drogas e tratamentos

Diferentes drogas foram infundidas no hipocampo dos animais após a reativação da memória de RO, associadas ou não à exposição à novidade, dependendo do grupo experimental. As drogas foram diluídas em DMSO ou salina, de acordo com as recomendações do fabricante, sendo as doses administradas na região CA1 do hipocampo baseadas na literatura (C. R.G. Furini et al., 2014; Hou et al., 2009; Iván Izquierdo et al., 2006): SKF 38393, 12.5µg/µL (agonista dopaminérgico); SCH 23390, 1µg/µL (antagonista dopaminérgico); RpcAMPS 0.5µg/µL (inibidor da PKA, segundo mensageiro dos receptores dopaminérgicos D1);

Sp-cAMP 0.5µg/ml (estimulador de PKA), NMDA 0,1 ug/ul (agonista glutamatérgico); AP5 2,5 ug/ul (antagonista dos receptores glutamatérgicos NMDA); e, NBQX 0,5 ug/ul (antagonista dos receptores glutamatérgicos AMPA).

A infusão de drogas ou veículo (1µL/lado) foi realizada por experimentadores treinados, através de cânulas guias previamente implantadas na região CA1 do hipocampo dorsal por cirurgia estereotáxica, conforme previamente descrito, com auxílio de uma seringa Hamilton (VWR, França). No momento da infusão das drogas, as agulhas de infusão foram inseridas nas cânulas guia. As agulhas foram preparadas à fim de atingir uma determinada profundidade em relação à cânula para alcançar a região de interesse, respeitando as coordenadas de Paxinos & Watson. Foram considerados 1,0 mm de profundidade adicional à cânula para CA1 do hipocampo (agulha de tamanho 10 mm).

Ao final dos experimentos comportamentais, a colocação de cânulas foi verificada pós-morte conforme descrito anteriormente (da Silva de Vargas et al., 2017; Neves et al., 2020). Em resumo, 2 a 4 horas após o último teste comportamental, uma solução de 4% de azul de metileno foi infundida no mesmo volume usado nos experimentos, e a extensão do corante, 30 min depois, foi tomada como uma indicação da difusão presumível do veículo ou droga previamente administrada a cada animal. Para esta verificação, após a eutanásia, perfusão transcardíaca, fixação do tecido cerebral em formaldeído, crioproteção em sacarose 30%, e congelamento a -80°C, cortes histológicos poderiam ser realizados com auxílio do criostato, a fim de visualizar a localização das cânulas e difusão da solução.

4.3.6 Testes de RO - reconsolidação e persistência da memória reconsolidada

Vinte e quatro horas depois da sessão de reativação (fase de teste), os ratos foram distribuídos aleatoriamente em três subgrupos diferentes. O subgrupo 1 foi reintroduzido na caixa de RO e apresentado a um dos objetos que aos quais havia sido apresentado durante a sessão de treino (objeto A) associado a um objeto novo (objeto D). Esperava-se que o animal que reconsolidou a memória do objeto A explorasse mais tempo o objeto D. O subgrupo 2 foi tratado como grupo 1, exceto que

o objeto familiar apresentado junto com o novo objeto D foi o objeto B. Neste grupo, esperava-se que o animal que consolidou a memória do objeto B junto à do objeto A no dia do treino, explorasse por mais tempo o objeto D. Por fim, o subgrupo 3 foi apresentado ao novo objeto D associado a um objeto que havia sido introduzido durante a fase de reativação (isto é, objeto C). Assim, esperava-se que o animal que atualizou a memória do objeto A com adição do objeto C, ou seja, reconsolidou a memória, ou até mesmo consolidou a memória em um traço independente, explorasse mais tempo o objeto D. Após 7 dias do treino, os mesmos procedimentos de testes foram adotados, para avaliação da persistência da memória, mas com grupos de animais diferentes, não testados 24h após a reativação, a fim de evitar interferências de reconsolidação. Além disso, a fim de evitar interferências olfativas ou preferências pelos objetos, a caixa e os objetos foram limpos com etanol 70% entre os testes.

4.3.7 Experimentos de Controle Comportamental

Após as sessões de teste na tarefa de RO foram realizados testes de controle comportamental para garantir que os resultados observados se referiam à memória de fato, e não a outras alterações comportamentais que poderiam ser decorrentes dos procedimentos adotados, como cirurgia ou infusão de drogas.

4.3.7.1 Campo aberto (CA):

Para avaliar se a cirurgia ou a administração dos fármacos não afetou a atividade locomotora e o comportamento exploratório dos animais no dia do teste, utilizamos a análise do comportamento de locomoção/exploração no esquema conhecido como “campo aberto” (Bonini et al., 2006). A tarefa foi realizada utilizando uma caixa cujo assoalho foi dividido em 12 quadrantes com igual área de superfície. Durante 5 minutos registramos o número de linhas cruzadas e o número de elevações sobre as patas traseiras, comportamentos que nos roedores denotam exploração (Bonini et al., 2006).

4.3.7.2 Labirinto em Cruz Elevado (LCE):

Para avaliar se a cirurgia ou a administração dos fármacos não afetou o estado de ansiedade dos animais no dia do teste, utilizamos a tarefa do labirinto em cruz elevado. Este labirinto consiste em uma plataforma em cruz com 40 centímetros de comprimento em cada braço, posicionada a 1 metro de altura; dois braços contralaterais do labirinto possuem paredes elevadas, sendo denominados fechados, e os outros dois não possuem paredes, sendo denominados abertos. O animal foi colocado no centro do LCE e deixado livre para explorar por 5 minutos. Registramos o tempo de permanência e o número de entradas nos braços abertos e fechados. Quanto mais ansioso estivesse o animal, maior o tempo de permanência e o número de entradas nos braços fechados (Bevilaqua et al., 2003).

4.4 Análise Estatística

A análise estatística foi conduzida com o auxílio do programa Excel for Windows® e Graph Pad Prism version 8 (GraphPad Software®, San Diego, CA).

Para a análise dos resultados, o tempo de exploração dos objetos na tarefa de RO foi convertido em porcentagem do tempo total de exploração e um teste t de uma amostra (ou equivalente não-paramétrico - teste de Wilcoxon, no caso de distribuição não paramétrica dos dados) foi usado para comparar a porcentagem do tempo total de exploração para cada objeto a partir de uma média teórica (50%). Esta análise permite avaliar se houve ou não aprendizado por parte dos animais dos diferentes grupos, permitindo uma análise dual (aprendeu x não aprendeu).

Adicionalmente, o índice de discriminação (ID) nos testes de retenção foi determinado pela diferença de tempo gasto explorando os objetos novos (t novo) e familiares (t familiar): $ID = [(t \text{ novo} - t \text{ familiar}) / (t \text{ novo} + t \text{ familiar}) \times 100 (\%)]$; os dados de ID foram analisados considerando sua normalidade, sendo adotado um teste estatístico paramétrico ou não-paramétrico para comparação entre os grupos (ANOVA ou Kruskal- Wallis). Esta análise permite inferir se animais de um grupo aprenderam mais que outros, já que permite a comparação entre eles.

Uma ANOVA ou teste de Kruskal-Wallis, a depender da distribuição dos dados, foi utilizada para análise dos dados do tempo total de exploração no RO, CA e LCE.

Todos os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. O nível de significância considerado em todas as análises foi de $P \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Estudo 1: Investigação do efeito modulatório da novidade sobre a reconsolidação da memória de RO e persistência da memória reconsolidada

Todos animais do estudo 1 foram treinados na tarefa de RO com dois objetos diferentes (A e B) para livre exploração por 5 min. Como esperado, todos os grupos exploraram uma porcentagem de tempo similar os dois objetos (cerca de 50%) considerando que os animais não conheciam os objetos previamente (Fig. 6 A-D, Tr; $P > 0,05$ para todos os grupos).

