

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA
LABORATÓRIO DE PSICOBIOLOGIA E NEUROCOMPUTAÇÃO

ROBSON SCHEFFER TEIXEIRA

NEUROFARMACOLOGIA DA RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA

Porto Alegre

2009

ROBSON SCHEFFER TEIXEIRA

NEUROFARMACOLOGIA DA RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA

Trabalho apresentado como um dos requisitos para
obtenção do grau de Bacharel no Curso de Ciências
Biológicas, Ênfase Molecular, Celular e Funcional.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Departamento de Biofísica
Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação

Orientador: Prof. Dr. Jorge Alberto Quillfeldt

Porto Alegre

2009

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jorge Alberto Quillfeldt, pela excelente formação que me proporcionou durante todos esse anos.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Adriano Tort, pela paciência nesse último ano em me guiar por terrenos que jamais imaginara ter de passar.

Aos colegas e integrantes do grupo LPBNC, por toda a força, discussões e ensinamentos que fizeram parte do meu crescimento.

À Dona Zelma, pelo carinho incondicional por nós e pelos nossos ratinhos.

E à minha família, que me alicerçou na área científica, acredita nos meus sonhos e proporciona todas as necessidades físicas e, principalmente, emocionais para que continue nesta busca interminável pelo conhecimento.

RESUMO

A aquisição e manutenção de informações sensoriais novas obtidas através da experiência, para uso posterior, requer um processo dependente do tempo envolvendo síntese protéica em estruturas encefálicas como o hipocampo. Esse processo de estabilização pós-aquisitiva de memórias é chamado de consolidação. Dependendo como a sessão de evocação é conduzida, porém, esse traço de memória pode ser desestabilizado e disparar um novo processo dependente de síntese protéica chamado de reconsolidação. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da inibição de síntese protéica e da modulação noradrenérgica, bem como da benzodiazepínica, sobre a reativação de uma memória aversiva. Para tanto, utilizamos um inibidor da transcrição protéica (DRB), um antagonista de receptores β -noradrenérgico (Propranolol) e um benzodiazepínico (Midazolam). Ratos Wistar machos foram treinados na Esquiva Inibitória com descida da plataforma (EI) por tentativa única (*one-trial*), reativados 24 horas após o treino e testados 24 horas mais tarde. Os resultados demonstram que: (1) o DRB foi capaz de inibir a memória apenas quando a sessão de reativação da EI continha ambos os estímulos, o condicionado e o incondicionado, confirmando a ocorrência do fenômeno da reconsolidação com esta tarefa; (2) o β -bloqueador propranolol foi capaz de inibir a reconsolidação dessa memória, mas apenas numa janela temporal em torno de 1 hora após a reativação; e (3) o agonista benzodiazepínico também foi capaz de inibir a reconsolidação, mas neste caso apenas um tempo foi estudado (imediatamente após a reativação). Conclui-se, portanto, que [a] a memória da tarefa de esquiva inibitória pode ser reativada e, posteriormente, reconsolidada, que [b] tal processo, além de envolver síntese protéica, depende da modulação β -adrenérgica, possivelmente mediante a ativação de cascatas bioquímicas, como a via AMPc/PKA, disparadas pelo receptor β -noradrenérgico na fase tardia da reconsolidação, semelhante ao que ocorre durante a consolidação. Por fim, mostramos que [c] o aumento do tônus GABAérgico promovido pelo agonista benzodiazepínico foi capaz de inibir a reconsolidação também desta tarefa comportamental. Tais conclusões abrem portas para uma nova abordagem terapêutica ao tratamento de distúrbios envolvendo memórias mal-adaptativas, como o estresse pós-traumático, o qual se caracteriza em parte pela "re-experiência" subjetiva do evento traumático, e o papel da memória no abuso de drogas como a cocaína e a morfina.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	07
1.1 Neurofarmacologia	07
1.2 Tipos de Memória	08
1.2.1 Memória Declarativa x Memória Não-Declarativa	09
1.2.2 Memória de Trabalho x Memória de Curta Duração x Memória de Longa Duração	10
1.2.3 Memória Ativa x Memória Inativa	15
1.3 Fases de Memória	16
1.4 Transtorno Amnésico	21
1.4.1 Variedades de Síndromes Amnésicas	24
1.4.2 Diagnóstico diferencial	25
1.5 Estruturas Encefálicas relacionadas à Memória	26
1.6 Os Pecados da Memória	29
JUSTIFICATIVA	34
OBJETIVOS	36
3.1 Geral	36
3.2 Específicos	36
MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 Animais	38
4.2 Cirurgia	39
4.3 Aparato Comportamental e Procedimentos	39
4.4 Drogas	42
4.5 Histologia	44
4.6 Análise Estatística	44
RESULTADOS	46
DISCUSSÃO	57
CONCLUSÕES	67

APÊNDICE	70
Introdução	70
8.1 Visão Eletrofisiológica	70
8.2 O Encéfalo como um Oscilador	71
8.3 Código Neural	76
8.4 Oscilações do Lobo Temporal e Correlatos Eletrofisiológicos da Memória	77
8.5 O Sono e a Memória	81
Justificativa	85
Objetivos	87
Material e Métodos	88
Resultados	98
Discussão	111
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121

INTRODUÇÃO

1 NEUROFARMACOLOGIA

O estudo da memória e, principalmente, da sua perda, a amnésia, tem fascinado por séculos o homem. O filósofo alemão Arthur Schopenhauer, na obra intitulada “O mundo como vontade e como representação”, postula que a base de toda loucura está na perda parcial ou total da memória. Quando um desgosto, um sofrimento ou até um saber ou pensamento doloroso é tão atormentador que se torna insuportável e o indivíduo poderia sucumbir a ele, a natureza recorreria, assim, à loucura como meio de evasão da realidade para a libertação (Schopenhauer, 1859). Sem saber, todavia, Schopenhauer dá os primeiros indícios de um fenômeno de memória que, posteriormente descoberto em 1968 pelo grupo do Dr. Lewis, só atualmente ganhou atenção e será um dos focos do presente projeto: a reconsolidação. “O espírito torturado, por assim dizer, rompe o fio da memória, preenche suas lacunas com ficções e, na loucura, procura refúgio daqueles sofrimentos espirituais que ultrapassam suas forças – como alguém que amputa um membro gangrenado e o substitui por outro de madeira” (Schopenhauer, 1859). Afinal de contas, “somos aquilo que lembramos... e também somos aquilo que resolvemos esquecer” (Izquierdo, 2002).

O reconhecimento científico da natureza plástica e lábil das memórias só se deu há um século, com a hipótese da preservação/consolidação da memória proposta por Müller e Pilzecker (1900). Em estudos pioneiros com seres humanos, encontraram que a memória de informações novas é danificada pelo aprendizado de outras informações logo após o aprendizado original, sugerindo que os processos que estão por trás de novas memórias inicialmente persistem em um estado frágil e consolidam com o passar do tempo.

1.2 TIPOS DE MEMÓRIA

Conceitualmente, a memória é a aquisição (ou aprendizagem), a formação, a conservação e a evocação (recordação, lembrança, recuperação) de informações (Izquierdo, 2002). É resultado de um processo evolucionário designado para permitir aos animais adquirir, reter e evocar diversos tipos de informação que conferem alguma vantagem por comparar situações presentes com experiências prévias (Sherry & Schacter, 1987). A memória é classificada em dois sistemas principais: Sistema I, o qual está envolvido em aprendizado gradual e incremental de hábitos e habilidades, também chamado de memória procedural, habitual ou semântica; Sistema II, por sua vez, está envolvido na representação de situações específicas no espaço e no tempo, ou episódios, referida como declarativa, local ou episódica (Sherry & Schacter, 1987). Isso deixa claro que, ao invés de ser um processo simples e unitário, a memória é uma assembléia de sistemas de memória e subsistemas interconectados de diversas formas e com assinaturas moleculares, celulares e sistêmicas (Goshen-Gottstein, 2001; Szapiro *et al.*, 2002; Debiec *et al.*, 2002; Nader, 2003).

1.2.1 Memória Declarativa x Memória Não-Declarativa

No decurso da nossa vida, temos muitas experiências sensoriais que tornar-se-ão permanentes, ao menos por um período de tempo, no nosso acervo de informações. Vamos supor que alguém comente sobre Paris. Aprendemos nos livros ou por comunicação de outras pessoas muitos fatos que não vivenciamos diretamente, como que Paris é a capital da França, que é lá onde fica a Torre Eiffel e o Museu do Louvre, etc. Por outro lado, se viajássemos até Paris e a vivenciássemos diretamente, ao escutarmos a palavra Paris, não somente fatos seriam evocados, mas também eventos, principalmente aqueles consolidados com carga emotiva forte. A memória declarativa, referente ao Sistema II, compreende o nosso modelo intuitivo de memória, ou seja, a capacidade de lembrar de fatos e eventos para poder relatá-los posteriormente. Este tipo de memória é dependente do lobo temporal medial e do diencéfalo para a sua consolidação. Também aprendemos muitos procedimentos manuais durante a nossa vida. Desde criança jogamos bola, aprendemos um instrumento musical, uma arte marcial ou dança. De alguma forma, esta informação procedural é armazenada no encéfalo e podemos considerá-la uma forma de memória. As estruturas relacionadas a este tipo de memória são o estriado e o cerebelo (Izquierdo, 2002).

Há algumas diferenças entre os dois tipos de memórias: as memórias declarativas estão disponíveis para a evocação, ao passo que as não-declarativas, não; as memórias declarativas são fáceis de formar, mas também fáceis de esquecer; as não-declarativas, todavia, são mais difíceis de adquirir, mas uma vez adquiridas, são difíceis de esquecer. As memórias não-declarativas são denominadas de memórias implícitas, pois resultam diretamente da experiência, e as declarativas são chamadas de memórias explícitas, pois derivam de um esforço consciente e o termo permite

estender a definição deste tipo de memória para animais que não podem verbalizar fatos e eventos, como os seres humanos fazem (Bear, 2002).

1.2.2 Memória de Trabalho x Memória de Curta Duração x Memória de Longa Duração

Aos processos cognitivos referidos como memória têm-se dado cada vez mais atenção e já existe uma base de dados imensa que inclui eventos de memória nos níveis moleculares, celulares, sistêmicos e todos do ponto de vista eletrofisiológico, histológico e farmacológico, explorando tanto memórias de curto e longo prazo como eventos ainda mais particulares, como a aquisição, consolidação, reconsolidação e extinção, cada qual contribuindo de alguma forma para reforçar, atualizar, manter ou até mesmo enfraquecer a memória (McGaugh, 1966, 2000; Misanini *et al.*, 1968; Lewis, 1979; Debiec *et al.*, 2002; Nader, 2003; Dudai, 2004). Além disso, o papel de modulações circadianas e até mesmo as fases do sono sobre os processos de consolidação (e um termo ainda mais específico, reverberação) de memória são temas cada vez mais presentes e aceitos na literatura científica (Ribeiro, 2004).

Uma classificação muito utilizada de memória refere-se ao tempo de permanência no encéfalo. A memória de trabalho é vista como o modo de entrada das informações sensoriais que poderão formar ou não um traço mais permanente. Este tipo serve pra gerenciar a realidade, manter uma quantia limitada de informações “vivas” na consciência. Difere-se das demais memórias porque, por si só, não deixa traços, com caráter imediato, breve e fugaz, por isto também é classificada pelo seu aspecto funcional (e não temporal) (Izquierdo, 2002). A memória de trabalho é processada fundamentalmente pelo córtex pré-frontal, a porção anterior do lobo frontal, e está altamente desenvolvida em chimpanzés jovens, fenômeno denominado de imagem

eidética ou memória fotográfica (Inoue & Matsuzawa, 2007). Poucas alterações bioquímicas ocorrem durante a memória de trabalho, sendo a atividade elétrica da população de neurônios a responsável pela manutenção das informações.

Uma vez que a informação sensorial consciente (memória explícita) passa pela fase de memória de trabalho, poderá ter alguns destinos, como esvair-se, durar alguns minutos ou horas, dias ou meses ou até mesmo muitas décadas. Muito se discutiu se uma memória de longa duração passaria primeiro pela fase de curta duração no seu período inicial para assim ser consolidada e virar de longa duração, num processamento serial, ou se seriam dois processos independentes, paralelos. Os dois tipos de memória possuem muitas semelhanças: a memória de curta e longa duração (1) dependem do processamento do córtex pré-frontal durante a entrada sensorial, ou seja, a memória de trabalho, (2) recrutam áreas encefálicas em comum no processamento, a saber, hipocampo (HPC), córtex entorhinal e o córtex parietal, e (3) o conteúdo dessas memórias é fundamentalmente o mesmo. Os argumentos, todavia, direcionaram-se quase que em unanimidade a favor da teoria de processamento independente (Bear, 2002; Izquierdo *et al.*, 1998, 2002; McGaugh, 1966, 2000). De fato, muitos tratamentos amnésicos bloqueiam a memória de curta duração, deixando a de longa duração intacta e vice-versa (Bekinschtein *et al.*, 2007; Izquierdo *et al.*, 1998). A favor da segunda hipótese está que a consolidação de memória de longa duração envolve duas ondas de síntese *de novo* de ARN e proteínas, a primeira sendo em volta do tempo da aquisição da memória e a segunda cerca de 3 – 6 horas após o aprendizado (Igaz *et al.*, 2002). Ou seja, caso um inibidor de síntese protéica seja administrado após o aprendizado, a memória estará intacta se for lembrada 3 horas depois, mas será perdida (ou enfraquecida) quando lembrada um dia após. Além disso, Izquierdo *et al.* (1998) reportou 4

tratamentos capazes de bloquear a memória de curta duração sem afetar a memória de longa duração, com infusão intrahipocampal de DPAT e intra-entorhinal de CNQX, MUS e NAN (Izquierdo *et al.*, 1998). Bekinschtein *et al.* (2007) demonstrou que a proteína cinase mTOR, de ativação rápida e transiente a montante pelo BDNF, é responsável pela cascata intracelular que levará ao aumento da cinase ribossomal S6 (p70S6K) e que regula a tradução do mRNA hipocampal. Curiosamente, a rampamicina, um inibidor da mTOR, somente produz efeito amnésico em memórias de longo prazo, deixando as memórias de curto prazo intactas.

Na área CA1 do hipocampo, a memória de curta duração envolve a ativação de receptores glutamatérgicos AMPA, NMDA e metabotrópicos, cuja ação é modulada positivamente por receptores colinérgicos muscarínicos, dopaminérgicos D1 e β -noradrenérgicos, e negativamente por receptores serotoninérgicos do tipo 1A. A formação dessa memória é inibida pela ativação de receptores GABAérgicos do tipo A. Também é necessária a ativação da isoenzima α e/ou β -II da PKC e PKA aos 90 minutos (mas não nos tempos 0 e 180 minutos, como ocorre na de longo prazo). A PKG, a CaMKII, fosforilação do CREB e síntese protéica não são necessárias, mas guanilil ciclase e a via da MAPK sim. Uma diferença sistêmica importante entre a memória de curto e longo prazo é que aquela não tem o córtex pré-frontal como um fator importante para sua consolidação, ao passo que esta sim (Izquierdo, 2002; Izquierdo *et al.*, 2006).

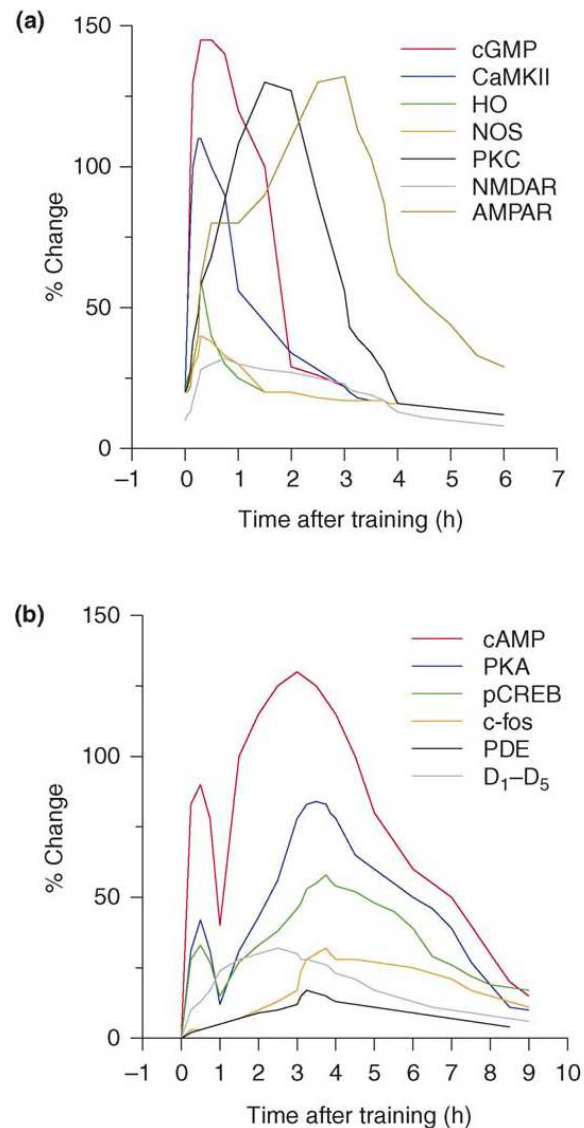


Figura 1. Eventos moleculares durante o período de consolidação na área CA1 do hipocampo. Retirando de Izquierdo (2006).

A formação de uma memória permanente requer um período definido de tempo durante o qual a informação adquirida está inicialmente num estágio frágil, mas torna-se mais estável com o passar do tempo. Em outras palavras, ela passa por um processo de estabilização pós-aquisitiva. Ribot (1881), ao observar um gradiente temporal na amnésia retrógrada, foi o primeiro a constatar que as memórias são processadas durante um período de tempo, o chamado gradiente

de Ribot. Mais tarde, este período lábil e susceptível a interferências retroativas foi referido como *consolidação* por Müller & Pilzecker (1900) (Medina *et al.*, 2008; McGaugh, 1966; mas veja Gold, 2006). A consolidação da memória pode ser dividida em duas subfases: uma fase independente de síntese de ARN (ácido ribonucléico) e proteínas que dura de 1 a 3 horas (chamada também de memória de curto prazo), e uma fase dependente de síntese de ARN e proteínas, que dura desde diversas horas a dias, semanas ou até mesmo mais tempo, chamada de memória de longa duração (Davis & Squire, 1984; Emptage & Carew, 1993; Izquierdo *et al.*, 1997, 2006; McGaugh, 1966, 2000). Além de ARN e proteínas, outros eventos moleculares tomam parte no período pós-aprendizado na área CA1 do hipocampo dorsal na codificação de memórias de longa duração (Figura 1). Há o aumento na atividade e expressão de adenosina monofosfato cíclico (cAMP), guanosina monofosfato cíclico (cGMP), cinase dependente de Ca^{2+} /Calmodulina II (CAMKII), heme oxigenase (HO), proteína cinase A (PKA), proteína cinase C (PKC), óxido nítrico sintase (NOS), receptor de N-metil-D-aspartato (NMDAR), receptor de ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA), elemento fosforilado de ligação a proteínas de resposta à molécula adenosina monofosfato cíclico (pCREB), c-fos, fosfodiesterase (PDE), receptores dopaminérgicos D1 – D5 (receptor D1 envolvido também na persistência da memória [Rossato *et al.*, 2009]), receptores muscarínicos M1 e M4 (Ferreira *et al.*, 2002) e participação do BDNF na fase tardia da consolidação (12 horas pós-treino), o qual é capaz de ativar a via da ERK (Bekinschtein *et al.*, 2008; Izquierdo *et al.*, 2006) através da sinalização pela mTOR (Bekinschtein *et al.*, 2007). Recentemente, mostrou-se também que a persistência da memória de longa duração depende da reativação da via da cAMP/MAPK/CREB durante o ciclo circadiano no hipocampo (Eckel-Mahan *et al.*, 2008).

Evidenciado o processamento independente das memórias de curta e longa duração, uma hipótese sobre o papel da memória de curta duração é basicamente o de manter o indivíduo em condições de responder rapidamente a estímulos ambientais através de uma cópia da memória principal enquanto esta está passando pelo processo de consolidação para armazenamento de longa duração. Por esta razão a memória de curta duração não sofre extinção ao longo das 4-6 horas em que se estima a sua duração máxima (Izquierdo, 2002).

1.2.3 Memória Ativa x Memória Inativa

Após a primeira demonstração de reconsolidação, em 1968, pelo laboratório do Dr. Lewis na Universidade de Rutgers (Misanin *et al.*, 1969), só recentemente houve maior interesse por este novo evento de processamento de memória. Descobriu-se que após o término do período de consolidação, a estabilização pós-aquisitiva de informações (Dudai & Eisenberg, 2004), uma sessão de reativação, definida como o retorno à consciência de uma memória previamente estabelecida, resultando na sua labilização (Tronson & Taylor, 2007), é capaz de disparar um novo processo de estabilização dessa memória, denominada de reconsolidação (Dudai & Eisenberg, 2004; Lee *et al.*, 2004; Nader *et al.*, 2000a, 2000b, 2005; Nader, 2003a, 2003b; Nader & Wang, 2006; Przybylski & Sara, 1997; Przybylski *et al.*, 1999; Sara, 2000, 2006; Tronson & Taylor, 2007). Dos estudos de reconsolidação, uma das principais conclusões que se pode tirar é que memórias novas e memórias antigas reativadas existem em estados similares (porém não idênticos [Dudai & Eisenberg, 2004; Lee *et al.*, 2004]). Como consequência, qualquer teoria de consolidação que queria unificar os achados de reconsolidação não deverá encarar o tempo depois do treino como o fator crítico que determina a estabilidade da memória.

Os achados de Lewis motivaram-no a sugerir a existência de duas formas de memória (Lewis, 1979). Independente da memória de curta duração e da memória de longa duração serem processos paralelos ou seriais, o fator importante, argumenta, para encarar o estado das memórias é considerá-las (todas) como de longa duração ou permanentes (na sua forma inativa, consolidada e não sendo momentaneamente reativada) e que uma pequena parcela desse acervo de memórias estará na forma ativa (composta de memórias novas ou memórias antigas reativadas). Este paradigma alternativo não refere-se a um ponto particular no tempo e pode abarcar os estudos tanto de consolidação como de reconsolidação, tornando-se um sistema heurístico útil para guiar futuros estudos (Nader *et al.*, 2000).

1.3 FASES DE MEMÓRIA

A Teoria da Consolidação da Memória, proposta por Müller & Pilzecker (1900), é um dos paradigmas mais usados e aceitos na área de neurofarmacologia da memória. Partindo desta visão, pode-se dividir a memória em dois processos fundamentais, a *Formação* e a *Lembrança*. Durante a fase de formação da memória, podem-se distinguir duas fases que, por definição, subtendem que são processos que estendem-se no tempo: *Aquisição*, conhecida como aprendizado, e *Consolidação*, a fase lábil durante a qual o traço de memória está sendo estabilizado fisicamente no encéfalo. A *lembrança*, conhecida como *evocação* ou *expressão*, se dá durante a fase de reexposição ao contexto do aprendizado (embora não haja necessidade de reexpor a todos os estímulos presentes durante a formação). A natureza do evento de evocação poderá levar a duas outras fases distintas de memória: (a) reconsolidação, caso a reativação seja curta o suficiente para relabilizar a memória, ou (b) extinção, caso a reativação seja longa o suficiente para realizar uma nova memória inibitória e competitiva com a original.

Os processos moleculares da consolidação de memórias de curto e longo prazo (e suas diferenças) já foram vistas anteriormente (seção 1.1.2). Os eventos de evocação, extinção e reconsolidação também disparam processos moleculares. Vejamo-los:

- a) *evocação*: o estudo da recordação de memórias, naturalmente, bifurca-se em evocação de memórias de curta (quando os animais são testados cerca de 3 horas depois do treino) e longa duração (definida como a memória testada 24 horas depois do treino). A evocação de memória de curta duração requer, em CA1, receptores glutamatérgicos AMPA e metabotrópicos mGluRs e ativação de receptores β -noradrenérgicos, não necessitando das rotas bioquímicas de PKC, PKA, MAPK ou CaMKII. A evocação de memórias de longa duração requer receptores glutamatérgicos AMPA e metabotrópicos mGluRs, atividade de PKA, via da MAPK (em especial a atividade das enzimas p42 e p44 em CA1 são indicadores de níveis de evocação), queda de P-CREB 3 horas após a evocação, atividade de PKC (isoformas α e β -I), sendo que CaMKII não é mais necessária. É interessante notar que a evocação é um processo ativo que atua como gatilho para outros dois processos, dependendo da natureza da evocação: extinção ou reconsolidação (Szapiro *et al.*, 2002).
- b) *extinção*: partindo do ponto de vista que a extinção não é um processo de esquecimento ou apagamento de memórias, mas sim a formação de uma nova memória de natureza inibitória e competitiva com a memória original, é de se esperar que possua semelhanças com o período original de consolidação. Deste modo é de se esperar que também a extinção tenha fases semelhantes, como aquisição, consolidação e evocação. De fato, para que ocorra a consolidação da extinção é necessária síntese protéica *de novo* e, conseqüentemente, expressão gênica em CA1 (Vianna *et al.*,

2003). Nesta mesma estrutura, há a necessidade de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, CaMKII, PKA e MAPK. A expressão correta da extinção (sem ocorrência de recuperação espontânea) envolve uma orquestração entre estruturas: a amígdala armazena ambas as memórias de condicionamento original e extinção. A informação contextual (sem estímulo incondicionado) entra simultaneamente na amígdala, hipocampo e córtex pré-frontal medial infralímbico (IL mPFC). O IL mPFC integra a informação do estímulo condicionado com a informação contextual do hipocampo para determinar a evocação da extinção. Uma vez no contexto da extinção, o IL mPFC inibe a saída da amígdala, para reduzir o medo. Fora do contexto de extinção, a saída da amígdala fica desinibida (Quirk & Mueller, 2008). Para uma interpretação eletrofisiológica, ver Scheffer Teixeira (2009).

- c) *reconsolidação*: apesar do nome e de compartilhar função (armazenamento) e mecanismo (síntese protéica), a reconsolidação não é simplesmente um processo que reitera a consolidação. Implica, ao invés disso, um processo de estabilização pós-reativação de uma memória previamente consolidada e estabilizada. Se partirmos do ponto de vista de Lewis (1979), pensando nas memórias como estando nos estados ativo e inativo, o processamento de memória possui apenas dois eventos: desestabilização (ocasionada pela reativação) x estabilização (reconsolidação propriamente dita). A primeira publicação a trabalhar com o caso da desestabilização de memórias consolidadas é o de Mamou *et al.* (2006) que, partindo de um protocolo de *medo condicionado ao contexto* previamente conhecido e aceito de inibição da reconsolidação por administração de anisomicina na amígdala basolateral (BLA), fez três tratamentos pré-reativação na mesma estrutura: infusão de ifenprodil e AP5,

ambos antagonistas de receptores NMDA, e CNQX, um antagonista de receptores AMPA. Os tratamentos pré-reativação com antagonistas NMDA bloquearam a amnésia induzida pela administração de anisomicina pós-reativação, ao passo que o CNQX não produziu qualquer efeito de inibição. Isto sugere que os receptores NMDA são necessários para a relabilização da memória, ao passo que os receptores AMPA não. Curiosamente, os receptores AMPA estão seletivamente envolvidos na evocação de tal forma que, mesmo os animais não congelando durante a sessão de reativação, a reconsolidação é subsequente inibida com o tratamento de anisomicina. Isto está de acordo com preocupações antigas de que a *fixação da memória* não é sinônima de *fixação de comportamento*, e processos invisíveis comportamentalmente estão em plena atividade no processamento mnemônico (McGaugh, 1996). Um modelo de LTP para a reconsolidação também foi proposto no HPC (Fonseca *et al.*, 2006). Inibidores de síntese protéica aplicados durante a indução da LTP são capazes de bloquear a sua expressão, ao passo que aplicações tardias não afetam a sua manutenção; se as aplicações tardias, todavia, forem realizadas durante uma breve (re)estimulação eletrofisiológica, um decaimento da LTP é observado. Além disso, se durante a aplicação dos inibidores de síntese protéica a fatia do HPC for tratada com AP5, o decaimento da LTP não é mais observado, sugerindo que também é dependente de receptores NMDA. Este trabalho sugere não somente que a ativação sináptica seja necessária para a relabilização da memória (aceitando-se a LTP como seu correlato eletrofisiológico), mas também que o decaimento da LTP observada com a inibição da síntese protéica é dependente da atividade normal dos receptores NMDA, sendo esta a primeira demonstração eletrofisiológica que os receptores NMDA são necessários

para a labilização de memórias consolidadas. Mais recentemente, Lee *et al.* (2008) demonstrou que a desestabilização de memórias inativas também envolve a degradação protéica sináptica. A reativação da memória de medo condicionado ao contexto na área CA1 do hipocampo de ratos dispara a marcação de proteínas por poliubiquitinação. Essas proteínas tornam-se alvo para entrar na via da ubiquitina-proteassoma, resultando na proteólise pelo complexo do proteassoma 26S. Caso este complexo de degradação seja inibido, o efeito amnésico resultante de anisomicina é revertido, demonstrando que a remoção de proteínas pré-existentes para a fabricação de proteínas novas é um pré-requisito para a remodelagem sináptica que codificará a memória atualizada (ou modificada), estabilizando-a pelo processo de reconsolidação. O estudo da reestabilização de memória, ou reconsolidação, por outro lado, já conta com uma gama maior de estruturas relacionadas, neurotransmissores envolvidos e cascatas bioquímicas ativadas, dependendo muito do tipo de tarefa de memória usada e a natureza cognitiva dela. Em tarefas de memória emotiva relacionada ao medo, como a esQUIVA inibitória, medo condicionado ao contexto e medo condicionado ao som, são necessários, no hipocampo e na amígdala, síntese protéica, neurotransmissão por glutamato e receptores glutamatérgicos mGluR, NMDA, mas não AMPA, atividade noradrenérgica em receptores β -noradrenérgicos, atividade canabinérgica em receptores CB1, atividade colinérgica, expressão imediata de zif268, c-Fos, JunB, SGK3, moléculas de sinalização PKA, ERK e ERK2, e os fatores de transcrição CREB, NF κ B e C/EBP β na BLA, mas não no HPC. Em tarefas espaciais, de reconhecimento de objetos e condicionamento de preferência de lugar em que drogas de abuso são usadas, há ainda o envolvimento de outras estruturas, como núcleo

accumbens, córtex pré-frontal ventromedial, habenula, estriado e córtex entorhinal (Figura 2.; Tronson & Taylor, 2007).

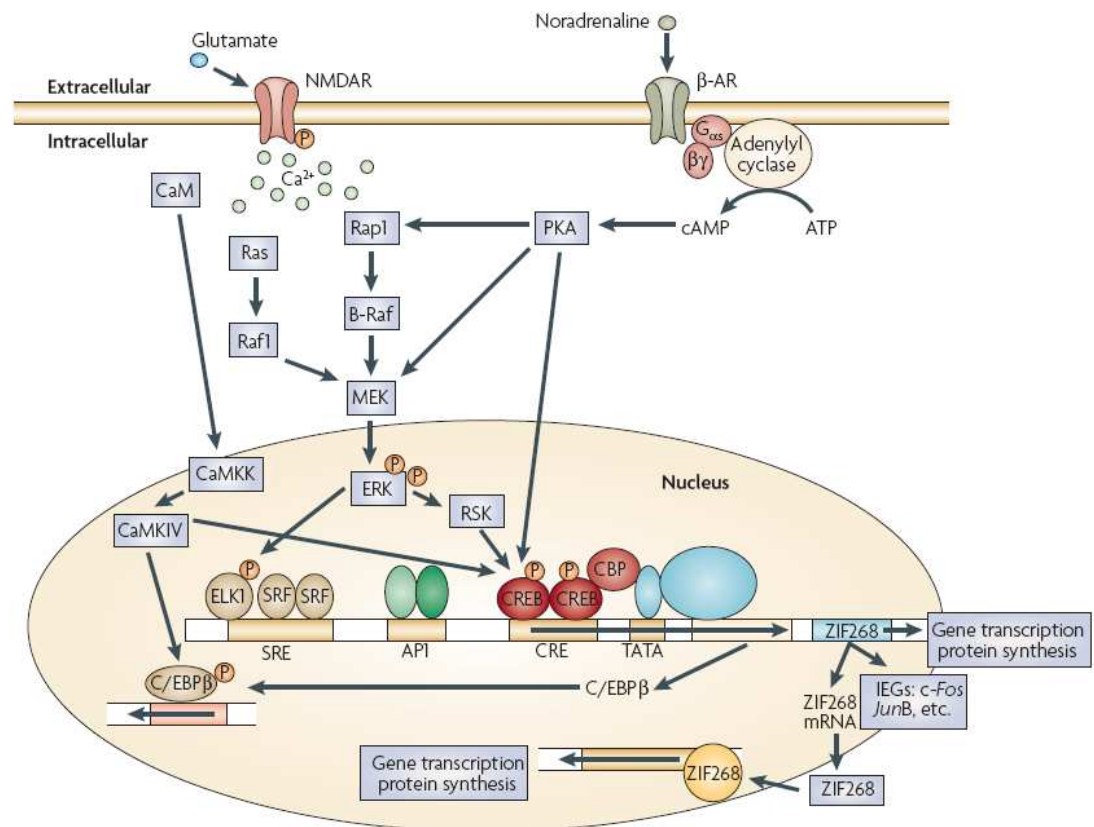


Figura 2. Mecanismos moleculares centrais na reconsolidação de memória. Retirado de Tronson & Taylor (2007).

1.4 TRANSTORNO AMNÉSICO

De acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico de Doenças Mentais (DSM-IV), o Transtorno Amnésico (às vezes referida em artigos como Síndrome Amnésica) caracteriza-se por uma alteração da memória, que pode ser devido a aspectos tanto fisiológicos de uma enfermidade

médica (neste caso incluem-se, por exemplo, traumatismo físico, hipotermia, deficiência de vitaminas ou doenças neurodegenerativas), também chamada de transtorno amnésico devido à enfermidade médica, como devido a ação persistente de substâncias químicas (por exemplo, abuso de drogas [álcool, sedativos, hipnóticos, ansiolíticos], mediação ou exposição a toxinas), chamado de transtorno amnésico persistente induzido por substância. Estes transtornos comportam um quadro clínico caracterizado pela deterioração da memória e se diferenciam segundo a sua etiologia. Ademais, também inclui-se o transtorno amnésico não especificado, para os quadros em que não se determina a causa da deterioração da memória.

Após um evento que desencadeia uma amnésia, esta pode apresentar-se de duas formas:

- (a) *amnésia retrógrada*: caracterizada pela perda de memória de eventos anteriores ao trauma. Há um gradiente temporal de perda de memórias explícitas, uma vez que somente memórias mais recentes estão mais vulneráveis à perda e, por outro lado, memórias antigas são mais fortes e difíceis de serem perdidas (Bear, 2002; Clark *et al.*, 2002);
- (b) *amnésia anterógrada*: é a dificuldade de adquirir e consolidar novas informações após o trauma. Nos casos mais graves há uma incapacidade de aprender qualquer coisa nova (Bear, 2002).

Outras formas clínicas de alterações da memória são:

(a) *Amnésia global transitória*: esta forma de amnésia é bem mais curta, na qual um acesso repentino de amnésia anterógrada, normalmente acompanhada de sintomas de enxaqueca, como dores de cabeça, tontura ou náuseas, dura por apenas um período de minutos a dias, seguida por amnésia retrógrada para eventos recentes que precederam o ataque. Uma revisão feita por

Quinette *et al.* (2006) mostrou que, em mulheres, episódios de amnésia global transitória estão associados com eventos precipitadores emocionais, história de ansiedade e personalidade patológica; em homens, por outro lado, tais eventos ocorrem mais freqüentemente depois de eventos precipitadores físicos. Em jovens, a história de cefaléia constitui um importante fator de risco. Análises por hemodinâmica demonstraram que, na fase aguda do ataque de amnésia, há uma disfunção transiente do lobo temporal medial (Quinette *et al.*, 2006), como uma breve isquemia cerebral, explicando alguns ataques que foram causados por estresse físico, abuso de drogas ou até mesmo atividade sexual, pois todos esses fatores alteram o fluxo de sangue encefálico (Bear, 2002).

(b) *Hipermnésia*: os quadros clínicos de memória normalmente referem-se à perda desta (amnésia retrógrada) ou à incapacidade ou dificuldade de formar novas memórias (amnésia anterógrada). Há, todavia, uma forma alterada da memória que, a princípio, seria o desejo de qualquer ser humano: uma memória perfeita ou a capacidade de formar e evocar memórias complexas com precisão, chamada de hipermnésia. O estudo de um caso clínico demonstra que esse quadro não é tão desejável quanto parece. Em 1920, o psicólogo russo Aleksandr R. Luria realizou uma série de estudos a respeito de um paciente, chamado de Sherashevsky (referido como S.), que possuía uma memória extraordinária. S. era capaz de ler uma seqüência de 70 palavras e repeti-las em ordem, na ordem inversa ou em qualquer outro padrão. Em testes de retenção, S. era capaz de evocar listas que havia visto há 15 anos. O método mnemônico para esta memória talvez fosse um conjunto de fatores, como a retenção de imagens vívidas de coisas que ele havia visto e uma resposta sensorial na forma de sinestesia, ou seja, ao ouvir um som, ele via pontos coloridos de luz e sentia um sabor na sua boca. Embora a idéia de memória perfeita como a de S. seja atraente, se considerarmos que ela também era perfeita (quem sabe em maior grau

inclusive) para situações humilhantes, embaraçosas, constrangedoras ou tristes, pensamentos intrusivos dessas situações poderiam desencadear graves quadros depressivos e estressantes, como ocorre no transtorno de estresse pós-traumático (Bear, 2002; Izquierdo, 2002).

1.4.1 Variedades de Síndromes Amnésicas

A síndrome amnésica pode ser definida como um estado mental anormal no qual a memória e o aprendizado estão afetados numa proporção significativa em relação a outras funções cognitivas num paciente responsivo e em alerta. Diversas desordens podem disparar uma síndrome amnésica, chamada (visto acima) de transtorno amnésico devido à enfermidade médica.

Podem-se listar (Izquierdo, 2002; Kopelman, 2002) :

- Encefalite por Herpes;
- Hipóxia Severa;
- Lesões Vasculares;
- Trauma Craniano;
- Lesões do Prosencéfalo Basal;
- Doenças que são em si mesmas demências, como o Mal de Alzheimer, a doença de Pick e a de Creutzfeld-Jacob, e doenças que podem levar a um quadro de demência, como a doença de Parkinson ou a síndrome de imunodeficiência adquirida;
- Tumor na Linha Média Profunda;
- Síndrome de Korsakoff;
- Amnésia Global Transiente;
- Amnésia Epiléptica Transiente;

- Esquizofrenia.

O transtorno amnésico pode ser transitório, com duração de dias até um mês, como ocorre com o a amnésia transitória global, ou crônico, quando prolonga-se mais de um mês. O procedimento de diagnóstico, como consta no DSM-IV, segue-se com os seguintes critérios:

A. A deterioração da memória se manifesta por um déficit da capacidade para aprender informações novas ou pela incapacidade de recordar informações aprendidas previamente.

B. A alteração da memória provoca uma deterioração significativa da atividade laboral ou social e representa uma diminuição do nível prévio de atividade.

C. A alteração da memória não aparece exclusivamente no transcurso de um delírio ou de uma demência.

D. Demonstração, através da história, da exploração física ou das provas de laboratório, de que a alteração é um efeito direto da enfermidade médica (incluindo um traumatismo físico).

Há a necessidade de especificar se é transitório (deterioração dura menos de um mês) ou crônico (deterioração dura mais de um mês).

1.4.2 Diagnóstico diferencial

O DSM-IV argumenta que o transtorno amnésico deve distinguir-se da amnésia dissociativa e da amnésia que se apresenta no contexto de outros transtornos dissociativos, como o transtorno dissociativo de identidade e a fuga dissociativa. Isto baseado na definição de que o transtorno amnésico se deve a efeitos fisiológicos diretos de uma enfermidade médica ou ao consumo de substâncias, e a amnésia destes transtornos não implica déficit de aprendizado ou de recordação de novas informações.

Para alterações de memória presentes somente durante a fase de intoxicação ou abstinência de drogas de abuso os diagnósticos apropriados seriam “intoxicação por substância” e “abstinência de substância”, não devendo-se realizar um diagnóstico separado de transtorno amnésico. Também deve-se tomar cautela ao diagnosticar transtorno amnésico em quadros que sugerem simulação ou transtorno factício.

1.5 ESTRUTURAS ENCEFÁLICAS RELACIONADAS À MEMÓRIA

A formação da memória no encéfalo dos mamíferos envolve principalmente o lobo temporal medial. Embora o encéfalo de roedores não o tenha especificamente, contém as estruturas conservadas que contribuem para as memórias episódicas. Tais estruturas são coletivamente designadas como sistema hipocampal e incluem a formação hipocampal (giro denteado, áreas CA1, CA2 e CA3 e o *subiculum*), extremamente interconectada e contendo 3 camadas celulares, e a região parahipocampal (córtex entorhinal, áreas perirhinal 35 e 36, córtex postrhinal, *presubiculum* e o *parasubiculum*; Figura 3), os quais contém seis camadas celulares (Witter, 2000; Furtak *et al.*, 2007; Kerr *et al.*, 2007). A posição neuroanatômica do córtex entorhinal é bem designada como um portão para a formação hipocampal, agindo como um pré-processador de informação direcionada para o hipocampo, incluindo informação espacial pela área entorhinal medial, a qual está conectada às áreas perirhinais e postrhinais, e informação não-espacial pela área entorhinal lateral, conectada principalmente à área perirhinal, um local de convergência de informação perceptual envolvida em processamento sensorial polimodal (Furtak, 2007; Kerr, 2007). Estas estruturas, uma vez trabalhando em conjunto, podem gerar memórias do tipo “item no contexto” e “localização de item” através de informação de entrada convergente espacial e não-espacial (Manns & Eichenbaum, 2006).

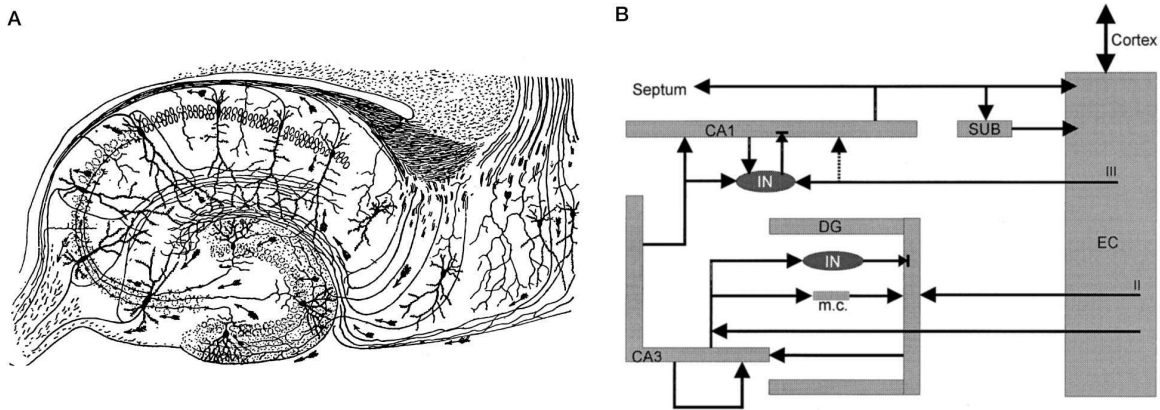


Figura 3. Arquitetura funcional do hipocampo. A. Representação do hipocampo feita por Ramón Y Cajal por coloração de Golgi. B. Principais conexões do sistema hipocampal. Note que em CA3 há as recorrentes excitatórias e, em CA1, há uma recorrente inibitória. Retirando de Draguhn *et al.* (2000).