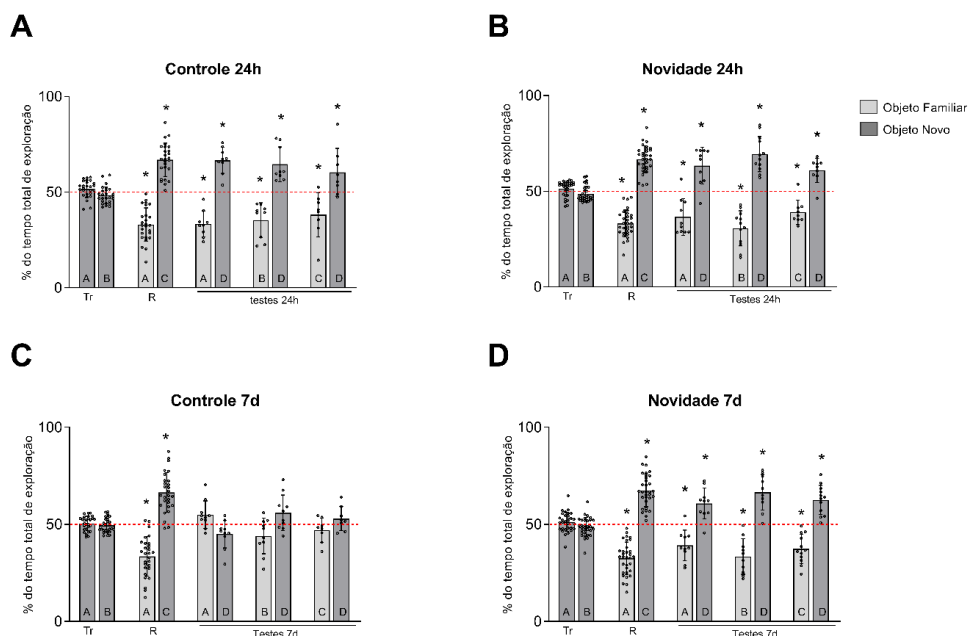


Figura 6 A-D: A exposição à novidade imediatamente após a reativação promove reconsolidação e persistência da memória de RO reconsolidada. Na sessão de treino, todos os ratos foram apresentados a dois objetos previamente desconhecidos por 5 min. 24h após, todos os animais foram submetidos à sessão de reativação com um objeto familiar e um objeto novo e, imediatamente após a reativação, os grupos novidade (B e D) foram expostos a um ambiente novo durante 5 min. Os testes de memória de RO foram realizados 24h ou 7d após a sessão de reativação de acordo com o grupo, quando cada grupo experimental foi dividido aleatoriamente em 3 subgrupos para testar a memória de todos os objetos familiares explorados previamente com um objeto novo. Os dados (média $\pm$ desvio padrão) são apresentados como porcentagem do tempo total de exploração; * $P < 0,05$ no Teste t de Student para uma amostra ou Teste de Wilcoxon, de acordo com o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, com média teórica = 50%. $n = 26-31$ /grupo, $n = 7-11$ /subgrupo.

5.1.1 Apenas reativar a memória de reconhecimento promove reconsolidação, mas não a persistência da memória de RO reconsolidada

Na sessão de reativação da memória, realizada 24h após o treino, um objeto familiar (A, explorado no treino) e um novo objeto (C) foram apresentados aos animais. Nós consideramos que o animal consolidou a memória do objeto familiar que está sendo reativado (A) quando explorar mais de 50% do tempo total de exploração o objeto novo. Todos os grupos consolidaram a memória de reconhecimento, pois todos animais exploraram mais de 50% do tempo total de exploração o objeto novo, demonstrando memória preservada (Fig. 6 A-D, R; $t_{(25)} = 9.891$; $P < 0,0001$ para grupo controle 24h; $t_{(30)} = 13,37$; $P < 0,0001$ para grupo novidade 24h; $t_{(27)} = 8,540$; $P < 0,0001$ para grupo controle 7d; $t_{(31)} = 11,84$; $P < 0,0001$ para grupo novidade 7d).

No teste de reconsolidação da memória de reconhecimento realizado 24h após a reativação, os animais de cada grupo foram aleatoriamente divididos em 3 subgrupos, afim de testarmos a combinação de todos os objetos que eles já tinham explorado com um objeto novo (D), conforme descrito previamente. No grupo controle 24h, todos os animais exploraram mais de 50% do tempo total de exploração o objeto novo nos 3 subgrupos (Fig. 6 A, testes 24h: $t_{(8)} = 7.312$; $P < 0,0001$ para subgrupo A+D; $t_{(8)} = 4,842$; $P = 0,0013$ para subgrupo B+D; $t_{(7)} = 2,870$; $P = 0,0240$ para subgrupo C+D). Assim, o grupo controle 24h demonstrou que: reconsolidou a memória do objeto A (explorado na sessão de treino e reativação), explorando mais da metade do tempo o objeto D; reconsolidou a memória do objeto B (explorado apenas no treino junto ao objeto A), explorando mais tempo o objeto novo; e consolidou a memória do objeto C (apresentado apenas na sessão de reativação), explorando mais de 50% do tempo total de exploração o objeto novo.

Os animais também foram testados 7 dias após a sessão de reativação para verificarmos se apenas a reativação da memória de reconhecimento poderia fortalece-la e promover a persistência da memória de RO reconsolidada. Para isso, avaliamos a persistência da memória do grupo controle 7d, dividindo também em 3 subgrupos conforme descrito anteriormente. Todos os animais deste grupo exploraram uma porcentagem de tempo similar os objetos nas 3 combinações testadas (Fig. 6 C, testes 7d.: $t_{(9)} = 2,210$; $P = 0,0544$ para subgrupo A+D; $t_{(9)} = 2,055$; $P = 0,0701$ para subgrupo

B+D; $t_{(7)} = 1,355$; $P = 0,2176$ para subgrupo C+D). Portanto, os animais controle 7d demonstraram que apenas a sessão de reativação não é capaz de promover a persistência da memória reconsolidada dos objetos A e B, nem a persistência da memória consolidada do objeto C, pois não foram capazes de distinguir entre os objetos familiares e o objeto novo.

5.1.2 A exposição à novidade após a reativação da memória promove a persistência da memória de RO reconsolidada

Para investigar o efeito da exposição à novidade na reconsolidação e na persistência da memória de RO reconsolidada, alguns animais, imediatamente após a sessão de reativação, foram expostos a um ambiente novo para livre exploração por 5 min, sendo testados 24h ou 7d após a reativação da memória. Todos os animais do grupo novidade 24h exploraram mais de 50% do tempo total de exploração o objeto novo (D) quando testados 24h após a reativação (teste de reconsolidação) (Fig. 6 B, testes 24h: $t_{(9)} = 4,430$; $P = 0,0016$ para subgrupo A+D; $t_{(11)} = 7,326$; $P < 0,0001$ para subgrupo B+D; $t_{(8)} = 5,156$; $P = 0,0009$ para subgrupo C+D). Assim, o grupo novidade 24h demonstrou que: reconsolidou a memória do objeto A e do objeto B, e consolidou a memória do objeto C, explorando mais de 50% do tempo total de exploração o objeto novo no teste de 24h.

Nos testes de persistência da memória de reconhecimento reconsolidada, o grupo novidade 7d explorou significativamente mais de 50% do tempo total de exploração o objeto novo (Fig 6 D, testes 7d: $t_{(9)} = 4,354$; $P = 0,0018$ para subgrupo A+D; $t_{(9)} = 5,731$; $P = 0,0003$ para subgrupo B+D; $t_{(11)} = 5,808$; $P = 0,0001$ para subgrupo C+D), demonstrando que a exposição à novidade imediatamente após a sessão de reativação é capaz de promover a persistência da memória de RO reconsolidada dos objetos A e B, bem como a persistência da consolidação da memória do objeto C até uma semana após a reativação.

5.1.3 O Índice de Discriminação é maior nos animais que tiveram reconsolidação e persistência da memória de RO reconsolidada

Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos no Índice de Discriminação de RO (ID) nas sessões de treino e reativação (Fig. 7A-B; $P = 0,5048$ para o treino; $F(3, 113)$, $P = 0,9733$ para reativação). O ID baixo de todos os grupos na sessão de treino confirma que não houve preferência dos animais de nenhum grupo por determinado objeto, enquanto o ID positivo de todos os grupos na sessão de reativação demonstra, mais uma vez, que todos os grupos consolidaram a memória do objeto A.