Scoville e Milner (1957) escreveram que o hipocampo tem um papel temporal limitado no processamento de memória, principalmente envolvido na formação de memórias conscientes (Clark & Squire, 1998) e persistência de memórias recentes. Estas memórias, referidas como hipocampo-dependentes, tornam-se gradualmente independentes do lobo temporal medial à medida que são consolidadas em circuitos neocorticais. Uma vez que se tornam hipocampo-independentes, são referidas como memórias remotas (Scoville and Milner, 1957; Debiec *et al.* 2002; Nader, 2003; Wiltgen *et al.*, 2004).

Durante a consolidação neocortical, as principais estruturas ativadas são o córtex prefrontal (cingulado anterior) e os córtices temporal e frontal (Bontempi *et al.*, 1999; Wiltgen *et al.*, 2004). A área CA1 hipocampal providencia uma rota fugal principal de saída no hipocampo dorsal para áreas relacionadas (Remondes, 2002), como o córtex entorhinal e o neocórtex. Esta

característica pode estar por trás dos resultados obtidos com sono e memória por Ribeiro (1999, 2002, 2004a, 2004b). Além do mais, o hipocampo apóia uma dissociação dupla na ortogonalização da informação sensorial de entrada tanto pelo giro denteado, responsável pela separação de padrão espacial, ou por CA1, que suporta uma separação de padrão temporal (Gilbert *et al.*, 2001).

Áreas não menos importantes, mas que não são o foco deste estudo, incluem a amígdala, o córtex parietal e córtex pré-frontal. A amígdala, também chamada de complexo amigdalóide, é uma estrutura complexa do sistema límbico, consistindo de 12 regiões, cada uma subdividida em diferentes subregiões. Um dos esquemas mais usados para explicá-la consiste em dividi-la nas áreas de maior relevância para o condicionamento ao medo, a área lateral (LA), basal (B), basal acessória (AB) e núcleo central (CE). Em outros esquemas, B é conhecido como núcleo basolateral e AB como núcleo basomedial. O termo complexo basolateral é também usado para se referir a LA e B juntos (LeDoux, 2000). Embora seja aceito que a amígdala é parte central da circuitaria do medo, permanece em debate se as memórias associadas ao medo ou emocionais são codificadas na própria amígdala (sendo que esta também é capaz de modular outros tipos de memórias) ou se a sua função é modulatória sobre a formação da memória de medo que se dá em outras estruturas, como o hipocampo. Seja qual for a hipótese correta, os processamentos mnemônicos do hipocampo (informação espacial e contextual) e da amígdala (informação emocional e/ou aversiva) são integrados, sendo o córtex entorhinal um forte candidato, e transmitidos para o córtex parietal (Izquierdo *et al.*, 1997) como um sítio cortical extratemporal de consolidação e cuja força e rapidez de transmissão é modulada pelo sono (Ribeiro & Nicolelis, 2004; Ribeiro *et al.*, 2003, 2004; Stickgold *et al.* 2001). Esta consolidação neocortical é muito

mais lenta do que a hipocampal e a justificativa de modelos conexionistas é que nova informação precisa ser gradualmente armazenada sem interferir com a estrutura do conhecimento ou das memórias prévias do neocórtex, caso contrário, ela poderia ocupar o lugar de memórias antigas e ir apagando-as à medida que o hipocampo fosse transferindo essas novas informações. Neste estágio, o córtex pré-frontal, que participou inicialmente na formação da memória de trabalho, terá o papel de organizar a evocação das memórias que estão distribuídas pelo neocórtex, já que elas tornam-se hipocampo-independentes (Wiltgen *et al.*, 2004).

1.6 OS PECADOS DA MEMÓRIA

É muito vantajoso para um sistema de redes neurais ser capaz de incorporar, reter, acessar e modificar informações sensoriais de tal forma que, à medida que vai acumulando e organizando informações obtidas pela experiência, o sistema passe a responder com uma aptidão cada vez mais refinada. Não é a toa que a memória, no seu termo mais geral, é uma capacidade amplamente difundida no reino Metazoa (para uma revisão, Nader & Hardt, 2009). Essa capacidade, todavia, abriga um lado negro que explica porque pessoas esquecem tão rápido alguns eventos, distorcem o passado ou até mesmo lembram-se tão perfeitamente um evento traumático que passam a ter as mesmas reações somáticas que tiveram durante a experiência original (Diergaarde *et al.*, 2008; Schacter, 1999). Estes eventos são tão fortes que abordagens terapêuticas para enfraquecer memórias mal adaptativas (incluindo abuso de drogas) foram propostas com base na extinção (Quirk & Mueller, 2008) ou reconsolidação (Alberini, 2006, 2007; Lee *et al.*, 2005; Lee & Everitt, 2007; Milekic *et al.*, 2006; Nader *et al.* 2000; Przybylski *et al.*, 1999; Robinson & Franklin, 2007).

Schacter (1999) enumera 7 pecados da memória em três grandes grupos. O primeiro grupo é chamado de Pecados de Omissão: (1) *Transitoriedade*, a deterioração da capacidade de acessar informações cada vez mais antigas; (2) *Distração*, processamento em que a desatenção durante a codificação da memória é o principal causador da incapacidade de recordar de fatos; e (3) *Bloqueio*, a incapacidade temporária de acessar a memória porque há uma outra memória interferindo. O segundo grupo é chamado de Pecados de Intromissão: (4) *Atribuição Enviesada*, a recordação da informação é atribuída a uma fonte errada; (5) *Sugestibilidade*, tendência a incorporar informações fornecida por terceiros às próprias memórias durante tentativas de recordá-las; (6) *Distorção*, reflete a capacidade do estado interno da consciência, ou seja, suas crenças, conhecimento e sentimentos, a distorcer memórias de experiências prévias e afetar julgamentos atuais e futuros. Por último, embora esteja na mesma categoria das memórias que estão presentes, mas de alguma forma foram modificadas (intromissão), a (7) *Persistência* é um pouco mais particular, pois não é uma distorção, mas sim uma intrusão insistente de memórias traumáticas ou lembranças patológicas que não conseguem ser esquecidas, por maior que seja o esforço e desejo consciente.

De especial interesse para este trabalho estão os pecados de sugestibilidade e persistência, pois, ao passo que aquela pode ser explicada pela teoria da reconsolidação, esta pode ser tratada. O caso da sugestibilidade tem como consequência direta a possibilidade do surgimento de falsas memórias, o que possui ampla aplicação clínica e legal, pois inúmeros casos de alegações de abuso sexual na infância ou prática de rituais satânicos são “descobertos” após sessões de psicoterapia que visam recuperar informações emocionais que supostamente foram ativamente reprimidas pelo encéfalo (um possível mecanismo pelas regiões prefrontais é proposto por Depue

et al. (2007)); as evidências, todavia, demonstram que a repressão de memórias traumáticas é um caso raro (mas veja Kopelman, 2002; Penfold, 1996; Schacter, 1999) e que a explicação alternativa a estes casos de alegações de abuso são falsas memórias implantadas durante as sessões de psicoterapia, decorrente do “aproveitamento indevido” do pecado da sugestibilidade, explicada agora pela teoria da reconsolidação (Loftus, 1993, 2005; Loftus & Davis, 2006).

Loftus (1993) relata casos em que pacientes procuram terapias por outros motivos e, logo no primeiro dia de terapia, saem da sessão com o “diagnóstico” de abuso e que, a partir daquele momento, deverá realizar novas sessões para acessar a suposta memória reprimida. As sessões de terapia e recomendações que o terapeuta faz ao seu paciente são altamente sugestivas. Como o paciente não lembra destas memórias, o terapeuta passa a fazer um interrogatório intenso visando pegar pequenos detalhes que teriam passado despercebido pelo paciente, de modo que ele tome isto como prova da ocorrência e passe a fazer esforço ativo para recuperá-la (como, por exemplo, desordens de sono, sonhos sugestivos, memória corporal, sensação de que algo aconteceu, etc). O paciente é encorajado a fazer muitas suposições sobre pequenos *eventos*, como alguma vez em que esteve no colo do pai, passa por sessões de hipnose, análises de sonhos, sessões de reativação da memória com fotografias, desenhos da infância e ajuda em grupos de apoio. Em cada uma destas sessões, a simples, pequena e antiga memória de um colo do pai vai tornando-se cada vez maior, com mais informações sendo adicionadas discretamente a cada sessão de reativação de tal forma que, cedo ou tarde, o paciente convence-se de que houve abuso sexual. O oposto também pode ocorrer, como o caso da confissão de um assassinato descrito em Kopelman (2002) que, descobriu-se depois, era uma falsa memória de um jovem que surgiu da somatória: estado emocional abalado (baixa auto-estima e depressão), estar sob efeito de pentobarbital durante

interrogatório, coerção externa dos policiais e, subsequente, internalização mais concreta do fato após a “confissão”. Em ambos os casos, a reconsolidação é capaz de explicar a geração das falsas memórias. Após uma determinada memória ser intensamente reativada, ela torna-se novamente lábil e vulnerável no sentido que ela tanto pode perder como ganhar informações, numa espécie de atualização (Debiec *et al.*, 2002). Cada sessão de psicoterapia (ou até mesmo a obsessão ou motivação do paciente fora das sessões) seria, na verdade, uma sessão de reativação em que pouco a pouco novas informações fossem sendo adicionadas à memória antiga, resultando numa memória quase que completamente falsa e implantada.

Por outro lado, a demonstração de que as memórias passam por um período lábil após serem reativadas abre caminho para uma aplicação clínica das amnésias induzidas durante a reconsolidação para tratar memórias patológica, como o Transtorno por Estresse Pós-Traumático (TEPT). É considerado um Transtorno de Ansiedade e é característico após a exposição a uma situação extremamente estressante e traumática em que o indivíduo se vê rodeado por situações que implicam riscos à vida ou ameaças à sua integridade física, como acontecem em guerras, roubos, reféns de assaltos, pessoas que sofrem agressão física e/ou sexual. Os indivíduos afetados pelo TEPT reexperimentam a situação traumática de várias formas, como recordações recorrentes e intrusivas, pesadelos e até mesmo estados dissociativos de tal forma que se o indivíduo revive os aspectos fisiológicos do trauma como se ele estivesse novamente no ocorrido. Após o acontecimento, o indivíduo apresenta sintomas dissociativos, como embotamento afetivo, desligamento da realidade, despersonalização, amnésia dissociativa e pouco conhecimento do seu entorno (aturdido). Uma hipótese para este transtorno de ansiedade diz respeito à memória que foi formada, num estado discutido anteriormente de hipermnésia, e envolve principalmente uma

ativação noradrenérgica excessiva de tal modo que o estado neurofisiológico interno durante a formação original da memória é subsequente e recriado (Przybylski *et al.*, 1999).

Schacter (1999) usou os pecados bíblicos, ou seja, exagerações de alguns traços humanos que são necessários e até mesmo indispensáveis para a sobrevivência, como uma metáfora para os traços que aparentemente seriam os pontos fracos da memória humana. Esses pecados da memória, todavia, não devem ser vistas como erros ou imperfeições evolutivas, mas sim como efeitos colaterais ou custos de um sistema adaptativo e desejável. No caso da sugestibilidade, uma distorção de experiências prévias, sua origem encontra-se numa fonte pobre de memória para um evento que, não tendo grande importância adaptativa naquele contexto ambiental, muitos detalhes essenciais são simplesmente degradados ao longo do tempo. A capacidade humana de generalização também contribui para a sugestibilidade, pois ela justamente é capaz de agrupar em categorias a relevância das experiências prévias, sem ater-se a detalhes desnecessários, para lidar com qualquer situação futura que assemelha-se em algum grau com a prévia.

Já o pecado da persistência talvez seja o mais fácil em ver o seu lado positivo e adaptativo. Embora lembranças intrusivas de experiências negativas e traumáticas do passado sejam atormentadoras, é extremamente importante para a nossa espécie que experiências emocionais estimulantes, que podem ocorrer por situações que coloquem risco à vida, persistam ao longo do tempo. Os casos de TEPT, por este ângulo, são custos da capacidade que a memória tem em reter este tipo de informação e que, sem a qual, dificilmente a vida humana teria como continuar.

JUSTIFICATIVA

A presente proposta de pesquisa é justificada pelo fato de que, apesar de haver uma extensa base de dados sobre memória, sempre novas descobertas, sejam modelos comportamentais que revelam novidades cognitivas, sejam novas ferramentas farmacológicas, como drogas cada vez mais seletivas, que revelam a dependência da expressão de uma memória com bases moleculares, abrem caminhos ainda mais interessantes de serem percorridos. Com a adoção da visão da reconsolidação de memória, por exemplo, uma dessas novidades, foi possível dar uma explicação alternativa (e, na visão do proponente deste projeto) mais razoável sobre a realidade das memórias reprimidas, de ampla importância no direito penal (Loftus, 1993; Loftus & Daves, 2006). Como nem todas as memórias podem passar pelo processo de reconsolidação, isto é, tornarem-se novamente lábeis, a possibilidade de interferir com memórias já consolidadas, ou até mesmo memórias remotas, através da reconsolidação, embora possível, ainda requer estudos e modelos mais aprofundados. Tal interesse é justificado pelo potencial terapêutico da técnica, como tratamentos de desordens psicológicas (estresse pós-traumático e vícios) (Nader, 2003; LeDoux, 2007; Lee, 2007) ou até mesmo a criação de uma “pílula de recuperação de memória”, visto que os casos de amnésia podem ser problemas tanto na consolidação da memória (neste caso a memória não existe, pois não foi consolidada) quanto na evocação de memórias

guardadas (neste caso memórias existem dentro do encéfalo, mas não conseguem ser acessadas para evocação) (Nader, 2006).

OBJETIVOS

3.1 GERAL

Validar em ratos uma nova metodologia para tornar uma memória consolidada de longa duração novamente lábil e vulnerável a tratamentos farmacológicos de diferentes naturezas, seja por inibição de síntese protéica generalizada, seja por inibição da neurotransmissão noradrenérgica e GABAérgica.

3.2 ESPECÍFICOS

3.2.1 Estudar o efeito da infusão de DRB após uma sessão de reativação *contexto-choque*, realizada com apresentação do contexto e de um choque com metade da intensidade do treino, na tarefa de esQUIVA inibitória (Figura 4, item (a));

3.2.2 Estudar o efeito da infusão de DRB após uma sessão de reativação *somente choque*, realizada com a apresentação direta de um choque com metade da intensidade do treino, na tarefa de esQUIVA inibitória (Figura 4, item (b));

3.2.3 Estudar o efeito da infusão de DRB após uma sessão de reativação *somente contexto*, realizada com apresentação do contexto e ausência de choque, na tarefa de esQUIVA inibitória (Figura 4, item (c));

3.2.4 Estudar o efeito da infusão de DRB na ausência de uma sessão de reativação na tarefa de esquiva inibitória (Figura 4, item (d));

3.2.5 Estudar o efeito da injeção de propranolol imediatamente após uma sessão de reativação *contexto-choque* na tarefa de esquiva inibitória (Figura 5, item (a));

3.2.6 Estudar o efeito da injeção de propranolol 30 minutos após uma sessão de reativação *contexto-choque* na tarefa de esquiva inibitória (Figura 5, item (b));

3.2.7 Estudar o efeito da injeção de propranolol 1 hora após uma sessão de reativação *contexto-choque* na tarefa de esquiva inibitória (Figura 5, item (c));

3.2.8 Estudar o efeito da injeção de propranolol 2 horas após uma sessão de reativação *contexto-choque* na tarefa de esquiva inibitória (Figura 5, item (d));

3.2.9 Estudar o efeito da injeção de propranolol 3 horas após uma sessão de reativação *contexto-choque* na tarefa de esquiva inibitória (Figura 5, item (e));

3.2.10 Estudar o efeito da injeção de midazolam imediatamente após uma sessão de reativação *contexto-choque* na tarefa de esquiva inibitória (Figura 5, item (a)).

MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Ratos Wistar machos (idade de 2 a 3 meses – peso 250 a 300 g) foram usados. Os animais são criados em gaiolas plásticas, 4-5 por caixa, em ciclos de 12h de luz / escuro (luzes se ligam às 7:00), numa temperatura constante de 24 ± 1 °C e água e comida *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as recomendações da Sociedade Brasileira de Neurociências (SBNeC), Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e a Organização Internacional de Pesquisa do Cérebro (IBRO), sendo previamente aprovada pelo Comitê de Ética em Revisão de Pesquisa da nossa instituição, UFRGS. Isso significa que estão de acordo com o Guia de Saúde para Cuidado e Uso de Animais de Laboratório do Instituto Nacional dos Estados Unidos (publicação nº 85-23, revisado em 1985), a Diretriz do Conselho da Comunidade Européia de 24 de novembro de 1986 (86/609/EEC), e a Lei Brasileira (Lei nº6.638/1979). Todo esforço para minimizar o número de animais e o seu sofrimento foi empregado.

4.2 CIRURGIA

Todos os animais foram anestesiados por uma mistura de cetamina (anestésico geral “Dopalen”, obtido da Agribands) e xilazina (sedativo/miorelaxante/analgésico “Anasedan”, obtido da Agribands) (intraperitoneal, 75 e 19 mg/Kg, respectivamente) e bilateramente implantados com cânulas guia de aço inoxidável de calibre 27 por cirurgia estereotáxica (David Kopf, 1404) dirigido em AP -4,2mm (do Bregma), LL \pm 3,0 mm, DV 1,5 mm, ficando 1 mm acima da área CA1 do hipocampo dorsal (ajustado de Paxinos e Watson, 1998). Um parafuso de aço inoxidável pequeno será implantado acima do osso occipital para ancorar o acrílico dental usado para fixar as cânulas. Após a cirurgia, os animais são mantidos aquecidos por 2 horas por uma lâmpada vermelha de 40W acima de uma gaiola para prevenir hipotermia causada pela administração de anestésicos. Após a recuperação da cirurgia (1 semana), os animais são submetidos aos procedimentos experimentais.

4.3 APARATO COMPORTAMENTAL E PROCEDIMENTOS

Ratos foram treinados na Esquiva Inibitória de Descida da Plataforma (EI) de tentativa única (*one-trial*). Esta tarefa será realizada em uma caixa automaticamente operada e iluminada, na qual o extremo esquerdo da grade (42,0 x 25,0 cm de grade de barras de aço inoxidável com 0,1 cm de calibre e paralelamente arranjados com espaçamento de 1,0 cm) foi coberto com uma plataforma coberta de Formica com 7,0 cm de largura e 5,0 de altura (Figura 6).

Procedimento comportamental utilizado com o inibidor de síntese protéica (DRB):

Habituação: um dia antes do procedimento de treinamento, todos os animais são colocados na plataforma para explorar livremente todo o aparato de EI durante 180 segundos (nosso teto). Considerando que a contribuição primária do hipocampo seja armazenar uma

representação conjunta do contexto (Biedenkapp *et al.*, 2004), usamos este procedimento como um paradigma adaptado do efeito de facilitação por pré-exposição ao contexto (EFPC), inicialmente descrito em um estudo de Fanselow (1990), em que colocando ratos em um contexto e dando-lhes imediatamente um choque não produziu quase nenhum medo àquele contexto; se o rato, todavia, é pré-exposto alguns minutos antes àquele contexto no dia anterior, ele demonstra medo significativo (Fanselow, 1990; Rudy *et al.*, 2005). Para sobrepor o problema de aprendizado causado pela rápida exposição ao contexto da EI, nós adaptamos o EFPC para a EI expondo os ratos um dia anterior da sessão de treino durante 3 minutos, o que causou melhora no aprendizado em comparação com grupos não habituados (dados não mostrados).

Sessão de Treinamento: os animais serão colocados gentilmente na plataforma e a sua latência para descê-la, colocando as quatro patas na grade, será medida. Na sessão de treino, imediatamente após a descida, os animais receberão um choque de 0,8 mA durante 3,0 segundos.