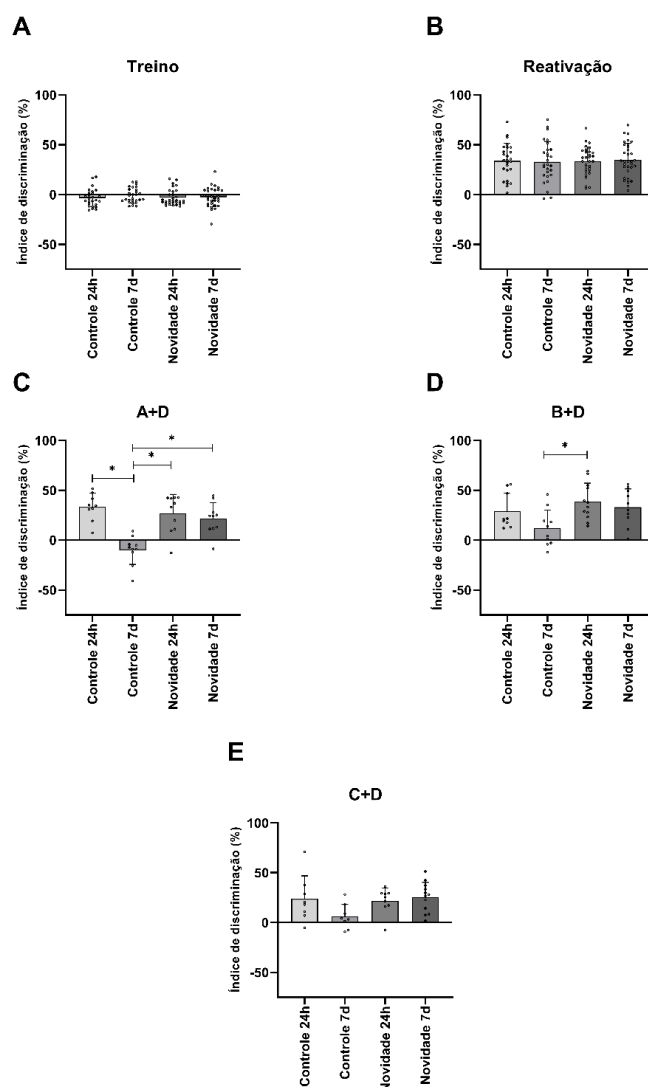


Figura 7 A-E: Comparação do índice de discriminação dos animais nas diferentes sessões da tarefa de Reconhecimento de Objetos. Índice de discriminação para o objeto novo nas sessões de

treino (A), reativação (B) e nos subgrupos de testes de 24h ou 7 dias após a reativação (C, D e E). Os dados (média $\pm$ desvio padrão) são apresentados como porcentagem do ID. * $P < 0,05$ comparação com o grupo controle 7d. $n = 26-31/\text{grupo}$ e $n = 7-11/\text{subgrupo}$.

Nos testes de memória, quando os grupos foram divididos em 3 subgrupos para testagem dos diferentes objetos familiares (A, B e C) com um objeto novo (D), podemos verificar que:

(i) quando testados com objetos A e D (Fig. 7C), observamos diferenças entre os grupos ($P = 0,0003$); os grupos controle 24h, novidade 24h e novidade 7d foram diferentes do grupo controle 7d, apresentando um ID maior ($P = 0,0005$ para grupo controle 24h; $P = 0,0031$ para grupo novidade 24h; $P = 0,0278$ para novidade 7d).

(ii) quando os animais dos subgrupos B+D foram testados (Fig. 7D), também observamos diferença no ID entre grupos ($P = 0,0202$); apenas o grupo novidade 24h foi diferente do grupo controle 7d ($P = 0,0157$), apresentando ID maior.

(iii) quando os animais dos subgrupos C+D foram testados (Fig. 7E) não foram encontradas diferenças no ID entre os grupos ($F(3, 33)$; $P = 0,0690$).

5.1.4 Nenhum dos procedimentos afetou os parâmetros de controle comportamental

Após os testes de 24h ou 7d após a sessão de reativação, os animais foram expostos às tarefas de CA e LCE para verificar se a exposição à novidade afetava o comportamento exploratório, atividade locomotora e estado de ansiedade, o que poderia interferir no comportamento animal, e, portanto, na avaliação da memória. Conforme mostra a tabela 1, os procedimentos utilizados não afetaram os parâmetros avaliados.

Tabela 1: A exposição à novidade não altera a atividade locomotora e exploratória, nem o comportamento de ansiedade. Os dados estão expressos como média ($\pm$ DP) do tempo total de exploração na tarefa de RO, do número de cruzamentos e elevações no CA, e do número de entradas e tempo gasto nos braços abertos durante o teste no LCE (n = 26-31/grupo e 7-11/subgrupo) (P > 0,05; ANOVA unidirecional ou Teste de Kruskal-Wallis).

	Controle 24h	Novidade 24h	Controle 7d	Novidade 7d	Valor de P
TEMPO TOTAL DE EXPLORAÇÃO NO RO (s)					
Treino	74,12 $\pm$ 16.46	72.26 $\pm$ 15.78	74.68 $\pm$ 17.18	77.50 $\pm$ 17.16	0.6597
Reativação	80.38 $\pm$ 23.77	83.45 $\pm$ 24.76	86.14 $\pm$ 22.57	90.16 $\pm$ 19.69	0.4074
Testes 24h ou 7d:					
- A+D	71.33 $\pm$ 17.44	66.70 $\pm$ 18.12	72.10 $\pm$ 24.51	76.20 $\pm$ 29.18	0.8341
- B+D	59.22 $\pm$ 22.52	60.00 $\pm$ 14.69	67.30 $\pm$ 13.25	72.70 $\pm$ 14.32	0.2167
- C+D	80.00 $\pm$ 17.44	75.11 $\pm$ 20.84	81.38 $\pm$ 20.65	79.25 $\pm$ 21.56	0.9277
CA					
Cruzamentos (n)	76.00 $\pm$ 21.88	67.94 $\pm$ 16.25	76.11 $\pm$ 25.60	65.84 $\pm$ 20.26	0.1550
Elevações (n)	25.54 $\pm$ 8.179	24.52 $\pm$ 11.40	24.32 $\pm$ 11.00	20.84 $\pm$ 7.838	0.1130
LCE					
Entrada braços abertos (n)	8.385 $\pm$ 1.791	9.484 $\pm$ 1.710	8.536 $\pm$ 2.701	9.000 $\pm$ 2.214	0.1079
Tempo braços abertos (s)	160.7 $\pm$ 30.81	158.4 $\pm$ 31.51	167.0 $\pm$ 34.28	154.3 $\pm$ 31.46	0.4911

Fonte: A autora (2024).

5.2 Estudo 2: Investigação do envolvimento do sistema dopaminérgico (através da manipulação farmacológica dos receptores D1 e via de sinalização PKA) e do sistema glutamatérgico (através da manipulação farmacológica dos receptores AMPA e NMDA) na modulação da reconsolidação e na persistência da memória de RO pela novidade.

No estudo 2, objetivamos investigar a modulação do efeito da novidade na persistência da memória de reconhecimento reconsolidada pelos sistemas dopaminérgico (receptores D1 e via de sinalização PKA) e glutamatérgico (receptores NMDA e AMPA). Todos animais deste estudo também foram treinados na tarefa de RO com dois objetos diferentes (A e B) para livre exploração por 5 min. Como

esperado, nesta sessão todos os grupos exploraram uma porcentagem de tempo similar os dois objetos (cerca de 50%) considerando que os objetos eram desconhecidos previamente (Fig. 8 A-H, Tr: $P > 0,05$ para todos os grupos).

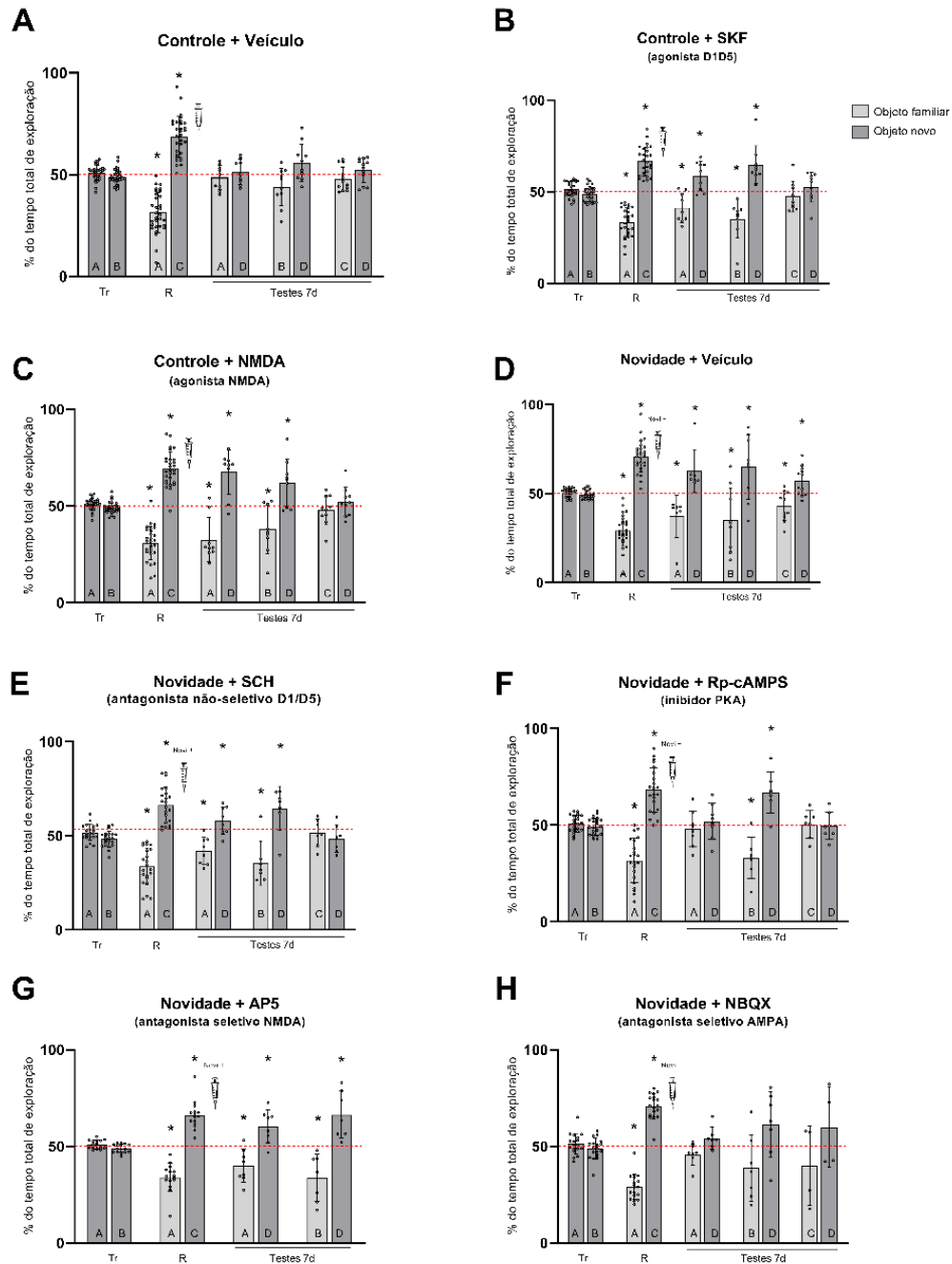


Figura 8 A-H: A exposição à novidade depende da via de sinalização PKA e receptores AMPA no hipocampo para promoção da persistência da memória de RO reconsolidada. Na sessão de treino (Tr), todos os ratos foram apresentados a dois objetos previamente desconhecidos por 5 min. 24h após, todos os animais foram submetidos à sessão de reativação (R) com um objeto familiar e um objeto novo e, imediatamente após a reativação, os grupos novidade (D-H) foram expostos a um ambiente novo durante 5 min. Imediatamente após a novidade, os animais receberam a infusão intrahipocampal

de veículo ou droga de acordo com o grupo. Os testes de memória de RO foram realizados 7d após a sessão de reativação, quando cada grupo experimental foi dividido aleatoriamente em 3 subgrupos para testar a memória de todos os objetos familiares explorados previamente com um objeto novo. Os dados (média $\pm$ desvio padrão) são apresentados como porcentagem do tempo total de exploração; * $P < 0,05$ no Teste t de Student para uma amostra ou Teste de Wilcoxon, de acordo com o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, com média teórica = 50%. $n = 14-30/\text{grupo}$, $n = 4-11/\text{subgrupo}$.

Como visto no estudo 1, na sessão de reativação da memória de RO, 24h após o treino, quando um objeto familiar (A, explorado no treino) e um novo objeto (C) foram apresentados aos animais, todos os animais consolidaram a memória de RO do objeto familiar, visto que exploraram mais de 50% do tempo total de exploração o objeto novo (Fig. 8 A-H, R: $t_{(30)} = 10,41$; $P < 0,0001$ para grupo controle + veículo; $t_{(26)} = 11,08$; $P < 0,0001$ para grupo controle + SKF; $t_{(27)} = 11,59$; $P < 0,0001$ para grupo controle + NMDA; $t_{(27)} = 12,69$; $P < 0,0001$ para grupo novidade salina; $t_{(21)} = 7,783$; $P < 0,0001$ para novidade + SCH; $t_{(21)} = 7,477$; $P < 0,0001$ para novidade + Rp-cAMPS; $t_{(14)} = 8,605$; $P < 0,0001$ para novidade + AP5; $t_{(17)} = 13,61$; $P < 0,0001$ para novidade + NBQX).

5.2.1 O efeito da novidade na facilitação da persistência da memória reconsolidada não depende da ativação de receptores dopaminérgicos, mas é modulada pela via de sinalização PKA no hipocampo

No teste de persistência da memória de RO reconsolidada, realizado uma semana após a sessão de reativação, todos os grupos foram divididos em 3 subgrupos para testarmos a memória de todos os objetos já familiares, como descrito anteriormente. Como esperado, todos animais do grupo controle + veículo exploraram cerca de 50% tanto o objeto familiar quanto o novo objeto (D), conforme subgrupo (Fig. 8A, teste 7d: $t_{(8)} = 0,6755$; $P = 0,5184$ para A+D; $t_{(9)} = 2,055$; $P = 0,0701$ para B+D; $P = 0,2783$ para C+D). Portanto, este grupo demonstrou que apenas a sessão de reativação não é capaz de promover a persistência da memória reconsolidada dos objetos A e B, nem a persistência da memória consolidada do objeto C. Diferentemente deste grupo, os animais que foram expostos à novidade e foram infundidos com veículo na região CA1 do hipocampo, apresentaram persistência da memória dos objetos A e B (Fig. 8D, teste 7d: $P = 0,0156$ para A+D; $t_{(8)} = 2,485$; $P = 0,0378$ para B+D), bem como persistência da memória consolidada do objeto C (Fig.

8D, $t_{(11)} = 3,011$; $P = 0,0119$ para C+D). Além disso, os animais que tiveram a ativação dos receptores D1/D5 (pela infusão intrahipocampal de SKF) apresentaram persistência da memória dos objetos reconsolidados (Fig. 8B, teste 7d: $t_{(8)} = 3,287$; $P = 0,0111$ para A+D; $P = 0,0039$ para B+D) mas não persistência da memória do objeto C (Fig. 8B, $t_{(8)} = 0,9336$; $P = 0,3778$ para C+D).

Quando os animais foram expostos à novidade após a reativação, e logo em seguida, receberam a infusão intrahipocampal de SCH23390 (antagonista não-seletivo dos receptores D1/D5), eles continuaram apresentando persistência da memória de reconhecimento reconsolidada dos objetos A e B (Fig. 8E, teste 7d: $t_{(7)} = 3,094$; $P = 0,0175$ para A+D; $P = 0,0313$ para B+D) mas não tiveram a persistência do objeto familiar C (Fig. 8E, teste 7d: $t_{(6)} = 0,5283$; $P = 0,6163$ para C+D). Assim, podemos sugerir que o efeito da novidade na janela temporal da reconsolidação não depende da ativação de receptores dopaminérgicos D1/D5.

Na investigação da via de sinalização PKA no hipocampo, observamos resultados interessantes. Quando os animais receberam a infusão intrahipocampal de Rp-cAMPS (inibidor de PKA) imediatamente após a novidade, não houve persistência da memória de RO reconsolidada do objeto A (presente na sessão de reativação) (Fig. 8F, teste 7d: $t_{(7)} = 0,5709$; $P = 0,5859$), no entanto, a persistência da memória do objeto B (presente apenas no treino) continuou ocorrendo (Fig. 8F, teste 7d: $t_{(6)} = 4,196$; $P = 0,0057$). A memória do objeto C também não persistiu neste grupo (Fig. 8F, teste 7d: $t_{(6)} = 0,1320$; $P = 0,8993$). Portanto, sugerimos neste estudo que a via de sinalização PKA é essencial para o efeito da novidade na persistência da memória de reconhecimento reconsolidada do objeto familiar presente na sessão de reativação.

5.2.2 A ativação de receptores glutamatérgicos AMPA é essencial para o efeito da novidade na persistência da memória de RO reconsolidada

Para investigar o envolvimento do sistema glutamatérgico do hipocampo na modulação da novidade na persistência da memória de RO reconsolidada, manipulamos farmacologicamente os receptores NMDA e AMPA. Inicialmente, avaliamos se a estimulação dos receptores glutamatérgicos pela infusão de NMDA intrahipocampal também causaria persistência da memória. Para isso, 5 min após a

sessão de reativação, alguns animais do estudo 2 receberam a infusão intra-CA1 do agonista glutamatérgico NMDA. Neste grupo, houve persistência da memória reconsolidada dos objetos A e B 7 dias após a reativação (Fig. 8C, teste 7d: $P = 0,0177$ para A+D; $t_{(8)} = 2,920$; $P = 0,0193$ para B+D), mas a memória de RO consolidada não persistiu para o objeto C (Fig. 8C, teste 7d: $t_{(9)} = 0,8832$; $P = 0,4001$). Assim, verificamos que a ativação de receptores glutamatérgicos do hipocampo pode promover persistência da memória de RO reconsolidada.