Sessão de Reativação: fizemos quatro diferentes protocolos de reativação (para cada sessão será usado um grupo diferente de ratos de modo que cada rato passará somente por um tipo de sessão de reativação) que serão realizadas um dia após a sessão de treinamento para explorar a natureza da desestabilização da memória na EI. Na primeira sessão, os animais serão colocados novamente na plataforma e, após descê-la, levarão um choque de 0,4 mA por 3,0 segundos (Sessão de Reativação Contexto-Choque Figura 4, Item (a)). Na segunda sessão, os animais serão colocados em contato direto com a grade metálica e receberão um choque de lembrança de 0,4 mA por 3,0 segundos (Sessão de Reativação Somente Choque, Figura 4, Item (b)). Na terceira sessão, tentaremos reativar a memória colocando os animais na plataforma até que desçam dela, sem aplicar-lhes choque (Sessão de Reativação Somente Contexto, Figura 4, Item (c)). Para explorar além, um grupo controle de animais não sofrerá nenhum tipo de

reativação (Sem Reativação, Figura 4, Item (d)). Todos os animais que atingirem o tempo de 3 minutos sem descer da plataforma serão eliminados do experimento, pois não poderemos dar-lhes o choque,

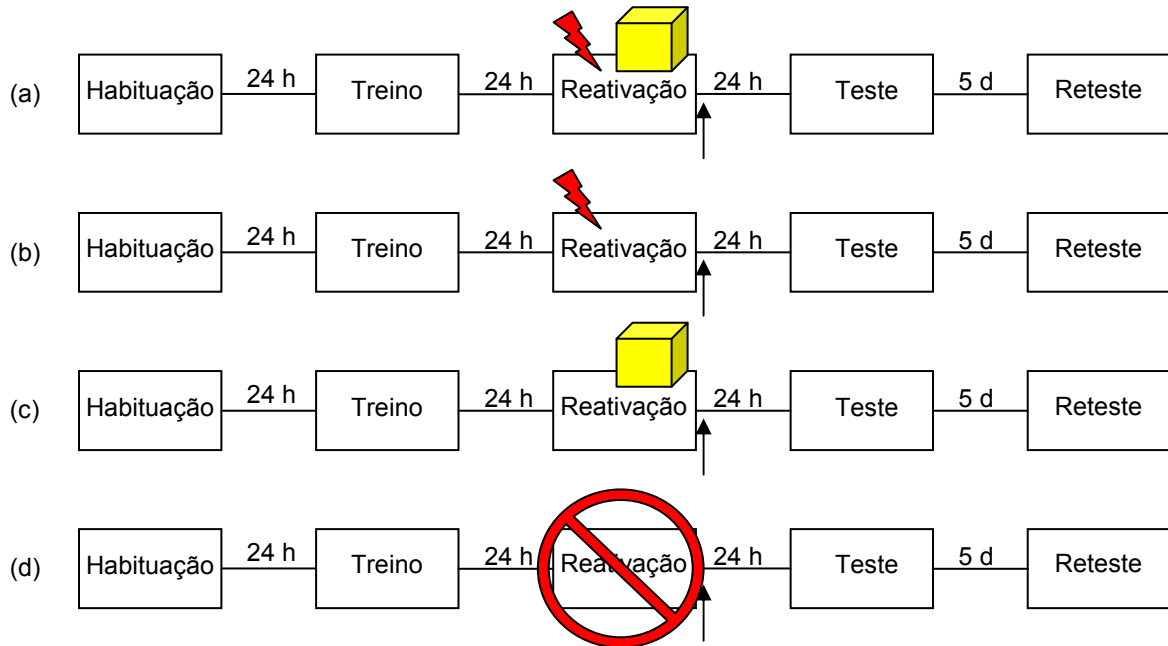


Figura 4. Esquema do protocolo experimental utilizado na infusão do DRB (*seta*) pós-reativação.

Raio: choque 0,4 mA por 3 segundos. *Caixa*: contexto da caixa de esquiwa inibitória.

Sessão de Teste e Reteste: na sessão de teste nenhum choque é dado e um tempo de 3 minutos é definido como o teto para a descida da plataforma. A latência de teste menos a do treino é usada como uma medida de retenção, como descrito em outra publicação (Bernabeu *et al.*, 1997). Se algum efeito for detectado, os animais serão retestados de modo idêntico 5 dias depois, de modo a verificar recuperação espontânea.

Procedimento comportamental utilizado com Propranolol e Midazolam:

O protocolo experimental utilizado neste estudo é idêntico ao utilizado no estudo com

infusão de DRB nas sessões de habituação, treino e reteste. Para a reativação, todavia, uma vez validado o modelo com DRB, apenas a sessão de reativação Contexto-Choque (Figura 4, item (a)), foi usada. Propranolol foi injetado intraperitonealmente em diferentes tempos após a sessão de reativação (Figura 5, itens (a-e)), produzindo uma *curva tempo-resposta*. Já o midazolam foi injetado intraperitonealmente apenas imediatamente após a sessão de reativação (Figura 5, item (a)).

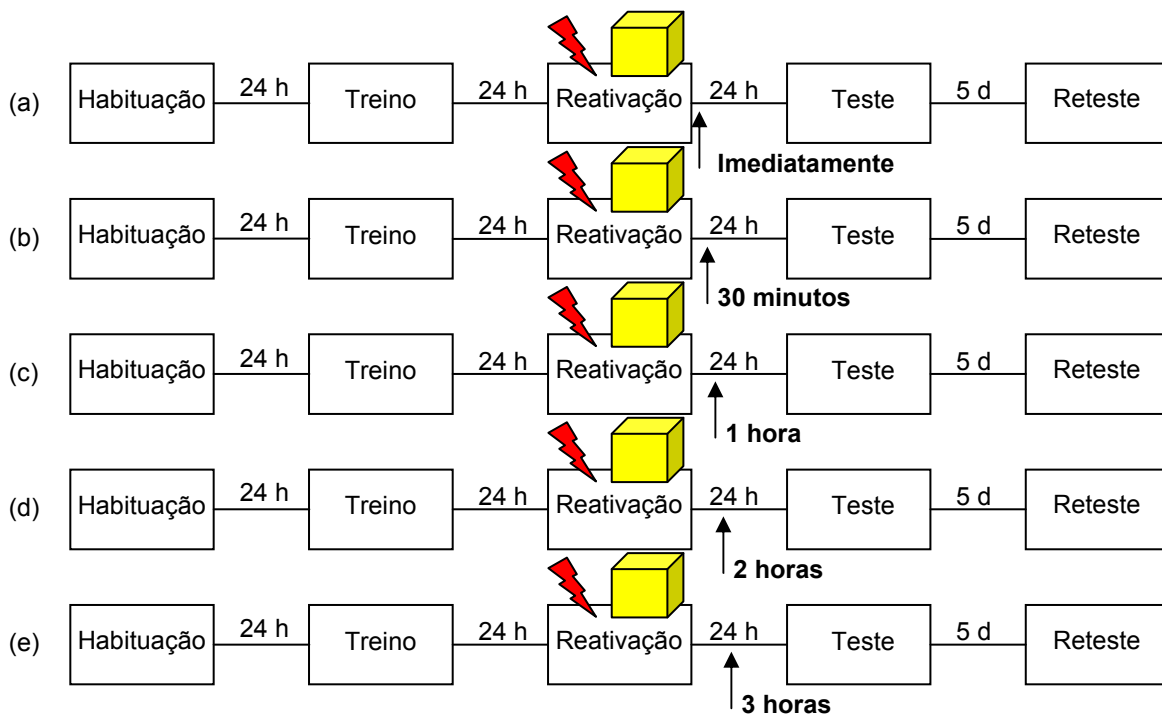


Figura 5. Esquema do protocolo experimental utilizado na injeção de propranolol em diferentes tempos após a sessão de reativação e midazolam (neste caso, idêntico ao primeiro protocolo usado para o propranolol). Setas: injeção de propranolol (e midazolam, no experimento imediatamente pós-reativação). *Raio*: choque 0,4 mA por 3 segundos. *Caixa*: contexto da caixa de esquiwa inibitória.

4.4 DROGAS

No momento da infusão pós-treino ou pós-reativação, cânulas de calibre 30 serão posicionadas na cânula-guia; o topo da cânula de infusão protraí 1,0 mm além da cânula-guia e, portanto, é posicionada na camada celular da área CA1 do hipocampo dorsal. Por ela, um volume de 0,5 µl será administrado numa taxa de 20 µl/h por uma bomba de infusão Hamilton. Através desta bomba os animais serão infundidos com, 6-dicloro-1-b-d-ribofuranosilbenzimidazole (DRB), um inibidor de síntese protéica (Calbiochem, 10 ng por lado/hemiestrutura) cuja dose foi previamente demonstrada ser capaz de bloquear consolidação e reconsolidação de memória (Igaz *et al.*, 2002; de Oliveira Álvares *et al.*, 2008). Por estudos *in vitro*, o consenso é que DRB age inibindo a hiperfosforilação da Polimerase II CTD, a qual é crucial para que a Pol II avance até o complexo de alongação, ativamente engajado na síntese de ARN. Tal mecanismo é capaz de causar terminação prematura da transcrição geral (Clement, 2000).

Propranolol, um antagonista beta-adrenérgico, obtido da Pharmashop (Porto Alegre, RS) foi preparado em salina isotônica estéril (SAL)(0,9 % w/v) na concentração de 10 mg/ml e será injetado intraperitonealmente num volume de 1 ml/kg. O propranolol tem um metabolismo de primeira passagem rápido (Robinson & Franklin, 2007) e sua meia-vida é de menos de 1,5 h no rato, ou seja, está completamente ausente no teste realizado 24 horas após a injeção (Kim *et al.*, 2001).

Também foi usado Midazolam, um benzodiazepínico de curta ação que atua modulando positivamente o receptor GABA A (Bustos *et al.*, 2009). A droga será diluída em salina isotônica estéril (SAL) (0,9% w/v) a uma concentração de 1 mg/ml e administrado intraperitonealmente

numa dose de 1 mg/kg.

4.5 HISTOLOGIA

Todos os animais implantado com cânulas-guia serão decapitados e imediatamente corados com 0,5 µl de Azul de Metileno 2% em salina (infundido através das mesmas cânulas), fixados em Formol 10% e cortados por vibrátomo para visualizar microscopicamente a extensão da área atingida pelo topo da cânula de infusão por onde as drogas foram administradas no hipocampo do rato (Figura 7).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados referentes às latências da esQUIVA inibitória necessitam passar por um teste de “normalidade” (teste de Kolmogorov-Smirnov com correção de Lilliefors). Constatando a existência de dados não-paramétricos, as diferenças entre os grupos serão avaliadas pelo teste ANOVA Kruskal-Wallis com teste “post hoc” de Dunn. A comparação entre treino e teste dentro de um mesmo grupo será feita com o teste Wilcoxon, caso sejam 2 grupos, ou teste não-paramétrico de Friedman com *post hoc* de Dunn, para $k > 2$ grupos. Definido *a priori*, um $P < 0,05$ será considerado como sendo significativo.



Figura 6. Vista geral do aparelho de Esquiva Inibitória de descida da plataforma.

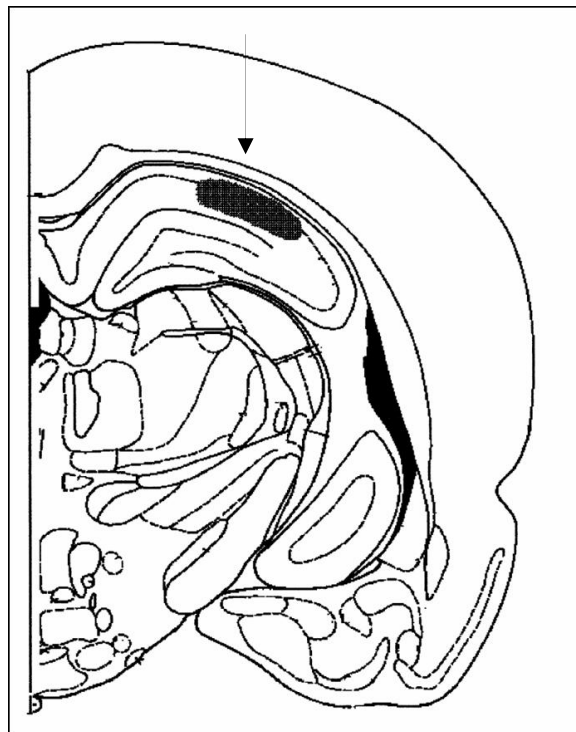


Figura 7 – Posição da marca do corante injetado. Retirado de Paxinos & Watson (1997)

RESULTADOS

A estatística usada em todos os testes é do tipo não-paramétrica, pois os dados não se distribuem normalmente. Em todos os gráficos o eixo *y* representa a latência de descida da plataforma, isto é, o tempo que os animais permanecem em cima da plataforma; o eixo *x*, por sua vez, são os grupos. Os dados são representados com a mediana e os intervalos interquartis (explicando o fato das barras serem normalmente assimétricas).

Constatando a existência de dados não-paramétricos, as diferenças entre os grupos serão avaliadas pelo teste ANOVA Kruskal-Wallis com teste *post hoc* de Dunn, para $k > 2$ grupos, ou teste de Mann-Whitney, caso $k = 2$ grupos. A comparação entre treino e teste dentro de um mesmo grupo será feita com o teste Wilcoxon, caso sejam 2 grupos, ou teste não-paramétrico de Friedman com *post hoc* de Dunn, para $k > 2$ grupos. Definido *a priori*, um $P < 0,05$ será considerado como sendo significativo.

As Figuras 8, 9, 10 e 11 apresentam os resultados obtidos com infusão de DRB imediatamente após a reativação usando protocolos de reativação distintos.

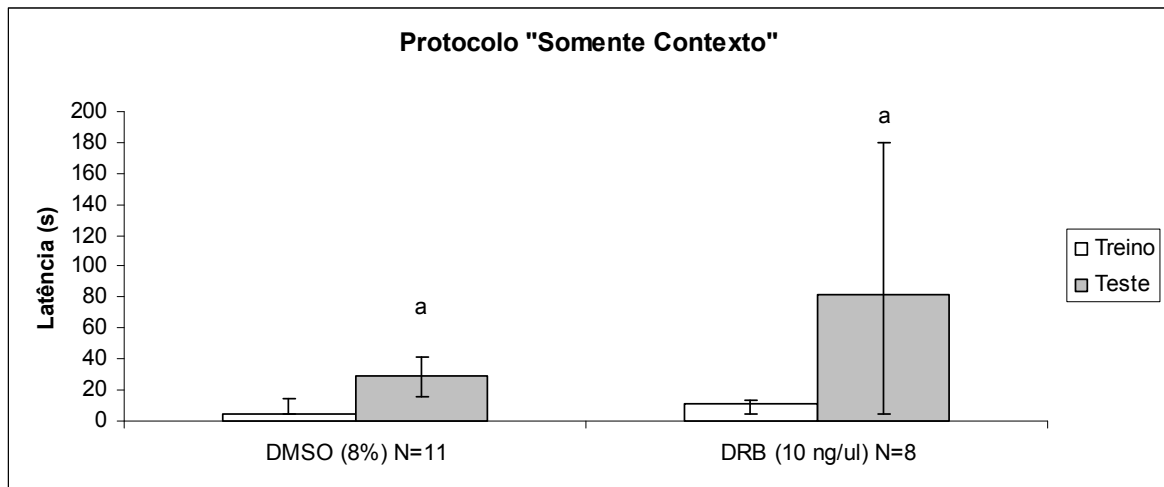


Figura 8. Infusão de DRB pós-reativação Somente Contexto. (a) Diferença significativa entre as sessões de treino e teste ($P < 0,05$; Teste de Wilcoxon).

Na Figura 8 houve diferença significativa entre o treino e teste dos grupos controle e droga ($P < 0,05$; Teste de Wilcoxon). Não houve diferença significativa entre as sessões de teste entre os grupos ($P > 0,05$; Teste de Mann-Whitney).

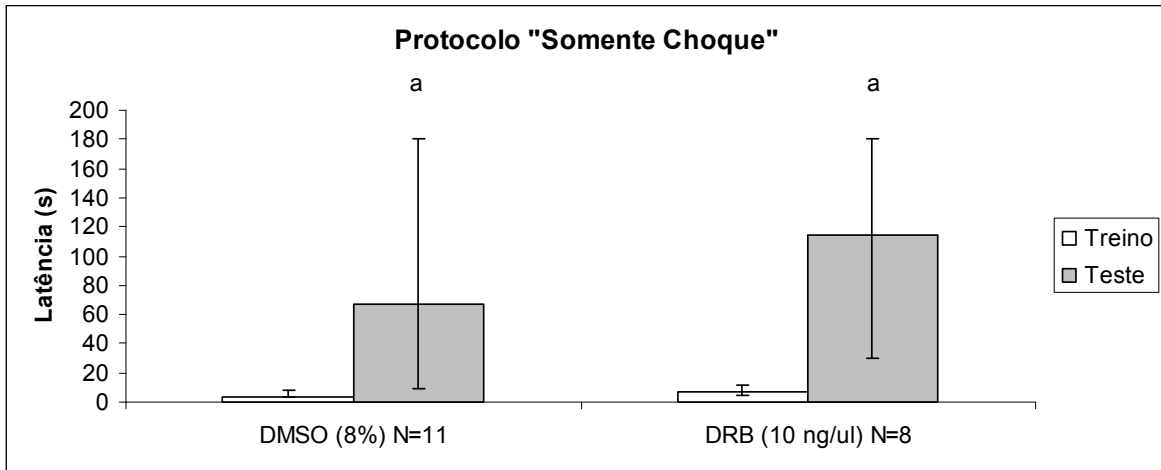


Figura 9. Infusão de DRB pós-reativação Somente Choque. (a) Diferença significativa entre as sessões de treino e teste ($P < 0,05$; Teste de Wilcoxon).

Na Figura 9 houve diferença significativa entre o treino e teste dos grupos controle e droga ($P < 0,05$; Teste de Wilcoxon). Não houve diferença significativa entre as sessões de teste entre os grupos ($P > 0,05$; Teste de Mann-Whitney).

A Figura 10 apresenta os resultados obtidos com infusão de DRB imediatamente após a reativação usando o mesmo protocolo do grupo “Habitados – 0,8-0,4”.

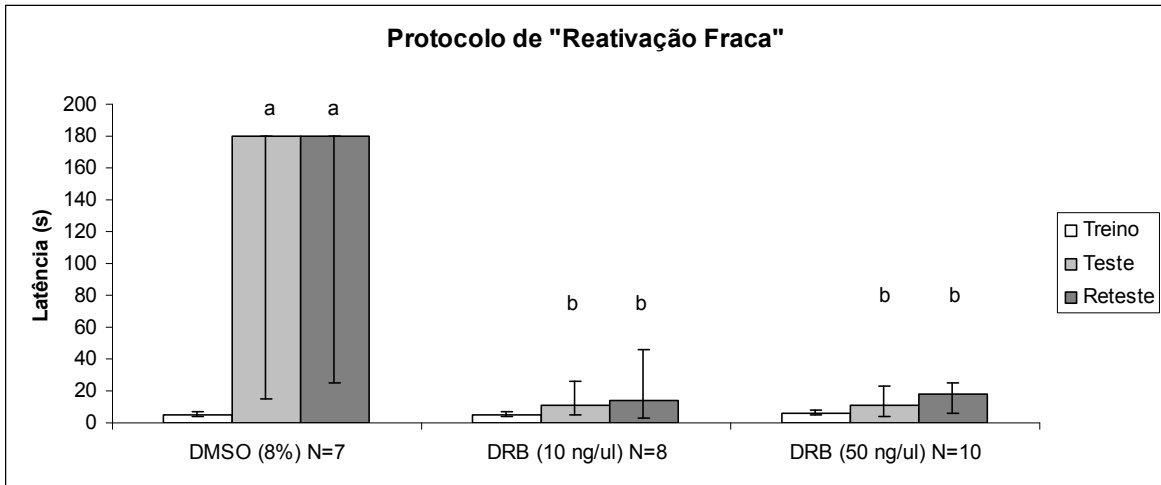


Figura 10. Infusão de DRB pós-reativação Contexto-Choque. (a) Diferença significativa entre as sessões de treino e teste ($P < 0,05$; Teste de Friedmann com *post hoc* de Dunn). (b) Diferença significativa entre as sessões de teste e reteste entre grupos ($P < 0,05$; Teste de Kruskal-Wallis com *post hoc* de Dunn).

Houve diferença significativa entre o treino, teste e reteste dos animais do grupo controle ($P < 0,05$; Teste de Friedmann com *post hoc* de Dunn), mas não dos grupos droga ($P > 0,05$; Teste de Friedmann com *post hoc* de Dunn). (b) diferença significativa entre as sessões de teste e reteste ($P < 0,05$; Teste de Kruskal-Wallis com *post hoc* de Dunn).

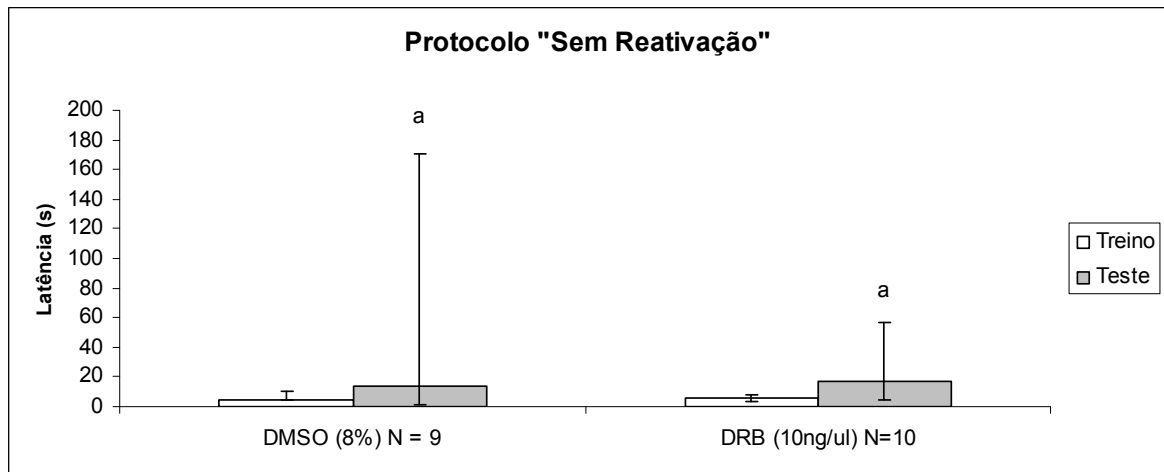


Figura 11. Infusão de DRB na ausência de reativação. (a) Diferença significativa entre as sessões de treino e teste ($P < 0,05$; Teste de Wilcoxon).

Na Figura 11 houve diferença significativa entre o treino e teste dos grupos controle e droga ($P < 0,05$; Teste de Wilcoxon). Não houve diferença significativa entre as sessões de teste entre os grupos ($P > 0,05$; Teste de Mann-Whitney).

As Figuras 12, 13, 14, 15 e 16 apresentam os resultados obtidos com a injeção de propranolol pós-reativação durante diferentes tempos, respectivamente: imediatamente, 30 minutos, 1 hora, 2 horas e 3 horas.