Além disso, quando bloqueamos os receptores NMDA no hipocampo de animais expostos à novidade imediatamente após a reativação, e testamos os objetos familiares 7 dias após com um novo objeto (D), verificamos que eles continuaram apresentando persistência da memória dos objetos A e B reconsolidados (Fig. 8G, teste 7d: $t_{(7)} = 3,362$; $P = 0,0120$ para A+D; $t_{(6)} = 3,536$; $P = 0,0123$ para B+D). Neste grupo, não conseguimos atingir um n para formação do subgrupo C+D, considerando os animais que perdemos ao longo do experimento e aqueles excluídos devido ao mal posicionamento das cânulas, mas reiteramos que novos animais serão adicionados a este estudo para análise e escrita do artigo. Sugerimos assim, que o efeito da exposição à novidade na persistência da memória de objetos reconsolidados não depende da ativação de receptores NMDA no hipocampo. No entanto, diferentemente deste grupo, quando infundimos NBQX (antagonista dos receptores AMPA) no hipocampo de animais após a novidade, não observamos persistência da memória em nenhuma das combinações testadas (Fig. 8H, teste 7d: $t_{(6)} = 1,989$; $P = 0,0938$ para A+D; $t_{(6)} = 1,748$; $P = 0,1310$ para B+D; $t_{(3)} = 0,9660$; $P = 0,4053$ para C+D). Portanto, receptores AMPA no hipocampo parecem ser essenciais para o efeito da exposição à novidade na persistência da memória de reconhecimento reconsolidada.

5.2.3 O ID é maior em animais que tiveram ativação de receptores NMDA no hipocampo

De acordo com o ID do objeto novo das sessões de treino e reativação, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (Fig. 9A-B; $F(7,183)$, $P = 0,9873$ para o treino; $F(7, 183)$, $P = 0,9575$ para reativação). Isso demonstra que todos os grupos consolidaram a memória do objeto A. Nos testes de memória, quando

os grupos foram divididos em 3 subgrupos para testagem dos diferentes objetos familiares (A, B e C) com um objeto novo (D), podemos verificar que apenas o grupo controle + NMDA apresentou diferença quando comparado ao controle + veículo, tendo um ID maior na combinação A+D (Fig. 9C: $P = 0,0218$). Quando os subgrupos B+D (Fig. 9D: $P = 0,1261$) e C+D (Fig. 9E: $P = 0,3953$) foram testados, nenhum grupo apresentou diferença estatisticamente significativa na comparação entre grupos.

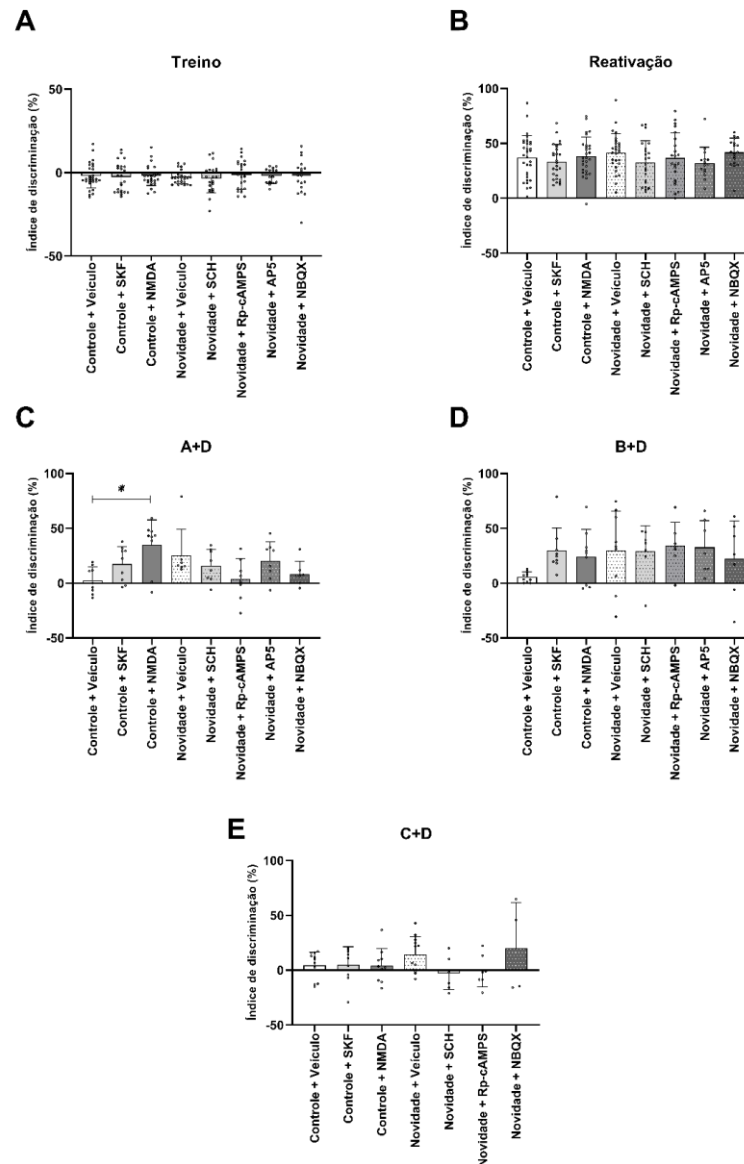


Figura 9 A-E: Índice de discriminação no teste de persistência é maior nos animais que tiveram ativação dos receptores NMDA no hipocampo. Índice de discriminação para o objeto novo nas sessões de treino (A), reativação (B) e nos subgrupos de testes de 7 dias após a reativação (C, D e E). Os dados (média $\pm$ desvio padrão) são apresentados como porcentagem do ID. * $P < 0,05$ comparação com o grupo controle + veículo. $n = 14-30$ /grupo, $n = 4-11$ /subgrupo.

5.2.4 Nenhum procedimento ou drogas infundidas no hipocampo afetaram os resultados de controles comportamentais

Após os testes de persistência, os animais foram expostos às tarefas de CA e LCE para verificar se a exposição à novidade, a cirurgia estereotáxica e/ou a infusão intrahipocampal afetava o comportamento exploratório, atividade locomotora e estado de ansiedade. Conforme mostra a tabela 2, os procedimentos utilizados não afetaram os parâmetros avaliados.

Tabela 2: A exposição à novidade, a cirurgia estereotáxica e a infusão não alteram a atividade locomotora e exploratória no Campo Aberto (CA), nem o comportamento de ansiedade dos animais no Labirinto em Cruz Elevado (LCE). Os dados estão expressos como média ($\pm$ DP) do tempo total de exploração na tarefa de RO, do número de cruzamentos e elevações no CA, e do número de entradas e tempo gasto nos braços abertos durante o teste no LCE (n = 14-30/grupo e 4-11/subgrupo) (P > 0,05; ANOVA unidirecional ou Teste de Kruskal-Wallis; Novi = novidade).

	Controle + Veículo	Controle + SKF	Controle + NMDA	Novi + Veículo	Novi + SCH	Novi + Rp	Novi + AP5	Novi + NBQX	Valor de P
TEMPO TOTAL DE EXPLORAÇÃO NO RO (s)									
Treino	68.84 $\pm$ 24.06	72.81 $\pm$ 25.80	74.25 $\pm$ 28.04	70.21 $\pm$ 26.75	57.77 $\pm$ 21.16	65.00 $\pm$ 18.31	6.53 $\pm$ 21.49	63.44 $\pm$ 22.28	0.4670
Reativação	70.68 $\pm$ 26.95	76.26 $\pm$ 22.83	82.25 $\pm$ 25.51	69.54 $\pm$ 23.11	64.82 $\pm$ 18.03	66.55 $\pm$ 25.53	75.67 $\pm$ 28.65	70.17 $\pm$ 27.36	0.2384
Testes 7d:									
- A+D	50.11 $\pm$ 26.38	71.22 $\pm$ 16.82	68.78 $\pm$ 25.91	65.43 $\pm$ 19.24	58.25 $\pm$ 18.19	52.13 $\pm$ 25.84	68.75 $\pm$ 28.25	48.86 $\pm$ 25.48	0.3050
- B+D	48.40 $\pm$ 16.54	66.56 $\pm$ 22.15	60.11 $\pm$ 31.88	49.22 $\pm$ 19.31	50.57 $\pm$ 26.68	52.86 $\pm$ 21.49	52.71 $\pm$ 38.35	49.43 $\pm$ 22.25	0.7808
- C+D	63.42 $\pm$ 20.46	82.56 $\pm$ 15.36	81.20 $\pm$ 13.66	73.58 $\pm$ 30.12	64.57 $\pm$ 18.52	88.43 $\pm$ 29.96	-	72.00 $\pm$ 11.86	0.1641
CA									
Cruzamentos (n)	84.74 $\pm$ 28.72	87.41 $\pm$ 4.394	81.57 $\pm$ 30.18	73.76 $\pm$ 33.34	75.50 $\pm$ 21.09	87.32 $\pm$ 29.54	86.60 $\pm$ 35.76	64.50 $\pm$ 27.95	0.1093
Elevações (n)	22.97 $\pm$ 9.510	24.56 $\pm$ 9.669	21.86 $\pm$ 6.564	19.86 $\pm$ 12.44	21.55 $\pm$ 8.111	26.00 $\pm$ 9.612	24.53 $\pm$ 9.195	18.39 $\pm$ 7.188	0.0580
LCE									
Entrada braços abertos (n)	7.258 $\pm$ 1.483	7.111 $\pm$ 1.311	7.214 $\pm$ 1.548	7.897 $\pm$ 1.291	7.545 $\pm$ 1.654	7.136 $\pm$ 1.807	8.267 $\pm$ 2.520	7.611 $\pm$ 1.335	0.2066
Tempo braços abertos (s)	160.6 $\pm$ 38.94	153.0 $\pm$ 46.08	146.6 $\pm$ 35.65	175.7 $\pm$ 31.52	150.8 $\pm$ 45.43	165.9 $\pm$ 57.64	156.5 $\pm$ 37.69	160.2 $\pm$ 37.83	0.1862

Fonte: Da autora, 2024.

6 DISCUSSÃO

Nesta dissertação nós investigamos o envolvimento do sistema dopaminérgico (receptores D1/D5 e via PKA), bem como do sistema glutamatérgico (receptores NMDA e AMPA) no efeito da novidade sob a persistência da memória de reconhecimento reconsolidada. Assim, verificamos que o efeito da novidade na promoção da persistência da memória de reconhecimento não requer ativação hipocampal de receptores dopaminérgicos D1/D5 e receptor NMDA, mas depende da via de sinalização PKA e ativação de receptores glutamatérgicos do tipo AMPA no hipocampo.

Este estudo considerou a tarefa de RO como um modelo convencional para investigar processos de memória de reconhecimento (Ennaceur, 2010). Visando caracterizar o desempenho da memória de maneira dicotômica, comparamos a porcentagem do tempo total de exploração de objetos na tarefa RO com uma média teórica de 50%, o tempo esperado de exploração de cada objeto quando não há diferença entre o reconhecimento dos dois objetos, i.e., ambos são considerados igualmente familiares ou novos pelos animais (C. R.G. Furini et al., 2014; Vargas et al., 2020). De acordo com o teste, explorar um objeto novo do que familiar por mais tempo reflete consolidação ou persistência da memória. Como complemento, comparamos o ID entre os grupos para o dia de teste, seja de reconsolidação ou persistência, para identificar procedimentos que possam ter efeitos mais proeminentes na memória, resultando em diferenças na força da memória.

A reconsolidação da memória ocorre quando um evento de recuperação temporariamente desestabiliza uma memória já consolidada, desencadeando assim um novo processo de reestabilização, denominado reconsolidação. Este é um processo que pode garantir a persistência da memória ao longo do tempo (Orlandi et al., 2020). Inicialmente, investigamos se a simples reativação da memória de reconhecimento poderia promover persistência da MLD. Verificamos que, no nosso paradigma de RO, apenas a recuperação da memória em uma sessão de reativação não é capaz de promover persistência, mas quando um evento comportamental subjacente é adicionado imediatamente após, a persistência ocorre. Assim, destacamos a importância de um segundo evento comportamental, como a exposição à novidade, como uma estratégia não-invasiva que pode fornecer PRPs ao traço da

memória original recuperado, culminando no fortalecimento da memória de reconhecimento (Lima et al., 2021; Orlandi et al., 2020). É crucial ressaltar que o efeito da exposição à novidade na modulação da memória segue uma janela temporal crítica para ser observado, podendo variar de minutos a horas, antes ou após a aprendizagem ou recuperação da memória (Lima et al., 2021; Menezes et al., 2015; Orlandi et al., 2020; Schroeder et al., 2023).

Após a recuperação da memória na tarefa de RO, os animais foram expostos ao ambiente novo considerando que esta estratégia aumenta os níveis de dopamina no hipocampo (Menezes et al., 2015). Estudos anteriores já demonstraram que estímulos comportamentais ou farmacológicos que estimulam os receptores D1/D5 hipocampais imediatamente após o aprendizado podem facilitar a persistência da memória de RO (da Silva de Vargas et al., 2017; Lima et al., 2021; Neves et al., 2020). Para investigarmos o envolvimento dos receptores dopaminérgicos D1/D5, manipulamos farmacologicamente este sistema no hipocampo. Em resumo, a estimulação de receptores dopaminérgicos da família D1 após a recuperação da memória de reconhecimento promoveu persistência da memória de RO reconsolidada. Corroborando com esses dados, a literatura descreve que a estimulação da família D1 melhora o processo de plasticidade neuronal, facilitando a potenciação de longo prazo (LTP), o que resulta em um aumento persistente na transmissão sináptica, essencial para a estabilização da memória ao longo do tempo (Edelmann & Lessmann, 2018; O'Carroll & Morris, 2004). Além disso, a estimulação aguda dos receptores da família D1 aumenta a expressão de BDNF, necessário para o desenvolvimento da plasticidade neuronal duradoura (Williams & Undieh, 2009). Esses achados nos ajudam a explicar a melhora na persistência da memória de reconhecimento após estimulação não seletiva dos receptores D1 e D5. A ativação dopaminérgica em CA1 também é essencial para o processo de marcação e captura (STC), fenômeno que explica a estabilização de memórias duradouras por dois processos paralelos e complementares: formação de tags induzida por aprendizagem; e a síntese de PRPs (Ballarini et al., 2009; Moncada et al., 2011).

Também verificamos anteriormente que, em animais não expostos à novidade, a infusão de SCH na região CA1 do hipocampo prejudica a consolidação e persistência da memória de RO (Neves et al., 2020). No entanto, nos estudos

desenvolvidos nesta dissertação, o bloqueio destes receptores pelo antagonista não seletivo não prejudicou o efeito da novidade na persistência da memória de reconhecimento reconsolidada. Assim, parece que os receptores D1/D5 não são necessários para a marcação comportamental durante a recuperação da memória de RO.

Em animais expostos à novidade, estudos anteriores observaram que a via PKA é necessária para o processo de definição de *tags*, bem como para a síntese de PRPs necessárias para a reconsolidação da memória de reconhecimento (Orlandi et al., 2020; Schroeder et al., 2023). Aqui, demonstramos que a via de sinalização PKA no hipocampo parece ser necessária para o efeito da novidade na promoção da persistência da memória do objeto que teve sua memória recuperada na sessão de reativação. Anteriormente, já tínhamos verificado que a via PKA parecia ser requerida para a consolidação e persistência da memória de RO (Neves et al., 2020). Estes estudos fornecem evidências de uma mecânica molecular geral pela qual eventos comportamentais podem modular diferentes fases da memória.

Estudos recentes já vem demonstrando a influência dos receptores NMDA do hipocampo dorsal na labilização (isto é, reativação) da memória de reconhecimento (Rossato et al., 2023; Schroeder et al., 2023). Além disso, tornar a memória de reconhecimento lábil e suscetível a interferências externas é necessário para que o efeito de melhora na memória pela novidade possa ocorrer (Ballarini et al., 2009; Lima et al., 2021; Orlandi et al., 2020; Schroeder et al., 2023). Neste estudo, demonstramos que a ativação dos receptores NMDA após a sua labilização promoveu persistência da memória de objetos reconsolidados. No entanto, estes receptores não são necessários para a persistência da memória promovida pela novidade, como são os receptores AMPA do hipocampo. Já foi evidenciado que a expressão dos receptores glutamatérgicos AMPA é necessária para indução da LTP, além de estarem envolvidos na reestabilização do traço mnemônico pela sua inserção na membrana pós-sináptica em sinapses hipocâmpais durante a reconsolidação (Maria Carolina Gonzalez, Radiske, et al., 2019; Rossato et al., 2023). Além disso, receptores glutamatérgicos também são essenciais para a formação de *tags* e PRPs durante processos de marcação comportamental (Moncada et al., 2011).