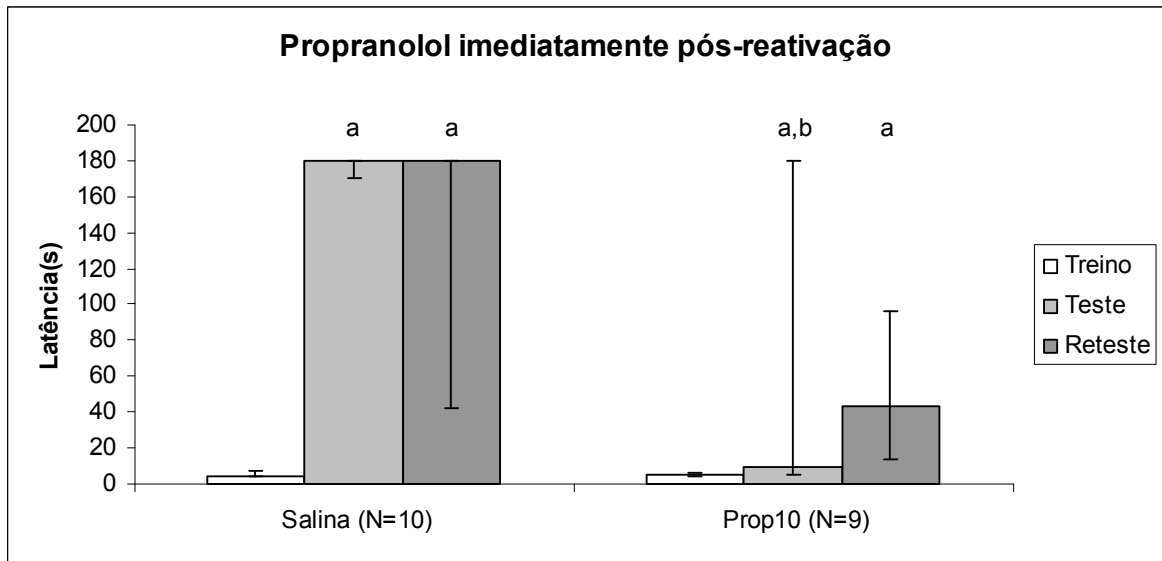


Figura 12. Injeção de propranolol imediatamente pós-reativação. (a) Diferença significativa entre as sessões de treino e teste ($P < 0,05$; teste de Friedman com *post hoc* de Dunn). (b) Diferença significativa entre as sessões de teste e reteste entre grupos ($P < 0,05$; Teste de Kruskal-Wallis com *post hoc* de Dunn).

Na Figura 12 houve diferença significativa entre o treino e teste ou reteste dos grupos controle e droga ($P < 0,05$; teste de Friedman com *post hoc* de Dunn). Houve diferença significativa entre as sessões de teste entre os grupos, mas não entre as sessões de reteste ($P < 0,05$; Teste de Kruskal-Wallis com *post hoc* de Dunn).

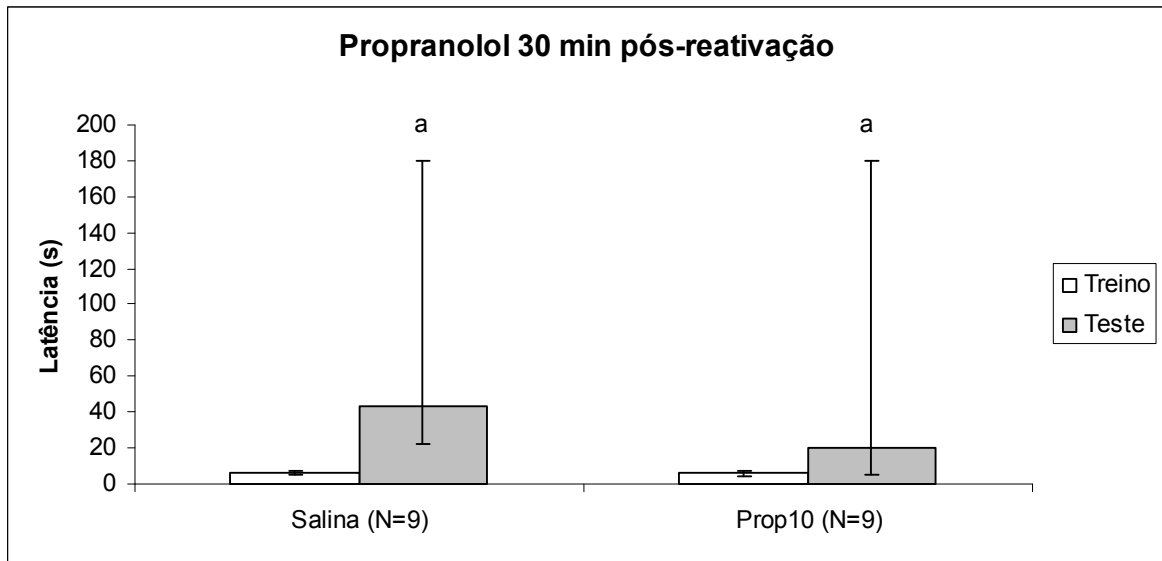


Figura 13. Injeção de propranolol 30 minutos pós-reativação. (a) Diferença significativa entre as sessões de treino e teste ($P < 0,05$; Teste de Wilcoxon).

Na Figura 13 houve diferença significativa entre o treino e teste dos grupos controle e droga ($P < 0,05$; Teste de Wilcoxon). Não houve diferença significativa entre as sessões de teste entre os grupos ($P > 0,05$; Teste de Mann-Whitney).

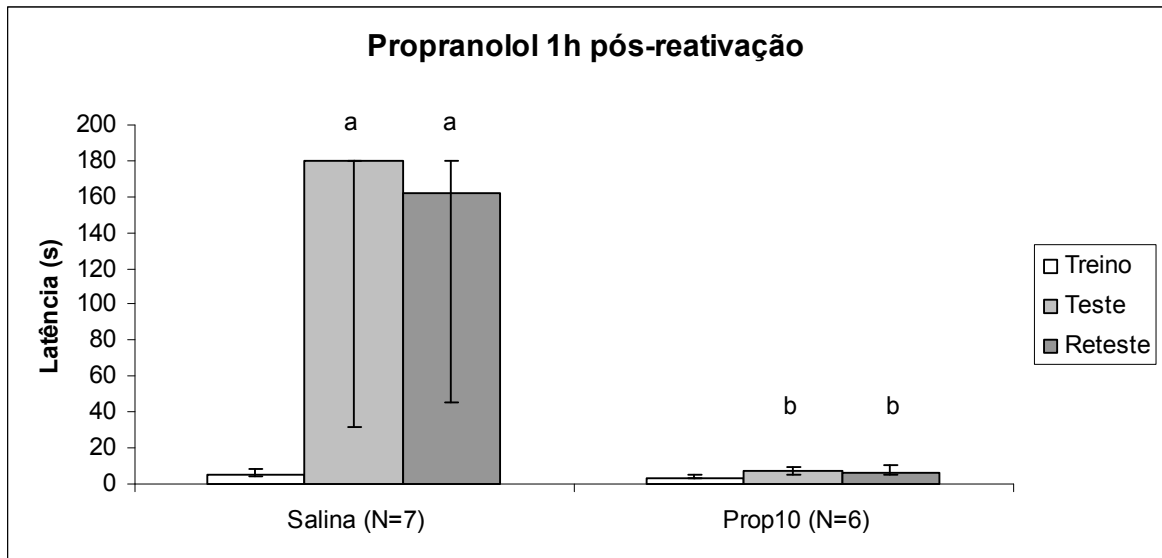


Figura 14. Injeção de propranolol 1 hora pós-reativação. (a) Diferença significativa entre as sessões de treino e teste ($P < 0,05$; teste de Friedman com *post hoc* de Dunn). (b) Diferença significativa entre as sessões de teste e reteste entre grupos ($P < 0,05$; Teste de Kruskal-Wallis com *post hoc* de Dunn).

Na Figura 14 houve diferença significativa entre o treino e teste ou reteste dos grupos controle ($P < 0,05$; teste de Friedman com *post hoc* de Dunn). Houve diferença significativa entre as sessões de teste e reteste entre os grupos ($P < 0,05$; Teste de Kruskal-Wallis com *post hoc* de Dunn).

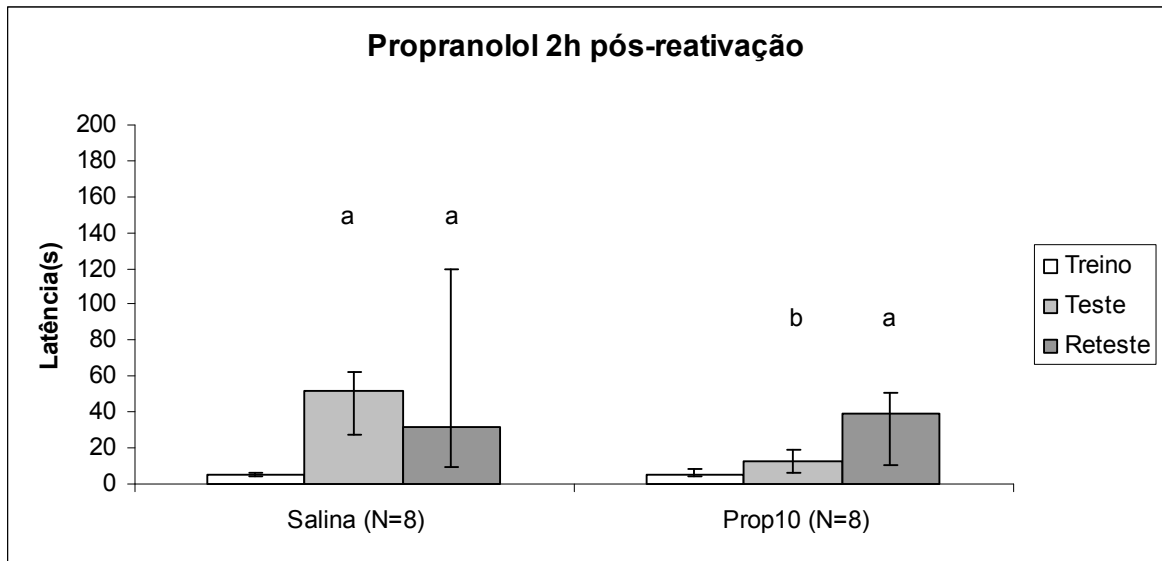


Figura 15. Injeção de propranolol 2 horas pós-reativação. (a) Diferença significativa entre as sessões de treino e teste ($P < 0,05$; teste de Friedman com *post hoc* de Dunn). (b) Diferença significativa entre as sessões de teste e reteste entre grupos ($P < 0,05$; Teste de Kruskal-Wallis com *post hoc* de Dunn).

Na Figura 15 houve diferença significativa entre o treino e teste ou reteste dos grupos controle e droga ($P < 0,05$; teste de Friedman com *post hoc* de Dunn). Houve diferença significativa entre as sessões de teste entre os grupos, mas não entre as sessões de reteste ($P < 0,05$; Teste de Kruskal-Wallis com *post hoc* de Dunn).

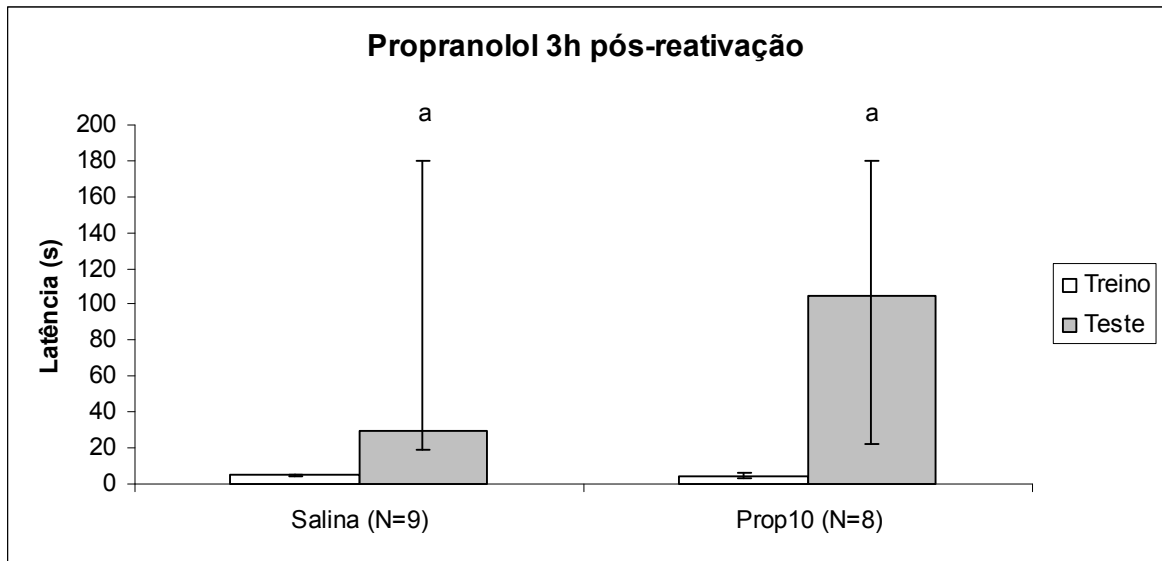


Figura 16. Injeção de propranolol 3 horas pós-reativação. (a) Diferença significativa entre as sessões de treino e teste ($P < 0,05$; Teste de Wilcoxon).

Na Figura 16 houve diferença significativa entre o treino e teste dos grupos controle e droga ($P < 0,05$; Teste de Wilcoxon). Não houve diferença significativa entre as sessões de teste entre os grupos ($P > 0,05$; Teste de Mann-Whitney).

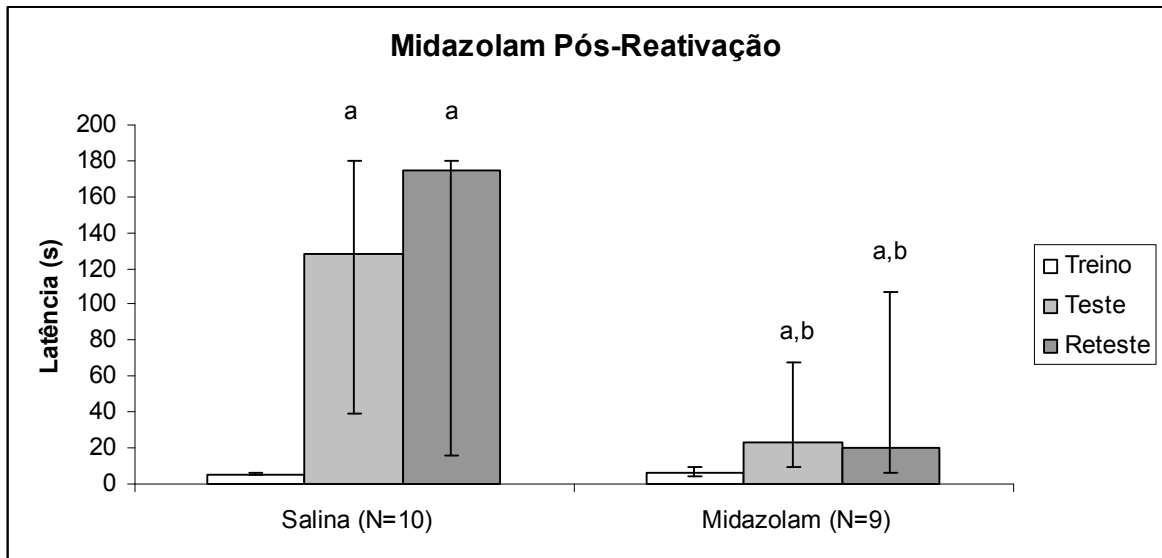


Figura 17. Injeção de midazolam imediatamente pós-reativação. (a) Diferença significativa entre as sessões de treino e teste ($P < 0,05$; Teste de Friedman com *post hoc* de Dunn). (b) Diferença significativa entre as sessões de teste e reteste entre grupos ($P < 0,05$; Teste de Kruskal-Wallis com *post hoc* de Dunn).

Na Figura 17 houve diferença significativa entre o treino e teste dos grupos controle e droga ($P < 0,05$; Teste de Friedman com *post hoc* de Dunn). Houve diferença significativa entre as sessões de teste e reteste entre os grupos ($P < 0,05$; Teste de Kruskal-Wallis com *post hoc* de Dunn).

DISCUSSÃO

Os experimentos do presente projeto foram divididos em 3 grupos.

- 1) *Experimentos de validação*: Os resultados demonstram que a inibição de síntese protéica pela infusão de DRB realizada no período pós-reativação foi capaz de inibir a reconsolidação de uma memória aversiva na área CA1 do hipocampo dorsal somente em uma das condições experimentais. O primeiro experimento desse grupo objetivou inibir a reconsolidação da memória apresentando somente o contexto na sessão de reativação (Figura 8). O segundo experimento desse grupo objetivou inibir a reconsolidação da memória apresentando somente o choque na sessão de reativação (Figura 9). Ambos os experimentos, todavia, não foram capazes de relabilizar a memória, uma vez que o DRB não teve efeito em ambos os protocolos. O terceiro experimento deste grupo objetivou inibir a reconsolidação da memória apresentando-se simultaneamente o contexto e o choque (uma sessão de retreino, mas com choque fraco, de 0,4 mA, Figura 10). Somente neste protocolo o DRB foi capaz de inibir a reconsolidação da memória. Ademais, realizou-se um experimento-controle infundindo-se DRB na ausência de qualquer sessão de reativação (Figura 11). Este experimento em conjunto com os demais demonstra que a relabilização da memória só

foi possível quando a memória foi reativada na presença simultânea do estímulo condicionado (contexto) e do estímulo incondicionado (choque), porém este em menor intensidade;

- 2) *Experimentos de dinâmica temporal*: Partindo do princípio de que somente haja reativação da memória (e ulterior reconsolidação) quando a sessão de reativação contenha ambos componentes, condicionado e incondicionado, a série de experimentos seguintes foi realizada somente para este protocolo de reconsolidação (Figura 4, item (a)). Os experimentos com propranolol visaram determinar a janela temporal em que a neurotransmissão β -noradrenérgica é capaz de afetar a reconsolidação de maneira duradoura. Assim, quando injetado intraperitonealmente 1 hora após a reativação, produziu um efeito amnésico duradouro, ao passo que em períodos anteriores – imediatamente e 30 minutos – ou posteriores – 2 e 3 horas – não houve qualquer efeito (Figuras 12 e 15) ou o efeito amnésico apresentava recuperação espontânea (Figuras 13 e 16);

- 3) *Experimento de confirmação*: Por fim, realizou-se um experimento com a modulação benzodiazepinérgica do sistema GABAérgico a fim de confirmar os achados com o DRB e propranolol. O midazolam apresentou um efeito amnésico quando injetado imediatamente após a reativação (Figura 17) usando-se o mesmo protocolo do primeiro experimento do propranolol (Figura 5, item (a)). Deste modo, o midazolam foi capaz de bloquear a reconsolidação favorecendo a ativação do receptor GABA A.

A aquisição e manutenção de informações sensoriais novas obtidas através da experiência para seu uso posterior requerem um processo dependente de tempo e, fundamentalmente, de síntese protéica em estruturas encefálicas relacionadas, como hipocampo e/ou amígdala. Esse processo de estabilização pós-aquisitiva de memórias é chamado de consolidação e as teorias clássicas de consolidação propõem que, uma vez armazenadas, as memórias permanecem estáveis. Estudos paralelos, todavia, indicam que, dependendo do tipo de memória e da sessão de evocação, esta pode constituir-se numa reativação do traço de memória capaz de desestabilizá-la¹ e disparar um novo processo de estabilização desta nova fase lábil. A esse processo ativo de reestabilização do traço mnemônico, também fundamentalmente dependente de síntese protéica, se denominou de reconsolidação, hipotetiza-se ser um componente importante no processamento de memórias de longa duração e está amplamente distribuído entre os animais, como o gastrópoda *Lymnaea stagnalis* (Kemenes *et al.*, 2006), o crustáceo *Chasmagnathus granulata* (Pedreira *et al.*, 2002; Tano *et al.*, 2009) em roedores (Debiec *et al.*, 2002; Nader *et al.*, 2000; Nader & Hardt, 2009; Suzuki *et al.*, 2004; Tronson & Taylor, 2007) e em seres humanos (Forcato *et al.*, 2007).

Utilizando o mesmo protocolo, trabalhos anteriores não foram capazes de relabilizar a memória da tarefa de esQUIVA inibitória de descida da plataforma (Cammara *et al.*, 2004; Vianna *et al.*, 2001); utilizando a esQUIVA inibitória passiva (*step-through*), todavia, a

¹ Antes de passar por um processo de reconsolidação, a reativação deve ser capaz de disparar rapidamente processos de desestabilização da memória. Além da necessidade da atividade normal do receptor NMDA (Mamou *et al.*, 2006), Lee *et al.* (2008) demonstrou que a desestabilização de memórias inativas também envolve a degradação protéica sináptica. A reativação da memória de medo condicionado ao contexto na área CA1 do hipocampo de ratos dispara a marcação de proteínas por poliubiquitinação. Essas proteínas tornam-se alvo para entrar na via da ubiquitina-proteassoma, resultando na proteólise pelo complexo do proteassoma 26S. Caso este complexo de degradação seja inibido, o efeito amnésico resultante de anisomicina é revertido, demonstrando que a remoção de proteínas pré-existentes para a fabricação de proteínas novas é um pré-requisito para a remodelagem sináptica que codificará a memória atualizada (ou modificada), estabilizando-a pelo processo de reconsolidação.

manipulação colinérgica foi capaz de inibir a reconsolidação (Boccia *et al.*, 2004), embora não foi possível com inibição de síntese protéica ou de C/EBP β (Taubenfeld *et al.*, 2001). As linhas de evidência sugerem que os trabalhos que tentaram relabilizar a memória em esQUIVA inibitória não foram bem sucedidos pelos seguintes motivos: (a) a natureza da sessão de reativação, (b) a dose de anisomicina usada e (c) o momento da infusão de anisomicina.

A primeira linha de contra-argumentação (a) refere-se à diferença entre as sessões de reativação empregadas. Os estudos de reconsolidação normalmente abordam a questão de como reestabilizar uma memória que se torna lábil após a sua reativação, cuja sessão envolve somente a apresentação do estímulo condicionado; um passo anterior e importante, todavia, normalmente é esquecido: a desestabilização. O processo de desestabilização de memórias previamente consolidadas é um passo limitante nos estudos de reconsolidação. Trabalhos realizados que não reportaram nenhum efeito sobre a reconsolidação podem, alternativamente, estar baseados em falso-negativos, simplesmente porque a sessão de reativação daquela memória não foi qualitativamente adequada (como, por exemplo, a apresentação do estímulo incondicionado) ou quantitativamente suficiente (tempo maior ou menor de exposição ao estímulo condicionado). Trabalhos com *condicionamento de preferência de lugar* com cocaína demonstram que a apresentação do contexto na sessão de reativação, desde que este retenha propriedades afetivas ou motivacionais, é suficiente para relabilizar a memória da procura pela droga e, com um tratamento amnésico (nos trabalhos citados foi usado propranolol, antagonista β -noradrenérgico), a memória do local de administração da droga era apagada ou enfraquecida (Milton *et al.*, 2008). Fricks-Gleason & Marshall (2008), utilizando procedimentos similares, demonstraram ainda que a atuação do antagonismo em receptores β -noradrenérgicos se deu inibindo o processo de

reconsolidação, e não uma possível aceleração do processo de extinção. A relabilização da memória contextual associada à cocaína também foi possível somente com a apresentação do contexto nos trabalhos de Lee *et al.* (2005), inibindo Zif268 na amígdala, e Miller & Marshall (2005), inibindo a via da MEK no núcleo *accumbens*. Milekic *et al.* (2006) e Robinson & Franklin (2007) encontraram resultados consistentes com os nossos: utilizando *condicionamento de preferência de lugar* por morfina não foram capazes de reativar a memória (reativação definida como a relabilização da memória, e não sua simples evocação) usando somente o contexto de aprendizado (estímulo condicionado) ou uma dose de morfina (estímulo incondicionado), mas sim foi necessária a presença dos dois componentes numa só sessão de recondicionamento (o aprendizado envolve 4 dias de sessões de condicionamento).

A contribuição primária do hipocampo é armazenar uma representação conjunta do contexto (Biedenkapp & Rudy, 2004) e ser capaz de associar eventos a ele, sugerida pela anatomia hipocampal. Neste mesmo estudo, Biedenkapp & Rudy (2004) não encontraram evidências de que a reativação de uma memória puramente contextual requer uma nova onda de síntese protéica para a reestabilização. Uma diferença entre este tipo de memória e as associações clássicas da literatura dão margem a uma interpretação nova: a hipótese de evento significativo. Se considerarmos que eventos biologicamente importantes (ao menos em laboratório), como choques, venenos, recompensas (comida, água, drogas) ou sabores amargos, são sempre codificados em um contexto experimental e que o hipocampo atua como um coadjuvante essencial, ancorando os eventos tanto num contexto espacial como temporal (Gilbert *et al.*, 2001; Manns & Eichenbaum, 2006), uma possibilidade é que somente memórias que contenham esses elementos tornam-se lábeis quando são reativadas. Isto sugere que uma memória puramente

contextual possui um padrão de efeitos moleculares diferentes do que memórias associativas com eventos significativos presentes. Além disso, nosso trabalho mostrou que, da mesma forma que o tempo de reexposição ao contexto é uma variável importante para disparar o processo de reconsolidação (Suzuki *et al.*, 2004), a presença em menor escala desse evento significativo (choque) no momento da reativação também é necessária para que o hipocampo desestabilize-a, necessitando de um processo subsequente de reconsolidação.

Essa sessão de reativação fraca nos dá o benefício de descartar a ocorrência de dois problemas comuns durante protocolos de reativação: (a.1) novo aprendizado, como pode ocorrer durante o retreino (experimento também realizado por Cammarota *et al.*(2004), mas também sem qualquer efeito), e (a.2) extinção, quando há a ausência do estímulo incondicionado. Nossos resultados demonstram, todavia, que da mesma forma que um choque fraco não foi capaz de disparar um processo de aprendizado (dados não mostrados), também consegue prevenir o efeito amnésico *aparente* (a nova associação “contexto - sem choque”) que ocorre durante extinção.

A segunda linha de contra-argumentação (b) refere-se à dose de anisomicina utilizada pelos estudos. Os estudos de Vianna *et al.* (2001) utilizaram doses de 80µg, 0,5 µl/lado; Taubenfeld *et al.*, (2001) usaram doses de 125 µg, 1µl/lado; e Cammarota *et al.* (2004) usaram 80µg, 0,8 µl/lado. Em todos os casos, a reconsolidação não foi bloqueada. Debiec *et al.* (2002), todavia, somente obteve sucesso em bloqueá-la ao usar mais que o dobro da dose destes estudos, 250 µg, 2µl/lado. O mesmo estudo argumenta que uma dose maior de anisomicina é necessária para afetar a reconsolidação por 3 motivos: (b.1) com o tempo, a memória contextual pode tornar-se mais dispersa, necessitando de uma dose maior para afetar toda a região; (b.2) a

anisomicina pode agir no núcleo celular para bloquear a tradução de proteínas envolvidas na consolidação e nos dendritos, para bloquear a tradução de proteínas envolvidas na reconsolidação; doses maiores, portanto, podem ser necessárias para bloquear ambos os compartimentos; (b.3) durante a consolidação, há a necessidade da ativação de uma vasta maquinaria de síntese protéica que levará ao crescimento e modificação de especializações sinápticas; após a reativação de uma memória, essas sinapses precisarão de novas proteínas para a reestabilização, só que em número menor. Deste modo, para que a anisomicina bloqueie a reconsolidação, uma dose maior é necessária para desligar toda a maquinaria de síntese protéica, impossibilitando-a de produzir mesmo uma pequena quantidade de proteínas que seriam suficientes para a reconsolidação.

Já a terceira linha de contra-argumentação (c) diz respeito à dinâmica temporal da reconsolidação. A infusão de anisomicina seguiu dois padrões básicos estudados na consolidação, a saber, infusão pré-treino e 3 horas pós-treino; na reativação há processos semelhantes, mas distintos: da mesma forma que a infusão pré-reativação pode ter um efeito poluído (Alberini, 2008; Rudy *et al.*, 2006) e estar inibindo a relabilização da memória, como ocorre com o bloqueio do receptor NMDA (Mamou *et al.*, 2006) ou a degradação protéica (Lee *et al.*, 2008), a sua infusão 3 horas após a reativação pode ter deixado escapar uma janela temporal de efeito da anisomicina sobre a reconsolidação, já que tratamentos amnésicos bem sucedidos com anisomicina são realizados imediatamente pós-reativação (Mamou *et al.*, 2006; Nader *et al.*, 2000) e a reconsolidação é completada mais rapidamente do que a consolidação, sendo suas curvas dose-resposta diferentes (Nader & Hardt, 2009).

Baseada nesta terceira linha, realizamos uma curva tempo-resposta com o propranolol, um antagonista beta-adrenérgico, na concentração de 10 mg/ml, injetado intraperitonealmente num volume de 1 ml/kg. O propranolol tem um metabolismo de primeira passagem rápido (Robinson & Franklin, 2007) e sua meia-vida é de menos de 1,5 h no rato, ou seja, está completamente ausente no teste realizado 24 horas após a injeção (Kim *et al.*, 2001). Uma dose única de 10 mg/kg foi usada por causa de experimentos anteriores que indicaram que, uma vez injetado no peritônio do rato, possui efeito amnésico na consolidação e reconsolidação (Przybylski *et al.*, 1999; Robinson & Franklin, 2007). Abrari *et al.* (2008) usou 5 mg/Kg, mas produziu um déficit modesto. A mesma dose usada no presente estudo não possui efeito na atividade locomotora espontânea ou no comportamento exploratório (Sara *et al.*, 1995) e é efetiva em bloquear aumentos na excitabilidade de neurônios hipocâmpais induzidos por transmissão noradrenérgica (Harley & Sara, 1992).

Os trabalhos de Izquierdo (2006) apresentados na Figura 1.a demonstram que, no período pós-treino, durante a consolidação, há um aumento seletivo no tempo dos níveis de PKA e cAMP cerca de 30 minutos e 3 horas após. Motivado por essa resposta dinâmica ao longo do tempo e pela interação entre essa via bioquímica e a síntese de proteínas, a injeção de propranolol em diferentes tempos pós-reativação produziu um padrão comportamental similar, porém reduzido no tempo. Somente achou-se um efeito amnésico permanente quando injetado 1 hora pós-reativação. Este trabalho está de acordo com resultados da literatura mostrando um processamento β -noradrenérgico na fase tardia da reconsolidação (os trabalhos encontraram efeitos desde 5 minutos até 2 horas pós-reativação), tanto pra memórias emocionais (Przybylski *et al.* 1999) como não-emocionais/espaciais (Przybylski *et al.* 1999; Rouillet

et al., 1998; Sara *et al.*, 1999). Sugere-se que, como pode ser visto na Figura 2, o propranolol age inibindo a via β -noradrenérgico que é responsável por manter as modificações sinápticas que ocorreram logo após a reativação, disparadas pelo receptor NMDA, como uma forma de recapitulação do que ocorre no período de consolidação. O uso do propranolol abre uma nova dimensão clínica, pois a possibilidade de relabilizar uma memória após esta entrar no seu estado ativo, cria também uma nova maneira de tratamento do TEPT e de abuso de drogas: enfraquecimento de memórias patológicas, seja durante o seu reprocessamento consciente (Diergaarde *et al.*, 2006; Dudai, 2006; Milton *et al.*, 2008; Nader *et al.* 2000; Przybyslawski *et al.*, 1999; Quervain & Margraf, 2008), seja durante o sono (Stickgold, 2007).

Por último, utilizou-se o Midazolam, um modulador benzodiazepínico positivo de receptores do subtipo GABA A, na concentração de 1 mg/ml e administrado intraperitonealmente numa dose de 1 mg/kg. A dose usada induz amnésia num paradigma de esQUIVA inibitória (Amaral *et al.*, 2007; Barros *et al.*, 1998) e induz déficits na reconsolidação no paradigma de condicionamento ao medo contextual (Bustos, 2006). Amaral *et al.* (2007) realizaram uma série de experimentos semelhantes aos de Cammarota *et al.* (2004), mas enquanto que neste os animais não desciam da plataforma, naquele argumentou-se que a descida da plataforma seria uma forma de disparar um processo de reconsolidação por atualizar a memória entre o que é esperado (choque) e o que de fato ocorre (ausência de choque). A inativação do hipocampo com muscimol, um agonista GABA A, pós-reativação foi capaz de induzir uma amnésia transiente, pois houve ulterior recuperação espontânea. O presente protocolo, por outro lado, foi capaz de bloquear a reconsolidação ao injetar midazolam no período pós-reativação. O caminho traçado, portanto, indica que o processo de desestabilização e reconsolidação ocorrem quando, além do animal ser

exposto ao contexto, este precisa descer espontaneamente da plataforma e receber um choque fraco, já que o retreino também não foi capaz de relabilizar a memória (Cammarota *et al.*, 2004).

CONCLUSÕES

Gerais

7.1.1 A memória da tarefa de esquiva inibitória pode ser reativada e, posteriormente, reconsolidada;

7.1.2 A re-estabilização é dependente de síntese protéica;

7.1.3 Há o envolvimento de cascatas bioquímicas, como a via AMPc/PKA, disparadas pelo receptor β -noradrenérgico, na fase tardia da reconsolidação, semelhante ao que ocorre durante a consolidação;

7.1.4 O aumento excessivo do tônus GABAérgico é capaz de inibir a reconsolidação.

Específicas

7.2.1 A infusão intrahipocampal de DRB após uma sessão de reativação *contexto-choque*, realizada com apresentação do contexto e de um choque com metade da intensidade do treino (Figura 4, item (a)), produziu um efeito amnésico permanente na tarefa de esquiva inibitória;

7.2.2 A infusão intrahipocampal de DRB após uma sessão de reativação *somente choque*, realizada com a apresentação direta de um choque com metade da intensidade do treino, não produziu qualquer efeito na tarefa de esquiva inibitória (Figura 4, item (b));

7.2.3 A infusão intrahipocampal de DRB após uma sessão de reativação *somente contexto*, realizada com apresentação do contexto e ausência de choque, não produziu qualquer efeito na tarefa de esquiva inibitória (Figura 4, item (c));

7.2.4 A infusão intrahipocampal de DRB na ausência de uma sessão de reativação não produziu qualquer efeito na tarefa de esquiva inibitória (Figura 4, item (d));

7.2.5 A injeção intraperitoneal de propranolol imediatamente após uma sessão de reativação *contexto-choque* na tarefa de esquiva inibitória (Figura 5, item (a)) produziu um efeito amnésico no teste, mas houve recuperação espontânea no reteste;

7.2.6 A injeção intraperitoneal de propranolol 30 minutos após uma sessão de reativação *contexto-choque* não produziu qualquer efeito na tarefa de esquiva inibitória (Figura 5, item (b));

7.2.7 A injeção intraperitoneal de propranolol 1 hora após uma sessão de reativação *contexto-choque* produziu um efeito amnésico permanente na tarefa de esquiva inibitória (Figura 5, item (c)), indicando tratar-se de uma janela temporal da via da PKA;

7.2.8 A injeção intraperitoneal de propranolol 2 horas após uma sessão de reativação *contexto-choque* na tarefa de esquiva inibitória (Figura 5, item (d)) produziu um efeito amnésico no teste, mas houve recuperação espontânea no reteste;

7.2.9 A injeção intraperitoneal de propranolol 3 horas após uma sessão de reativação *contexto-choque* não produziu qualquer efeito na tarefa de esquiva inibitória (Figura 5, item (e));

7.2.10 A injeção intraperitoneal de midazolam imediatamente após uma sessão de reativação *contexto-choque* produziu um efeito amnésico permanente na tarefa de esquiva inibitória (Figura 5, item (a)).

APÊNDICE

Este apêndice faz parte de um projeto de eletrofisiologia desenvolvido no Instituto Internacional de Neurociências de Natal - Edmond & Lily Safra, sob coordenação do Prof. Dr. Sidarta Ribeiro, e posterior processamento e análise de dados com orientação do Prof. Dr. Adriano Tort.

INTRODUÇÃO

8.1 VISÃO ELETROFISIOLOGICA

Um outro universo quase que paralelo, mas intimamente ligado e a essência deste trabalho, está na eletrofisiologia das memórias. Para entender o encéfalo, tem-se que entender como bilhões de neurônios de fato codificam e transmitem informação de um modo eficiente. As oscilações encefálicas aparecem como candidatos primários para facilitar a transmissão através de filtragem de entradas, coordenação temporal dos disparos, codificação de fase de oscilações e ligação de informações para executar processos como percepção e formação de memória (para mais detalhes, ver a seção ‘Sobre a natureza dos dados coletados’ na parte de metodologia). Entretanto, é extremamente difícil demonstrar uma relação causal entre atividades oscilatórias do encéfalo e o comportamento manifestado. Isto leva a muitos acreditarem que as oscilações

registradas no encéfalo são meramente epifenômenos (Koch, 1993; Pareti & De Palma, 2004) e talvez um produto de uma condução de volume de áreas distantes (Young & Eggermont, 2009).

8.2 O ENCÉFALO COMO UM OSCILADOR

O encéfalo está perpetuamente ativo, mesmo na ausência de estímulos ambientais ou estímulos derivados do corpo. A maior parte da atividade encefálica é gerada internamente e esse padrão espontâneo é perturbado por entradas externas, causando pequenas influências no seu controle robusto. Isso significa que o encéfalo não somente processa informações externas, mas também é capaz de gerar informação. Como resultado, o mundo externo não é somente codificado por taxas de disparos neuronais, mas está embebido num contexto, sendo o *tempo* uma parte importante dele. A *representação* da realidade externa é, portanto, um ajuste contínuo desses padrões cerebrais auto-gerados e perturbados pelas entradas sensoriais.

A atividade encefálica aqui definida envolve balanços energéticos positivos e negativos, como ocorre em um oscilador: forças positivas tiram o sistema do equilíbrio e forças negativas puxam-no de volta. Os osciladores são sistemas capazes de vibrar em torno de um ponto de referência (valor médio). Caso a variação possua uma frequência característica, é chamado de oscilador harmônico; se a velocidade de oscilação não é constante dentro de um ciclo, é chamado de não-harmônico. Os osciladores não-harmônicos também são chamados de osciladores de relaxação ou pulsáteis (pois a saída é uma mudança brusca seguida de uma acumulação lenta de energia). Esta é uma boa definição para a atividade encontrada no encéfalo, caso este fosse um sistema ideal. O que ocorre normalmente é que, uma vez que o encéfalo está recheado de osciladores com forças opostas, inicia-se uma oscilação transiente com constante perda de

energia, amplitude decrescente e parada de oscilação, fenômeno que ocorre por ressonância. O único modo de corrigir é fabricar o sistema com alças de retroalimentação positiva. Os osciladores neuronais pertencem à família dos osciladores caóticos fracos (sistema sensível às condições iniciais) ou de ciclo limite. Dois osciladores bem definidos, harmônicos e de relaxação, têm vários exemplos no encéfalo: os osciladores harmônicos são bons como preditores de longo prazo, já que sua fase é constante; os de relaxação, por outro lado, podem sincronizar rápida e eficientemente. O encéfalo explora todos os tipos, combinando essas propriedades (Buzsáki, 2006).

Em termos práticos, uma oscilação neural é analisada como deflexões periódicas em torno de um valor médio (que normalizado em 0) de uma série temporal (naturalmente discreta, pois envolve uma amostragem da voltagem do espaço neural de tempo em tempo). As oscilações encefálicas são classificadas em duas classes:

- (1) Oscilações de neurônio único, como oscilações de potencial de membrana e trens de disparo;
- (2) Oscilações de potencial de campo, registrados como a soma de correntes excitatórias e inibitórias no espaço cerebral.

As oscilações de potencial de membrana também são chamadas de *oscilações microscópicas*, as oscilações de potencial de campo local são consideradas como *oscilações mesoscópicas* e as registradas no escalpo ou epidurais (eletroencefalograma, eletrocorticograma) são as *oscilações macroscópicas* (Young & Eggermont, 2009). As oscilações mesoscópicas ou potencial de campo local (PCL) representam as flutuações de correntes, tanto correntes inibitórias

pós-sinápticas (CIPS) como correntes excitatórias pós-sinápticas (CEPS), relativamente lentas na matriz extracelular, e não potenciais de ação. Estas correntes lentas incluem correntes sinápticas, oscilações de membrana voltagem-dependentes, disparos de cálcio, disparos pós-potencial e correntes associadas a retropropagação de disparos (Buzsáki, 2002). O PCL é, portanto, uma média ponderada dos sinais de entrada nos dendritos e no soma dos neurônios vizinhos aos eletrodos e constitui uma ferramenta interessante que reflete a probabilidade de disparos da área imediata, através da decodificação correta, e pode ser usado para prever comportamentos motores, necessários para a tecnologia de interface *cérebro-máquina* (Stark & Abeles, 2007, embora este trabalho dê ênfase à atividade multiunitária, ou seja, a atividade de múltiplos neurônios sobreposta num só eletrodo; Yun *et al.*, 2007), caracterizar o estado sono-vigília (Gervasoni *et al.*, 2004) e processamento cognitivo (Buzsáki, 1998; Tort *et al.*, 2008). Além do seu uso como ferramenta, também há proposta de um papel fisiológico no aumento do poder computacional de neurônios unitários (Henrie & Shapley, 2005), convertendo a taxa de disparos em um código temporal (Jensen & Lisman, 1996).

A análise das oscilações mesoscópicas (PCL) e macroscópicas (EEG) demonstram que possuem um comportamento estatístico do tipo $1/f^a$, também chamado de ruído de Flicker, visto em muitos outros sistemas físicos e biológicos (Bak, 1987). O espectro de potência em baixas frequências desses sistemas, mesmo considerando enormes escalas de tempo, produz esse tipo de comportamento. Se representarmos graficamente o logaritmo da densidade da potência pelo logaritmo das frequências em que esse sinal foi decomposto, veremos que a amplitude aumenta à medida que a frequência diminui. Esse tipo de comportamento é visto, por um físico, simplesmente como ruído interno gerado por componentes passivos e ativos, que não é capaz de realizar nenhuma previsão. Todavia, o ruído encefálico possui $a=1$, um ruído especial

denominado de ruído rosa ou complexo. Caso seja representado num gráfico log/log, anteriormente citado, o comportamento geral será um decréscimo linear da amplitude à medida que aumenta a frequência; na banda de 0,5 – 100 Hz, entretanto, haverá um pico de amplitude característico desse tipo de ruído (Figura 18).