Ainda que a exposição à novidade melhore a persistência da memória de reconhecimento tanto através da consolidação, como pela reconsolidação da memória (visto nessa dissertação), estudos neurobiológicos ainda são necessários para entender se o segundo evento comportamental influencia, além do traço de memória já consolidado e que está sendo recuperado na sessão de reativação, as informações novas apresentadas durante a recuperação da memória. Além disso, mesmo que estudos anteriores objetivem pesquisar a neurobiologia da reconsolidação por si só (Cristiane R.G. Furini et al., 2020; Orlandi et al., 2020; Rossato et al., 2015, 2023; Schroeder et al., 2023), tanto grupos experimentais de controle farmacológico, como grupos que testem apenas a reconsolidação são essenciais para compreensão dos resultados no nosso paradigma de RO. Assim, conseguiremos afirmar se aquela memória de RO foi prejudicada logo na reconsolidação, ou apenas na sua persistência ao longo do tempo. Ainda, outra limitação é, que nessa dissertação, não tivemos amostras para determinar níveis dos neurotransmissores estudados (dopamina e glutamato), bem como para realizar técnicas de imunohistoquímica e imunofluorescência para observação da presença e distribuição de importantes marcadores, como os próprios receptores dopaminérgicos e glutamatérgicos na região CA1 do hipocampo. O complemento dos resultados com tais técnicas, poderia, talvez, nos direcionar sobre o papel do sistema dopaminérgico no efeito da novidade neste delineamento.

7 CONCLUSÃO

Nesta dissertação apresentamos evidências que apoiam a ideia de que a via de sinalização PKA e os receptores AMPA no hipocampo são necessários para o efeito da novidade na persistência da memória reconsolidada. Nossos resultados fornecem novas evidências de que a exposição à novidade após a reativação de um aprendizado melhora a reconsolidação memória, promovendo sua persistência através de mecanismos dependentes da ativação de PKA e AMPA. Os resultados também demonstram que a manipulação farmacológica do sistema glutamatérgico pode influenciar a recuperação do aprendizado de RO e a persistência da memória ao longo do tempo.

8 REFERÊNCIAS

- Akirav, I., & Maroun, M. (2006). Ventromedial prefrontal cortex is obligatory for consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Cerebral Cortex*, 16(12), 1759–1765. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhj114>
- Ballarini, F., Moncada, D., Martinez, M. C., Alen, N., & Viola, H. (2009). Behavioral tagging is a general mechanism of long-term memory formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(34). <https://doi.org/10.1073/pnas.0907078106>
- Bethus, I., Tse, D., & Morris, R. G. M. (2010). Dopamine and memory: Modulation of the persistence of memory for novel hippocampal NMDA receptor-dependent paired associates. *Journal of Neuroscience*, 30(5). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2721-09.2010>
- Bevilaqua, L. R., Rossato, J. I., Medina, J. H., Izquierdo, I., & Cammarota, M. (2003). Src kinase activity is required for avoidance memory formation and recall. *Behavioural Pharmacology*, 14(8). <https://doi.org/10.1097/00008877-200312000-00009>
- Bonini, J. S., Bevilaqua, L. R., Zinn, C. G., Kerr, D. S., Medina, J. H., Izquierdo, I., & Cammarota, M. (2006). Angiotensin II disrupts inhibitory avoidance memory retrieval. *Hormones and Behavior*, 50(2). <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2006.03.016>
- da Silva de Vargas, L., Neves, B. H. S. das, Roehrs, R., Izquierdo, I., & Mello-Carpes, P. (2017). One-single physical exercise session after object recognition learning promotes memory persistence through hippocampal noradrenergic mechanisms. *Behav. Brain Res. Behavioural Brain Research*, 329. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.04.050>
- Danieli, K., Guyon, A., & Bethus, I. (2023). Episodic Memory formation: A review of complex Hippocampus input pathways. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 126. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2023.110757>
- Duszkiewicz, A. J., McNamara, C. G., Takeuchi, T., & Genzel, L. (2019). Novelty and Dopaminergic Modulation of Memory Persistence: A Tale of Two Systems. *Trends in Neurosciences*, 42(2), 102–114. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.10.002>
- Edelmann, E., & Lessmann, V. (2018). Dopaminergic innervation and modulation of hippocampal networks Functions of dopamine in the hippocampus in memory and emotional regulation. *Cell and Tissue Research*.
- Ennaceur, A. (2010). One-trial object recognition in rats and mice: Methodological and theoretical issues. In *Behavioural Brain Research* (Vol. 215, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.036>
- Frey, U., & Morris, R. G. M. (1998). Synaptic tagging: Implications for late maintenance of hippocampal long-term potentiation. *Trends in Neurosciences*, 21(5). [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(97\)01189-2](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(97)01189-2)

- Furini, C. R.G., Myskiw, J. C., Schmidt, B. E., Marcondes, L. A., & Izquierdo, I. (2014). D1 and D5 dopamine receptors participate on the consolidation of two different memories. *Behavioural Brain Research*, 271. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.06.027>
- Furini, Cristiane R.G., Nachtigall, E. G., Behling, J. A. K., Assis Brasil, E. S., Saenger, B. F., Narvaes, R. F., de Carvalho Myskiw, J., & Izquierdo, I. (2020). Molecular Mechanisms in Hippocampus Involved on Object Recognition Memory Consolidation and Reconsolidation. *Neuroscience*, 435, 112–123. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.03.047>
- Gonzalez, Maria Carolina, Radiske, A., & Cammarota, M. (2019). On the Involvement of BDNF Signaling in Memory Reconsolidation. In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 13). <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00383>
- Gonzalez, María Carolina, Rossato, J. I., Radiske, A., Bevilaqua, L. R. M., & Cammarota, M. (2021). Dopamine controls whether new declarative information updates reactivated memories through reconsolidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(29), 3–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.2025275118>
- Gonzalez, Maria Carolina, Rossato, J. I., Radiske, A., Pádua Reis, M., & Cammarota, M. (2019). Recognition memory reconsolidation requires hippocampal Zif268. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53005-8>
- Hou, Y. Y., Liu, Y., Kang, S., Yu, C., Chi, Z. Q., & Liu, J. G. (2009). Glutamate receptors in the dorsal hippocampus mediate the acquisition, but not the expression, of conditioned place aversion induced by acute morphine withdrawal in rats. *Acta Pharmacologica Sinica*, 30(10), 1385–1391. <https://doi.org/10.1038/aps.2009.130>
- Ihalainen, J. A., Riekkinen, P., & Feenstra, M. G. P. (1999). Comparison of dopamine and noradrenaline release in mouse prefrontal cortex, striatum and hippocampus using microdialysis. *Neuroscience Letters*, 277(2). [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(99\)00840-X](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(99)00840-X)
- Izquierdo, I. (2014). *Memória* (2 ed. rev.). Artmed.
- Izquierdo, Iván, Bevilaqua, L. R. M., Rossato, J. I., Bonini, J. S., Medina, J. H., & Cammarota, M. (2006). Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends in Neurosciences*, 29(9), 496–505. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2006.07.005>
- Lee, J. L. C. (2010). Memory reconsolidation mediates the updating of hippocampal memory content. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 4(NOV), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2010.00168>
- Lemon, N., & Manahan-Vaughan, D. (2006). Dopamine D1/D5 receptors gate the acquisition of novel information through hippocampal long-term potentiation and long-term depression. *Journal of Neuroscience*, 26(29). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1454-06.2006>
- Lima, K. R., Souza da Rosa, A. C., Picua, S. S., Silva, S. S., Soares, N. M., & Mello-Carpes, P. B. (2021). Novelty promotes recognition memory persistence by D1

- dopamine receptor and protein kinase A (PKA) signaling in rat hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, June, 1–13. <https://doi.org/10.1111/ejn.15568>
- McGaugh, J. L. (2000). Memory - A century of consolidation. In *Science* (Vol. 287, Issue 5451). <https://doi.org/10.1126/science.287.5451.248>
- Mello-Carpes, P. B., da Silva de Vargas, L., Gayer, M. C., Roehrs, R., & Izquierdo, I. (2016). Hippocampal noradrenergic activation is necessary for object recognition memory consolidation and can promote BDNF increase and memory persistence. *Neurobiology of Learning and Memory*, 127. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2015.11.014>
- Menezes, J., Alves, N., Borges, S., Roehrs, R., De Carvalho Myskiw, J., Furini, C. R. G., Izquierdo, I., & Mello-Carpes, P. B. (2015). Facilitation of fear extinction by novelty depends on dopamine acting on D1-subtype dopamine receptors in hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(13). <https://doi.org/10.1073/pnas.1502295112>
- Moncada, D., Ballarini, F., Martinez, M. C., Frey, J. U., & Viola, H. (2011). Identification of transmitter systems and learning tag molecules involved in behavioral tagging during memory formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(31), 12931–12936. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104495108>
- Moncada, D., & Viola, H. (2007). Induction of Long-Term Memory by Exposure to Novelty Requires Protein Synthesis: Evidence for a Behavioral Tagging. *Journal of Neuroscience*, 27(28), 7476–7481. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1083-07.2007>
- Moscovitch, M., Cabeza, R., Winocur, G., & Nadel, L. (2016). Episodic memory and beyond: The hippocampus and neocortex in transformation. *Annual Review of Psychology*, 67, 105–134. <https://doi.org/10.1146/annurev-psych-113011-143733>
- Moses, S. N., Cole, C., Driscoll, I., & Ryan, J. D. (2005). Differential contributions of hippocampus, amygdala and perirhinal cortex to recognition of novel objects, contextual stimuli and stimulus relationships. *Brain Research Bulletin*, 67(1–2). <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2005.05.026>
- Mourão, C. A., & Faria, N. C. (2015). Memória. *Psicologia: Reflexao e Critica*, 28(4), 780–788. <https://doi.org/10.1590/1678-7153.201528416>
- Nader, K., & Hardt, O. (2009). A single standard for memory: The case for reconsolidation. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(3), 224–234. <https://doi.org/10.1038/nrn2590>
- Nader, K., Schafe, G. E., & Le Doux, J. E. (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, 406(6797), 722–726. <https://doi.org/10.1038/35021052>
- Neves, B. H. S., Barbosa, G. P. D. R., Rosa, A. C. de S., Picua, S. S., Gomes, G. M., Sosa, P. M., & Mello-Carpes, P. B. (2020). On the role of the dopaminergic system in the memory deficits induced by maternal deprivation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 173. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2020.107272>