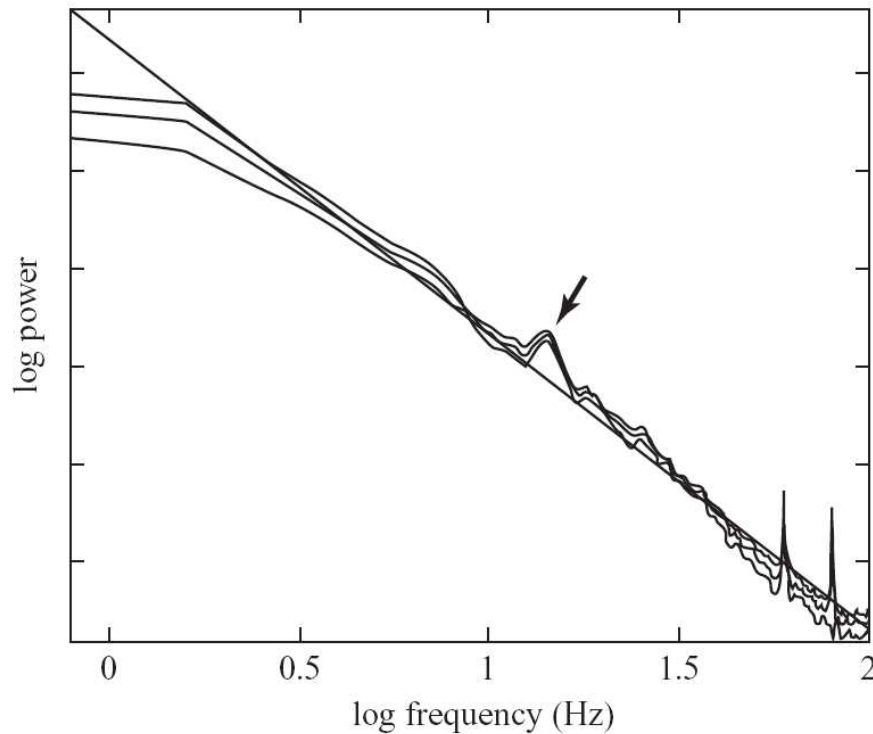


Figura 18. Espectro de potência de EEG do lobo temporal direito durante o sono. Há um decréscimo quase linear do log de potência, com um aumento local entre 0,5 – 100 Hz, característico do ruído rosa. Retirado de Buzsáki (2006).

Acoplamento de frequências cruzadas: As atividades oscilatórias convencionalmente assinadas a diferentes bandas de frequência (como teta, 4 – 12 Hz e gama, 30 – 100 Hz) não são completamente independentes. De fato, interações de frequências cruzadas normalmente ocorrem de diversas formas (Figura 19). Em (a) temos um sinal oscilatório teta cuja frequência não muda,

apenas a sua amplitude. Os diferentes modos com que uma oscilação gama pode interagir com teta são: (b) as mudanças na potência de gama são correlacionadas com mudanças na potência de teta (correlação potência para potência); (c) fechamento de fase, em que oscilações de frequências diferentes mantêm constantes os seus ciclos um em relação ao outro como, por exemplo, 1 ciclo de teta abrigo 4 ciclos de gama; (d) a frequência das oscilações rápidas é modulada pela fase das mais lentas; e (e) o poder da oscilação de gama é modulado pela fase da oscilação teta.

Neste último tipo de interação, a fase de ritmos de baixa frequência modula a amplitude das oscilações de alta frequência (Jensen & Colgin, 2007; Tort *et al.* 2008). No caso de interesse, a fase de teta é capaz de modular a potência de gama (medida relacionada à “quantidade” de uma frequência presente em um registro) no hipocampo de roedores.

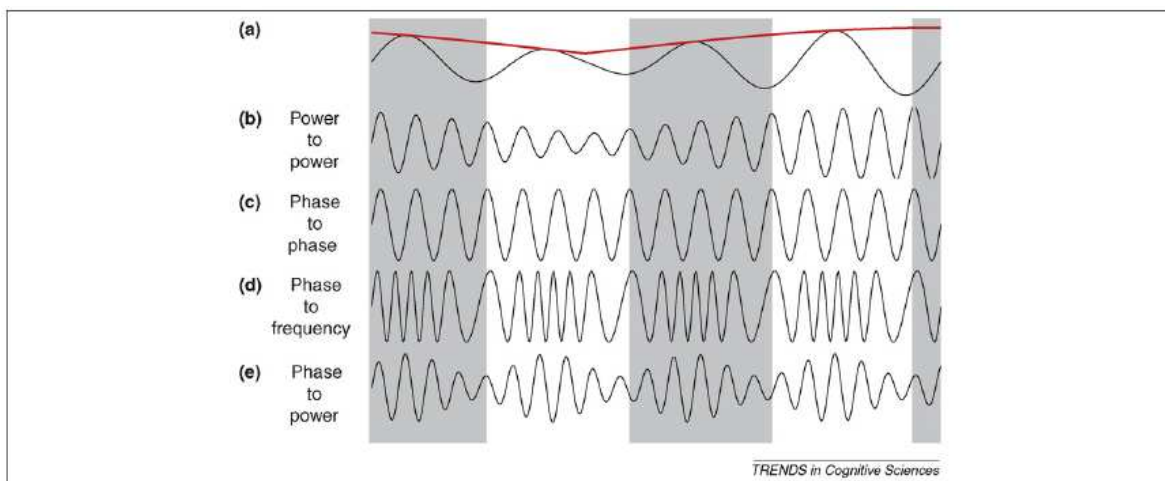


Figura 19. Interações entre frequências cruzadas (Jensen & Colgin, 2007).

8.3 CÓDIGO NEURAL

O modo como o encéfalo representa a realidade e realiza operações, como fabricar uma memória, ativar músculos esqueléticos voluntariamente, amar ou odiar alguém, sonhar, planejar o futuro e milhares de outras funções estão todas ancoradas conjuntamente numa minúscula atividade elétrica que se espalha por todo o nosso encéfalo. De alguma forma, essa atividade elétrica guarda, processa e evoca informações secretamente em códigos. Quebrar esse código e abrir as portas para descobrirmos quem realmente somos e qual nossa essência é motivo suficiente para justificar essa busca.

Os códigos neurais atualmente estudados são cada vez mais diversos, possibilitados pelo advento de tecnologias mais sofisticadas. O pensamento inicial de que a transmissão de informações era linear, ocorrendo ao longo de rotas neurais discretas entre os receptores de estímulos e as áreas superiores de processamento foi fortemente abalado. A monitoração de múltiplas áreas encefálicas e grandes populações de neurônios enquanto os animais experimentais realizam as mais variadas tarefas abriu as portas para o que se chama de código neural populacional espaço-temporal. O poder desta interpretação de código é enorme, pois ela considera os neurônios individualmente, como um todo e sua resposta não somente imediatamente após o estímulo, mas padrões emergentes no tempo após a entrada sensorial (Figura 20). Somente com uma análise deste tipo podemos dizer se o código neural que está sendo usado baseia-se na taxa de disparos (neurônio em vermelho), num padrão temporal de disparo próprio (neurônio em verde), no disparo sincronizado entre dois neurônios (neurônios azul e cinza) ou até mesmo uma combinação entre eles (Nicolelis & Ribeiro, 2006; Quiroga &

Panzeri, 2009). Além dos disparos, o potencial de campo local pode ser usado tanto individualmente (se ocorre aumento de potência, surgimento de uma frequência dominante, acoplamento) como para correlacionar com os disparos neuronais, como acontece na precessão de fase no hipocampo (Ahmed & Mehta, 2009; Jensen & Lisman, 1996), que pode ser explicada pelo acoplamento entre as frequências de teta-gama (Jensen & Colgin, 2007).

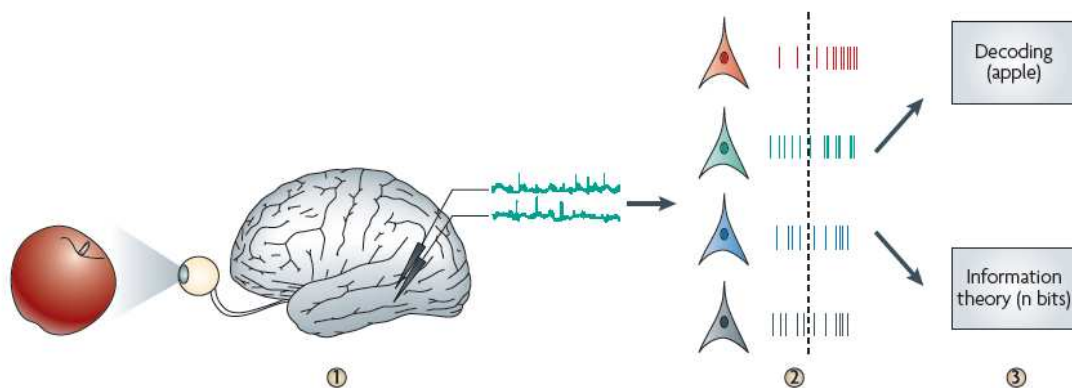


Figura 20. Variedades de código neural para o mesmo registro (Quiroga & Panzeri, 2009).

8.4 OSCILAÇÕES DO LBO TEMPORAL E CORRELATOS ELETROFISIOLÓGICOS DA MEMÓRIA

A organização anatômica do hipocampo, já vista anteriormente (1.4), tem como consequência a origem de alguns ritmos oscilatórios. Vejamos:

1. *Atividade irregular e lenta*: é uma expressão pra atividade não-teta vista no hipocampo quando no sono de ondas lentas e comportamento consumatório. Nesta atividade é que se encontram as ondas agudas (*Sharp Waves - SPW*);

2. *Ondas agudas*: são ondas grandes e provém da ativação massiva (duração de 50 – 100 ms) dos neurônios piramidais da região CA3 pelas suas recorrentes e que é propagada para o giro

denteado e região CA1. Elas são observadas quando o animal está acordado, mas imóvel, ou dormindo em sono de ondas lentas. Sobrepostas a estas ondas estão as ondulações de alta frequência, chamadas de *ripples*. (Buzsáki, 1986);

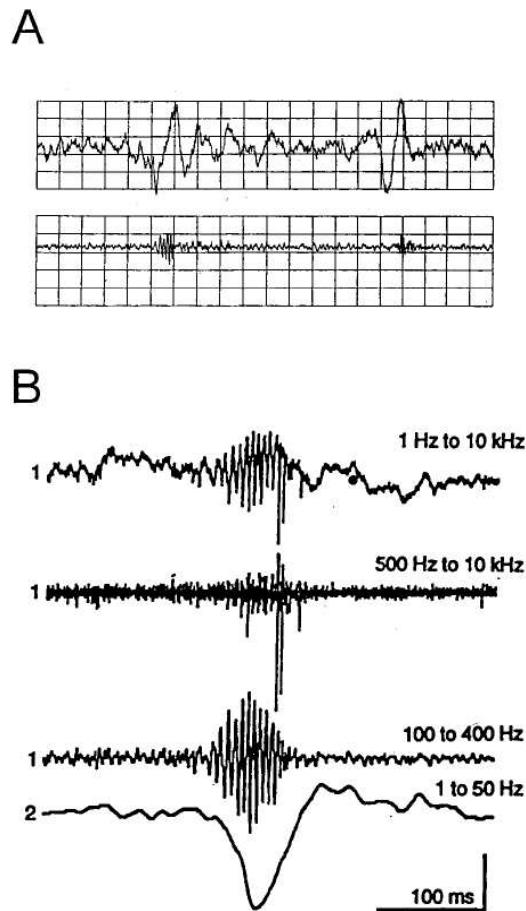


Figura 21. A. Atividade irregular associada com as *ripples* na área CA1 do hipocampo. B. Filtragens sucessivas mostrando (a) registro de toda a banda, (b) isolamento da atividade de unidades de disparo, (c) filtragem para *ripples* e (d) filtragem para *sharp-wave*. Retirado de Buzsáki (2002).

3. *Ondulações de alta frequência*: conhecidas como *ripples* (que não devem ser confundidas com as *oscilações de alta frequência* (HFO), pois estas só ocorrem em associação a

teta). Possuem frequência de 100 – 250 Hz, duram aproximadamente 50 ms, ocorrem na camada piramidal em CA1 e estão associadas a inibição sináptica decorrente da excitação proveniente de CA3 (Figura 21);

4. *Disparos denteados (dentate spikes)*: são gerados pela excitação de células granulares e interneurônios hilares no córtex entorhinal. Ao contrário das SPW, ela inibe as células piramidais de CA1, silenciando a saída hipocampal;

5. *Ritmo θ (teta)*: são ondas de 4-12 Hz encontradas durante vigília exploratória e durante sono REM. Sua geração é complexa e envolvem circuitos intrahipocampais, corticohipocampais e septohipocampais. Sobrepostas a estas ondas estão as oscilações gama e oscilações de alta frequência (HFO);

6. *Oscilações γ (gama)*: são oscilações rápidas divididas em gama baixa (30-60 Hz) e gama alta (60 – 100 Hz). Sua geração se dá por inibição fásica e sincrônica por células principais em redes de interneurônios (Traub *et al.*, 1998);

7. *Oscilações de alta frequência (HFO)*: são oscilações hipocampais relacionadas à presença de teta recentemente descritas por Tort *et al.* (2008) e possivelmente são geradas pela entrada sináptica do córtex entorhinal diretamente em CA1 (Figura 3).

Nas teorias de memória do ponto de vista eletrofisiológico, há dois modelos principais:

Celular: A potenciação de longa duração (PLD) é um refinamento das idéias de Hebb e Konorski, em que neurônios atuam como detectores de coincidência, aumentando a eficiência (ou força) sináptica entre eles caso dispararem ao mesmo tempo. Isto ocorre porque a membrana pós-sináptica contém receptores glutamatérgicos ionotrópicos AMPA e NMDA e metabotrópicos mGluR5. Uma forte despolarização da célula pós-sináptica e liberação de glutamato pela célula

pré-sináptica na fenda ocasiona a abertura do canal NMDA e liberação do Mg^{2+} que bloqueava o canal. Com a abertura do canal NMDA, há um aumento do Ca^{+2} intracelular, o que dispara processos que suprarregulam os canais de AMPA, seja por fosforilação de canais pré-existentes, seja por adição de novos canais à membrana (Bliss & Collingridge, 1993; Lisman, 2001; Lisman & Raghavachari, 2006). Além disso, são capazes de provocar uma distribuição especializada de retículo endoplasmático nas sinapses potenciadas (Holbro *et al.*, 2009). As SPW são vistas como os correlatos populacionais do evento celular de PLD hipocampal, pois trata-se de um evento forte, sincrônico e que necessita da ativação de muitas aferências convergentes (Buzsáki, 1986). Mais recentemente as ondas teta também foram vistas como um mecanismo de sincronização temporal de despolarizações em dendritos de células piramidais induzidas por aferências e invasão dendrítica de disparos rápidos, mecanismos necessários para a plasticidade sináptica que ocorre na PLD (Buzsáki, 2002). Embora exista uma vasta aceitação da PLD como um modelo celular e eletrofisiológico de memória, alguns autores ainda criticam duramente o fato de que poucos dos artigos publicados que tratam do assunto tenham propostas de manipulações comportamentais visando uma compreensão mais fundamental entre a relação PLD e memória e que, até o presente momento, a potenciação de longa duração ainda é tratada como um dogma, apesar de apenas representar um evento de ativação sináptica distante do aprendizado e memória (Bruer, 2006; Shors & Matzel, 1997).

Populacional: o modelo mais aceito foi proposto pelo Dr. Buzsáki, da Universidade de Rutgers, chamado de “modelo de dois estágios para a formação de traços mnemônicos” (Buzsáki, 1986, 1989). Estudando intensamente a região hipocampal do encéfalo de roedores, padrões neuronais típicos de situações que envolvem o período de aprendizado e o período pós-aprendizado foram caracterizados. Durante comportamentos ativos exploratórios de ratos quando

são apresentados a ambientes novos, há uma atividade hipocampal rítmica lenta, vista acima como teta, cuja banda de frequência está entre 4 – 12 Hz e sua ocorrência em outras regiões corticais e subcorticais não são conhecidas. Conjuntamente com teta, ocorrem oscilações na faixa de gama (30 – 100 Hz), cujo papel está associado à ligação sensorial, atenção seletiva e formação de assembléias neuronais transientes, e armazenamento e transmissão de informações (Buzsáki *et al.*, 2003). A aparição destas ondas hipocampais durante a exploração ativa é o primeiro estágio de formação, a chamada *forma lábil do traço de memória*. A existência de oscilações neocorticais fisiologicamente significativas a frequências maiores que gama também foi reportada. Em roedores, por exemplo, oscilações rápidas (120-200 Hz) associadas a ondas agudas e lentas na faixa de delta (0,5 – 4 H), denominadas em inglês como complexos *Sharp wave – ripples (SPW-R)*, aparecem no hipocampo durante o sono de ondas lentas (SWS) e imobilidade (Csicsvari *et al.*, 2000). A aparição, por sua vez, destas ondas hipocampais é responsável pela transferência das memórias para áreas neocorticais e, portanto, é chamada de *forma duradoura do traço de memória*, o segundo estágio de formação.

8.5 O SONO E A MEMÓRIA

Embora seja difícil de estabelecer a origem do pensamento do possível papel do sono sobre a memória, o trabalho mais antigo é de Jenkins & Dallenbach (1924), reportando que a recordação em humanos é melhorada após um período de sono. Entre os anos 60 e 80, houve uma ascensão dos trabalhos tentando mostrar uma possível relação causal entre sono e memória tanto em seres humanos como modelos animais. Sem grandes sucessos, todavia, o tema foi abandonado até a publicação de Wilson e McNaughton (1994), quando ressurgiu com força. Os

autores deste estudo, monitorando células de lugar (neurônios hipocâmpais que disparam preferencialmente em certos pontos de um campo aberto), demonstraram que havia uma reativação preferencial durante o sono de ondas lentas entre células que tinham seus campos de lugar parcialmente sobrepostos e correlacionados.

As correntes que debatem sobre o papel do sono na memória dividem-se em quatro, seguindo a classificação de Ellenbogen *et al.* (2006):

(1) *nenhum*: o sono não oferece nenhum benefício. Esta hipótese baseia em estudos feitos com privação total de sono (Campbell *et al.*, 2002), privação seletiva de sono REM (Davis *et al.*, 2003; McDermott *et al.*, 2006), de sono SWS (Ferrara *et al.*, 1999) ou fragmentação de sono (Tartar *et al.*, 2006), tanto com agentes farmacológicos (como os antidepressivos inibidores da monoamina oxidase, tricíclicos ou inibidores seletivos da recaptação da serotonina) ou comportamentais, como a esteira ou a técnica do tanque de água. De fato, são técnicas extremamente estressantes e normalmente quando os animais são testados sob efeito de privação, há efeito amnésico; caso passem por uma recuperação desse sono, a memória retorna, mostrando que a privação teve efeito sobre a evocação e não sobre a consolidação (Siegel, 2001; Vertes & Eastman, 2000). Um exemplo da inconsistência de estudos com privações desta natureza vem de Tian *et al.* (2009). A privação de sono REM de ratos após a reativação de memória emocional não produziu qualquer efeito; outros estudos, todavia, demonstram que administração de corticosterona pós-reativação é capaz de inibir a reconsolidação (Abrari *et al.*, 2008; Diergaarde *et al.* 2008). Por ilação, a privação de sono REM ou qualquer outro “efeito colateral” da metodologia estaria, portanto, revertendo o efeito amnésico do estresse de privação, ao invés de potencializá-lo, como ocorre na consolidação.

(2) *passivo*: o sono protege temporariamente a memória de interferências externas. Essa foi a hipótese dos trabalhos pioneiros de Jenkins & Dallenbach (1924). Por este ângulo, qualquer demonstração de evocação superior após um período de sono não demonstra que o sono tem um papel ativo na consolidação, mas sim que a experiência em vigília é capaz de interferir com a memória;

(3) *permissivo*: além do sono oferecer proteção para a memória, como a hipótese passiva, a consolidação que ocorre durante o sono é mais eficiente do que durante a vigília. Esta ênfase no contexto mental de baixa interferência que o sono cria provém de estudos demonstrando o bombardeio sensorial que o encéfalo em vigília recebe é capaz de causar interferências na consolidação da memória. Assim, o sono ainda não tem um papel único e ativo, mas além de proteção, ele confere um contexto para a maquinaria de consolidação que já existe operar em eficiência máxima (Wixted, 2004);

(4) *ativo*: o sono oferece participação ativa na consolidação por existir propriedades biológicas únicas durante o sono (Ellenbogen *et al.*, 2006). Apoiando esta hipótese estão os achados de reativação ou repetição de padrões neuronais vistos durante o período de vigília exploratória durante estágios de sono (Wilson & McNaughton, 1994). Ademais, ocorre uma orquestração entre os ciclos ultradianos do sono (Figura 22), cada qual com um papel importante. Tanto REM (Davis *et al.*, 2003; McDermott *et al.*, 2006) quanto SWS (Eschenko & Sara, 2008) são necessários para a consolidação de memórias, mas cada um tendo um papel distinto e complementar: enquanto que a reverberação neuronal pós-aquisitiva ocorre principalmente durante o sono de ondas lentas (Ribeiro *et al.*, 2004), os eventos transcrpcionais capazes de promover o armazenamento permanente da memória ocorrem durante o sono REM (Ribeiro *et*

al., 1999, 2002). Ambos os eventos em comunhão são capazes de reverberar, armazenar e propagar a memória para sítios neocorticais permanentes (Ribeiro & Nicoletis, 2004).

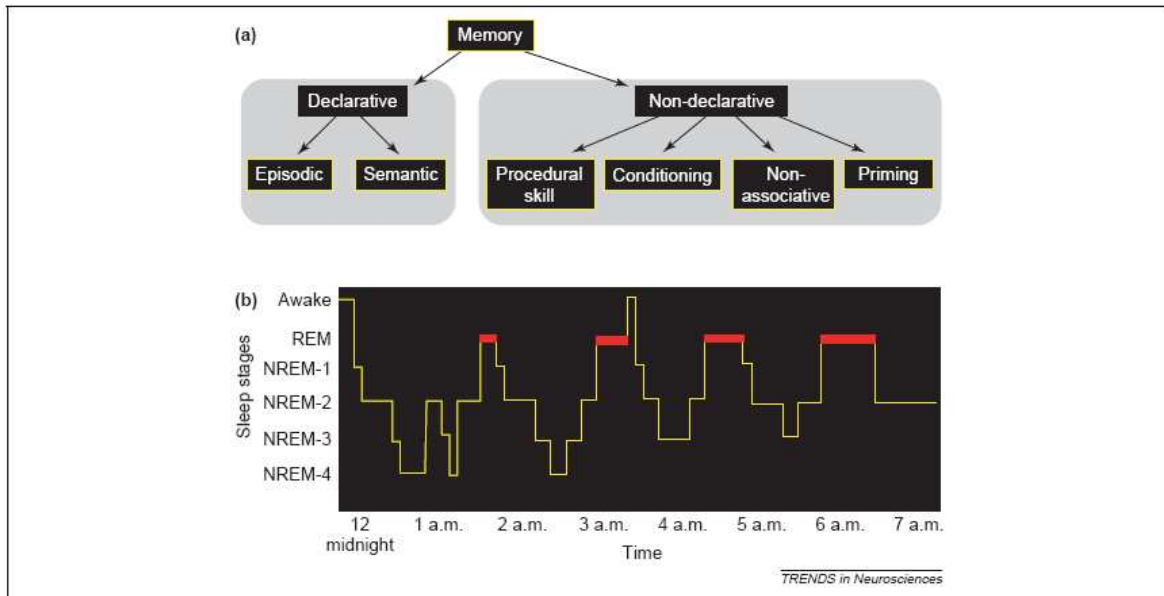


Figura 22. (a) Formas de memória e (b) estágios do sono. Retirado de Stickgold (2005).