- O'Carroll, C. M., & Morris, R. G. M. (2004). Heterosynaptic co-activation of glutamatergic and dopaminergic afferents is required to induce persistent long-term potentiation. *Neuropharmacology*, 47(3). <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.04.005>
- Orlandi, I. R., Fullio, C. L., Schroeder, M. N., Giurfa, M., Ballarini, F., & Moncada, D. (2020). Behavioral tagging underlies memory reconsolidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(30), 18029–18036. <https://doi.org/10.1073/PNAS.2009517117>
- Paxinos, G., & Charles Watson. (2007). The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates Sixth Edition. In *Elsevier Academic Press* (Vol. 170).
- Radiske, A., Gonzalez, M. C., Nôga, D. A., Rossato, J. I., Bevilaqua, L. R. M., & Cammarota, M. (2020). GluN2B and GluN2A-containing NMDAR are differentially involved in extinction memory destabilization and restabilization during reconsolidation. *Scientific Reports*, 11, 186. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80674-7>
- Radiske, A., Rossato, J. I., Gonzalez, M. C., Köhler, C. A., Bevilaqua, L. R., & Cammarota, M. (2017). BDNF controls object recognition memory reconsolidation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 142, 79–84. <https://doi.org/10.1016/J.NLM.2017.02.018>
- Roesler, R., & McGaugh, J. L. (2010). Memory Consolidation. *Encyclopedia of Behavioral Neuroscience, Three-Volume Set*, 1-3, 2, V2-206-V2-214. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-045396-5.00147-0>
- Rossato, J. I., Bevilaqua, L. R., Izquierdo, I., Medina, J. H., & Cammarota, M. (2010). Retrieval induces reconsolidation of fear extinction memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(50). <https://doi.org/10.1073/pnas.1016254107>
- Rossato, J. I., Bevilaqua, L. R. M., Izquierdo, I., Medina, J. H., & Cammarota, M. (2009). Dopamine controls persistence of long-term memory storage. *Science*, 325(5943). <https://doi.org/10.1126/science.1172545>
- Rossato, J. I., Bevilaqua, L. R. M., Myskiw, J. C., Medina, J. H., Izquierdo, I., & Cammarota, M. (2007). On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. In *Learning and Memory* (Vol. 14, Issue 1, pp. 36–46). <https://doi.org/10.1101/lm.422607>
- Rossato, J. I., Gonzalez, M. C., Radiske, A., Apolinário, G., Conde-Ocazionez, S., Bevilaqua, L. R., & Cammarota, M. (2019). Pkm ζ inhibition disrupts reconsolidation and erases object recognition memory. *Journal of Neuroscience*, 39(10), 1828–1841. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2270-18.2018>
- Rossato, J. I., Köhler, C. A., Radiske, A., Lima, R. H., Bevilaqua, L. R. M., & Cammarota, M. (2015). State-dependent effect of dopamine D1/D5 receptors inactivation on memory destabilization and reconsolidation. *Behavioural Brain Research*, 285, 194–199. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.09.009>
- Rossato, J. I., Radiske, A., Gonzalez, M. C., Apolinário, G., de Araújo, R. L. S.,

- Bevilaqua, L. R. M., & Cammarota, M. (2023). NMDARs control object recognition memory destabilization and reconsolidation. *Brain Research Bulletin*, 197(March), 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2023.03.013>
- Schroeder, M. N., Fullio, C. L., Ballarini, F., & Moncada, D. (2023). Modulation of memory reconsolidation by adjacent novel tasks: timing defines the nature of change. *Communications Biology*, 6(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05666-5>
- Shan, Q., Chan, G. C. K., & Storm, D. R. (2008). Type 1 adenylyl cyclase is essential for maintenance of remote contextual fear memory. *Journal of Neuroscience*, 28(48), 12864–12867. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2413-08.2008>
- Squire, L. R., & Bayley, P. J. (2007). The neuroscience of remote memory. *Current Opinion in Neurobiology*, 17(2), 185–196. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2007.02.006>
- Squire, L. R., Wixted, J. T., & Clark, R. E. (2007). Recognition memory and the medial temporal lobe: A new perspective. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 8, Issue 11). <https://doi.org/10.1038/nrn2154>
- Steckler, T., Drinkenburg, W. H. I. M., Sahgal, A., & Aggleton, J. P. (1998). Recognition memory in rats - I. Concepts and classification. *Progress in Neurobiology*, 54(3). [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(97\)00060-9](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(97)00060-9)
- Vargas, L. S., Ramires Lima, K., Piaia Ramborger, B., Roehrs, R., Izquierdo, I., & Mello-Carpes, P. B. (2020). Catecholaminergic hippocampal activation is necessary for object recognition memory persistence induced by one-single physical exercise session. *Behavioural Brain Research*, 379. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112356>
- Vianna, M. R. M., Alonso, M., Viola, H., Quevedo, J., De Paris, F., Furman, M., De Stein, M. L., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2000). Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learning and Memory*, 7(5), 333–340. <https://doi.org/10.1101/lm.34600>
- Wang, S. H. (2018). Novelty enhances memory persistence and remediates propranolol-induced deficit via reconsolidation. *Neuropharmacology*, 141. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.08.015>
- Williams, S. N., & Undieh, A. S. (2009). Dopamine D1-like receptor activation induces brain-derived neurotrophic factor protein expression. *NeuroReport*, 20(6). <https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e32832a0a98>

ANEXO I – Aprovação e Adendo do CEUA



CERTIDÃO

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

Número de protocolo da CEUA: 028/2022

Título: Mecanismos dopaminérgicos e glutamatérgicos envolvidos no efeito modulatório da novidade sobre a reconsolidação e persistência da memória de reconhecimento reconsolidada

Data da aprovação: 25/08/2022

Período de vigência do projeto: 01/12/2023

Pesquisadores(a): Pamela Billig Mello Carpes

Campus: Uruguiana

Telefone: (55) 9 9661-2454

E-mail: pamelacarpes@unipampa.edu.br

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa
Espécie / Linhagem / Raça	Ratos Wistar
Nº de animais	351
Peso / Idade	300g/3 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério da Universidade Federal de Santa Maria / RS



Assinado eletronicamente por **ALESSANDRA SAYURI KIKUCHI TAMAJUSUKU NEIS, Coordenador(a)**, em 27/08/2022, às 16:06, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com as normativas legais aplicáveis.



CERTIDÃO

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA (ACRÉSCIMO DE ANIMAIS E PRAZO)

Número de protocolo da CEUA: 028/2022

Título: Mecanismos dopaminérgicos e glutamatérgicos envolvidos no efeito modulatório da novidade sobre a reconsolidação e persistência da memória de reconhecimento reconsolidada/ ADENDO N° DE ANIMAIS E PRAZO

Data da aprovação: 11/10/2023

Período de vigência do projeto: 01/06/2024

Pesquisadores(a): Pamela Billig Mello Carpes

Campus: Uruguaiana

Telefone: (55) 9 9661-2454

E-mail: pamelacarpes@unipampa.edu.br

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa
Espécie / Linhagem / Raça	Ratos Wistar
Nº de animais	351 aprovados no projeto original + 60 aprovados no adendo (total 411)
Peso / Idade	300g a 350g/ 3 meses
Sexo	machos
Origem	Biotério da Universidade Federal de Santa Maria / RS



Assinado eletronicamente por **ALESSANDRA SAYURI KIKUCHI TAMAJUSUKU NEIS**,
Coordenador(a), em 18/10/2023, às 10:40, conforme horário oficial de Brasília, de acordo com