A parte eletrofisiológica do presente projeto de pesquisa visa estudar mais a fundo o potencial papel funcional dos acoplamentos entre os ritmos hipocampais. Através de uma ferramenta matemática recente elaborada pelo co-orientador do preponente deste projeto (o *comodulograma*, ver Metodologia), serão estudados padrões de acoplamentos entre frequências no hipocampo durante três principais estágios comportamentais (a saber, vigília, sono de ondas lentas, e sono REM) antes e após aprendizado de um novo traço de memória. Tal projeto visa então uma maior compreensão dos mecanismos envolvidos na formação de memórias – com particular ênfase ao papel do sono – a partir de uma caracterização eletrofisiológica na escala mesoscópica (isto é, de população de neurônios, ver Young & Eggermont, 2009).

JUSTIFICATIVA

Estudos eletrofisiológicos *in vivo* têm sido extremamente importantes em prover uma maior compreensão sobre como exatamente o cérebro exerce suas funções. De fato, estamos vivendo um período no qual muitos pesquisadores das áreas exatas têm migrado para o estudo das Neurociências e, contrariamente, pesquisadores com formação biológica têm buscado em ferramentas matemáticas e computacionais a resposta para muitos dos achados eletrofisiológicos. O presente projeto também possui um caráter interdisciplinar, uma vez que essas ferramentas matemáticas serão empregadas – através de programação em MATLAB – para a análise dos traçados eletroencefalográficos hipocampais obtidos antes e após o aprendizado de um novo traço de memória. Se examinará em particular a intensidade do acoplamento entre diferentes ritmos cerebrais durante o aprendizado, visto que resultados preliminares recentes vêm sugerindo que as interações entre as ondas cerebrais constituiriam correlatos neurofisiológicos de uma maior atividade cognitiva. Se analisará ainda potenciais diferenças entre os acoplamentos dos ritmos cerebrais em diferentes estágios do ciclo sono-vigília, antes e após aprendizado. Cabe citar que, embora a pesquisa proposta no presente projeto constitua um primeiro passo visando um maior entendimento da fisiologia (paleo)cortical normal, um maior entendimento dos processos eletrofisiológicos normais pode vir a gerar *insights* importantes sobre a patofisiologia de

desordens corticais (e.g., esquizofrenia, autismo), uma vez que, no futuro, poderá ser feita a comparação dos padrões de acoplamentos entre os ritmos cerebrais presentes nestas desordens com os padrões hígidos pretendidos aqui.

A presente proposta de pesquisa é justificada pelo fato de que (a) resultados recentes têm mostrado que oscilações de diferentes frequências podem ocorrer simultaneamente e também interagir entre si, e que (b) tal acoplamento entre frequências tem sido preliminarmente associado a aprendizado e memória, e que (c) a atividade cerebral elétrica durante o sono também vem sendo implicada na consolidação de memórias. Desta forma, o que é proposto é o estudo de uma possível relação entre estes achados.

OBJETIVOS

Estudar em ratos os fenômenos de acoplamentos entre oscilações hipocâmpais, com particular foco no estudo de potenciais diferenças nos padrões de acoplamentos existentes antes e após aprendizado de uma nova memória, e durante diferentes estágios cognitivo-comportamentais do ciclo sono-vigília.

MATERIAL E MÉTODOS

Metodologia utilizada para estudar os dados eletrofisiológicos em plataforma Matlab

Análise de dados

A análise dos registros hipocampais e dos dados comportamentais será feita através do programa MATLAB (<http://www.mathworks.com/>). Será efetuada a programação de *scripts* novos para as particularidades deste projeto bem como a adaptação de *scripts* prévios quando conveniente.

Medidas de acoplamento entre frequências:

Será empregada um índice de modulação (IM) descrito em Tort et al. (2008) para se mensurar o nível de acoplamento amplitude-fase. Esta medida depende basicamente na construção de uma distribuição de valores de amplitude de uma determinada frequência de interesse (ex., gama) como uma função da fase de uma segunda frequência sob estudo (ex., teta). A existência de acoplamento amplitude-fase é caracterizada por um desvio da distribuição uniforme por parte da distribuição de amplitude. Tal divergência da distribuição uniforme é medida através da pré-métrica definida pela distância de Kullback- Leibler (KL). O IM é obtido

após uma normalização da distância KL, que a faz assumir valores em $[0,1]$. O comodulograma de acoplamentos é obtido ao se aplicar o IM a múltiplos pares de frequências; o resultado é expresso através de um mapa bidimensional (uma dimensão para amplitude e outra para fase) cuja escala de cor representa os valores do IMs (ver Tort *et al.* 2008 e Figura 23).

Caracterização dos estágios do ciclo sono-vigília

Os períodos de vigília, sono de ondas lentas, e sono REM serão definidos como descrito em Gervasoni *et al.* (2004). Basicamente, são criadas duas razões entre níveis de poder espectral de bandas de frequências, calculadas em diferentes janelas de tempo. A seguir, uma análise de componente principal (PCA) é efetuada, e a projeção das séries temporais das razões espectrais no seu respectivo primeiro auto-vetor gera um espaço de estados (*state space*) bidimensional a partir do qual se pode identificar *clusters* característicos dos diferentes estados do ciclo sono-vigília (ver Gervasoni *et al.* 2004).

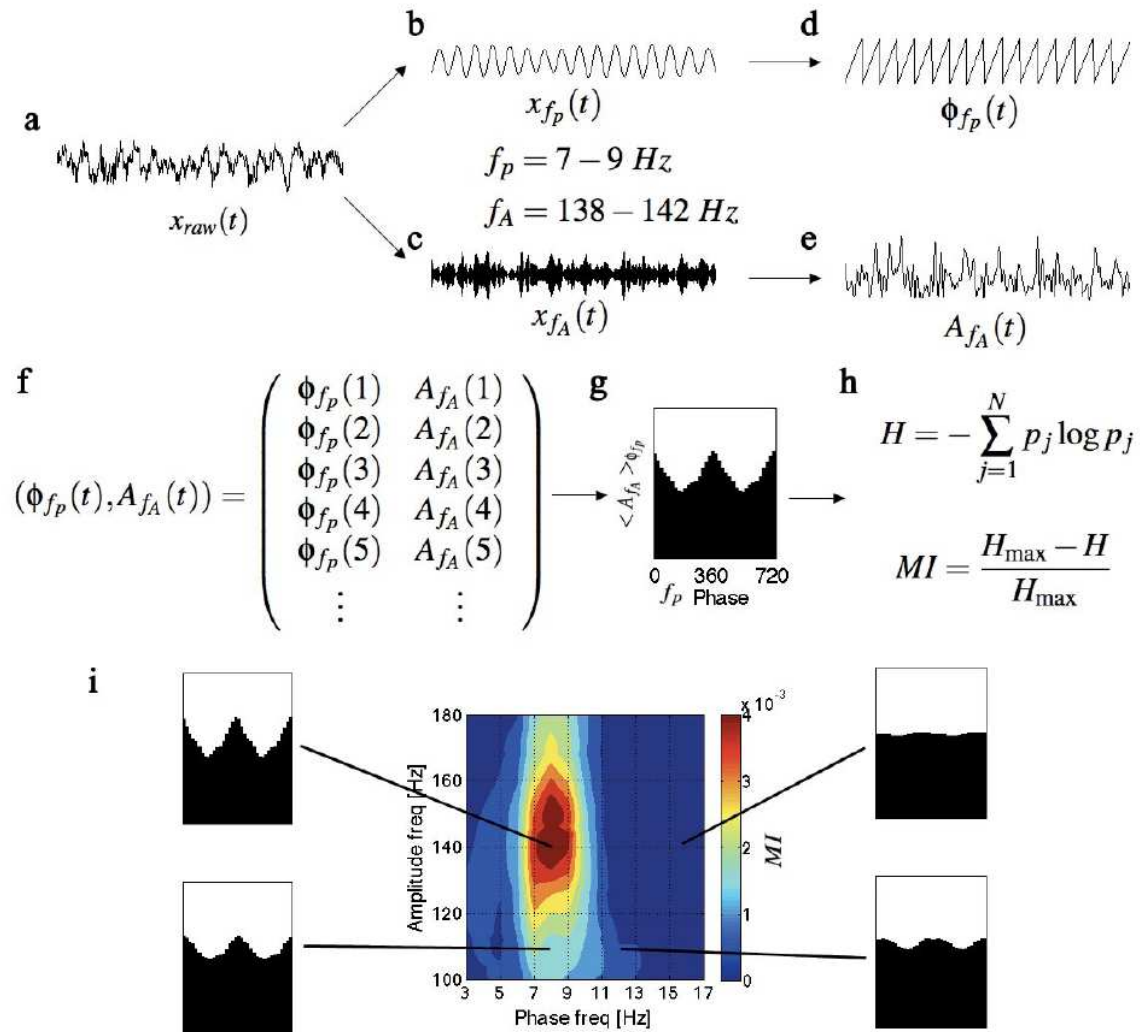


Figura 23. Passos da computação do índice de modulação do comodulograma. O processamento do sinal até a obtenção das múltiplas possibilidades de modulação do tipo fase-amplitude é realizado como se segue. (a-c) O sinal cru (a) é filtrado nas freqüências de fase (b) e amplitude (c) de interesse. As séries temporais da fase (d) e a amplitude (e) são calculadas do sinal filtrado usando a transformada de Hilbert. Uma série temporal composta (f) é construída e usada para obter valores de amplitude média de cada pacote de 20° de fase (g). (h) O índice de modulação é obtido aplicando-se uma medida de entropia normalizada ao vetor de amplitude média. (i) O

comodulograma é construído pela representação em escala de cores dos valores do índice de múltiplos pares de freqüências de modulação fase-amplitude. Retirado de Tort *et al.* (2008).

Metodologia utilizada no Instituto de Neurociências de Natal – Edmond e Lily Safra (IINN-ELS)

Matrizes de multieletrodos

Nossas matrizes de eletrodos implantáveis são manufaturados em nosso próprio laboratório. Os eletrodos são implantados em matrizes de 16 microfios isolados, espaçados por intervalos de 250-500 μm . Esses microfios são conectados, junto com fios terras, a conectores Omnetics (18 contatos cada). Os conectores são cimentados juntos para formar um "chapéu". Geralmente, entre um e oito conectores podem ser cimentados em uma cabeça de rato numa única cirurgia. Esses chapéus podem ser implantados bilateralmente ao longo de múltiplas áreas corticais e subcorticais. Nossos experimentos anteriores têm revelado que quando 64 microfios são estereotaxicamente implantados em núcleos-alvo apropriados em ratos, unidades neuronais discrimináveis são tipicamente obtidas a partir de 70-80% dos microfios implantados. Dado que 2-4 unidades neuronais podem ser isoladas de cada um desses microfios, somos capazes de rotineiramente registrar até mais de 60 neurônios bem discriminados a partir de 32 microfios.

Implante cirúrgico de matrizes de múltiplos eletrodos e cânulas

Os procedimentos de implantes de matrizes de eletrodos já foram descritos em detalhes em outros trabalhos (Kralik, 2001; Nicolelis, 1999). De forma resumida, os ratos serão anestesiados com ketamina e xilazina, recebendo dois implantes bilaterais de matrizes com 32 (2x16) eletrodos feitos de microfilamentos de tungstênio cobertos por teflon (35 μm , 1,0–1,2 M Ω @ 1KHz; California Fire Wire Company, Grover Beach, EUA) e espaçados a intervalos de 250 μm . A estrutura alvo para o implante será o HPC dorsal, cuja localização são dadas pelo

Atlas para cirurgia estereotáxica (Paxinos, 1997). Os implantes serão fixados no crânio utilizando-se parafusos de aço inoxidável e acrílico. Um parafuso adicional, soldado a um fio de prata, servirá como eletrodo de referência (terra). O posicionamento cirúrgico preciso dos eletrodos será garantido pelo posicionamento estereotáxico dos microfios e pelo registro contínuo da atividade neural durante a cirurgia. Para HPC, o posicionamento dos eletrodos é guiado pelo perfil característico de profundidade para a atividade neural espontânea, e pela presença de ritmo teta nos potenciais de campo registrados durante o experimento. A reconstrução histológica para a determinação do sítio de eletrodos específicos é conduzida após o término de todos os experimentos de registro pela inspeção de sessões coronais do encéfalo corados com cresil com referência aos planos anatômicos (Paxinos, 1997). Tipicamente, os microfios causam danos mínimos ao tecido. As seguintes coordenadas em mm a partir do Bregma serão usadas para centrar as matrizes com 16 eletrodos microfios em relação aos eixos antero-posterior (AP), médio-lateral (ML) e dorso-ventral (DV) no hemisfério esquerdo: HPC (- 2,8 AP, + 1,5 ML, - 3,3 DV). Medidas de DV serão sempre feitas em relação à superfície pial. Após a conclusão dos experimentos, a confirmação dos implantes em HPC das matrizes será feita por procedimento histológico padrão (coloração de Nissl; ver abaixo).

Cuidados cirúrgicos e pós-cirúrgicos

Os experimentos de registro neurofisiológico e de implantes cirúrgicos foram realizados em ratos completamente anestesiados com halotano, pentobarbital ou cetamina. Antibióticos tópicos são aplicados ao redor do implante no final da cirurgia. A analgesia pós-cirúrgica foi obtida pelo uso de buprenorfina (0.5-2.5mg/Kg, SC), dada imediatamente após a cirurgia e a intervalos de 8 horas após isso. Logo após as cirurgias individuais, os animais retornaram para as

suas gaiolas (posicionadas parcialmente sob uma placa de aquecimento que manterá a temperatura corpórea dos animais) e foram monitorados freqüentemente pelas próximas 6-8 horas. Os animais tiveram acesso à água tão logo acordaram da anestesia, mas não à comida sólida até que estivessem completamente recuperados da anestesia. Nos dias seguintes à cirurgia, os animais foram inspecionados regularmente para verificar sinais de dor, sofrimento ou infecção. De acordo com nossa experiência, esses ratos geralmente recuperam o comportamento normal 24 horas após a cirurgia. A cicatrização completa do ferimento na cabeça costuma levar mais tempo. Foi permitido que os animais se recuperassem no pós-cirúrgico por uma semana. Após esse período, eles foram colocados individualmente na caixa de registro vazia por cinco dias consecutivos, para habituação, recebendo, nesse período, água e ração *ad libitum* (ciclo claro-escuro 12:12 hs, luzes apagadas às 19:00 h). Infecção sistêmica pós-cirúrgica é extremamente rara nesse tipo de cirurgia em roedores. Se sinais de problemas aparecessem, como perda de peso, aparência "abatida" ou sinais de inchaço ou de infecção, os animais seriam tratados tanto quanto possível com cuidados veterinários e uso de antibióticos (penicilina). Caso os animais não apresentassem melhoras dentro de um período razoável de tempo (2-3 dias), seriam eutanaziados. Os microfios cronicamente implantados não parecem causar dor ou desconforto aos ratos, assim como implantes semelhantes em humanos são relatados como indolores. Toda a manipulação dos animais é feita de modo responsável

Tarefa de Medo Condicionado ao Contexto

A câmara de condicionamento consistiu em uma caixa composta em laterais de alumínio, pintada com tinta eletrostática epóxi, teto e frente confeccionado em acrílico transparente, com barras de aço inox separadas por 1,0 cm. Os animais eram anestesiados com isoflurano,

conectados no aparelho de aquisição de dados neuronais múltiplos da Plexon e, após 1 hora de recuperação da anestesia, passavam por 3 horas de registro. No primeiro dia, apenas a atividade espontânea durante 3 horas foi registrada, sem qualquer condicionamento. No segundo dia os animais passaram por uma sessão de condicionamento. Foram gentilmente colocados na caixa de condicionamento e, após 3 minutos, receberam 1 choque de 0,7 mA por 2 segundos e, após 30 segundos, receberam os choques novamente. Os animais permaneceram por 1 minuto adicional na caixa de condicionamento após receberem os choques. Após a sessão de condicionamento, a atividade espontânea dos animais foi registrada por 3 horas (a semelhança do registro basal, mas neste caso o período de consolidação foi o alvo).

Registros eletrofisiológicos em tempo real

Tipicamente, há uma pronunciada melhora da qualidade geral dos registros de neurônios unitários alguns dias após a cirurgia. Os experimentos com registro de grupos neuronais começam 7-10 dias após a cirurgia. Atualmente, nosso arranjo permite que até quatro potenciais de ação sejam discriminados de cada um dos 32 canais do processador de aquisição de múltiplos-neurônios (**MNAP**, Plexon Inc, Dallas, TX). A rotina de discriminação em tempo real de potenciais de ação utiliza processadores de sinal digital Motorola 56000, os quais implementam janelas temporais e de voltagem para a detecção de potenciais de ação. Para uma segunda verificação de que os potenciais de ação de um único neurônio estão sendo detectados, um algoritmo de análise do componente principal (**ACP**) para o reconhecimento em tempo real de formas de onda é usado para isolar os potenciais de ação derivados de cada microfio. Cada forma de onda é plotada como um aglomerado no espaço definido pelos três primeiros vetores próprios obtidos naquele canal durante o período de "aprendizado". Um pacote de programas para a

seleção supervisionada de potenciais de ação, trabalhando sob a plataforma Windows XP, permite a amostragem contínua de todas as formas de onda (SortClient 2002, Plexon Inc, Dallas, TX) para validação *offline* (Offline Sorter 2.3, Plexon Inc, Dallas, TX) de acordo com os seguintes critérios cumulativos: a) limiares de voltagem > 2 desvios padrões da distribuição das amplitudes, b) razão sinal-ruído $> 2,5$, c) menos de 1% dos intervalos inter-potenciais de ação menores do que 1,2 ms, correspondendo aos períodos refratários, d) estereótipo do formato do potencial de ação, determinado pela ACP. De modo a registrar continuamente neurônios individuais por várias horas, utilizaremos um algoritmo adaptativo que ajusta modelos da forma de onda baseado na média dos formatos recém acumulados. Isso permite que o mesmo neurônio seja rastreado ao longo de dias consecutivos, conforme verificado pela superposição das formas de onda adquiridas no decorrer do experimento (Wavetracker, Plexon Inc, Dallas, TX). Para a obtenção dos potenciais de campo locais (PCL), os sinais obtidos dos mesmos eletrodos serão filtrados na banda de 0,3 a 400 Hz e digitalizados a 1 KHz por uma conversor analógico digital (National Instruments, Austin, TX).

Aquisição computadorizada de dados de múltiplos neurônios

O SSCP (Plexon Inc, Dallas, TX), um programa rodado em um microcomputador dual Pentium 400 MHz, é utilizado para adquirir e armazenar dados de tempos de ocorrência de potenciais de ação completos de todos os neurônios simultaneamente registrados. O SSCP tem uma resolução de 0,2 ms. Amostras contínuas de potenciais de ação são obtidas para validação *offline* da discriminação dos neurônios unitários. Análise *offline* de autocorrelações e histogramas dos intervalos inter-potenciais de ação são então empregados para demonstrar que um mesmo conjunto de unidades neurais foi registrado durante a duração de cada experimento.

Portanto, ambos os conjuntos de dados, unitários e multi-unitários, serão investigados nesse projeto. O NEX (Plexon Inc, Dallas, TX) e outros pacotes projetados no laboratório do investigador principal serão empregados para a análise conjunta dos dados neurofisiológicos e comportamentais, usando principalmente o programa MATLAB, baseado na transformação dos dados neuronais em matrizes vetoriais.

Técnicas para o registro do comportamento

Em nossos experimentos, os comportamentos observados são constantemente registrados em fita de vídeo por duas câmeras CCD sensíveis ao infra-vermelho colocadas diametricamente opostas, enquanto que a iluminação infra-vermelha é usada para monitorar o comportamento quando as luzes visíveis estão desligadas (ciclo claro/escuro de 12:12, luzes acesas as 06:00 h). Um temporizador com precisão de milisegundos (modelo VTG-55, For-A, Tóquio, Japão) é usado para sincronizar a aquisição dos registros de potenciais de ação, potenciais de campo e de vídeo. Os estados de comportamento são classificados como VIG, SOL ou REM baseados numa análise espectral dos potenciais de campo (ver abaixo), e se necessário comparados com a classificação obtida pela inspeção visual dos vídeos de comportamento.

Manejo dos roedores

Ratos Wistar foram usados para esses estudos. O uso de roedores é apropriado a esse estudo devido à clara organização do córtex somatosensorial e do hipocampo. As homologias dessas estruturas encefálicas de ratos com as de humanos são razoavelmente bem estabelecidas. Os roedores são abrigados em Biotérios de Pesquisa do IINN-ELS separados para ratos e camundongos, sob a direção em tempo integral de uma equipe especializada formada por

bioteristas e veterinária. Os biotérios de ratos estão equipados respectivamente com estantes e racks ventiladas, que possibilitam o alojamento seguro e garantem a saúde dos animais.

Histologia

Ao término dos registros de grupos neuronais e da PCL, os animais foram eutanaziados e seus cérebros removidos para processamento histológico. Para realizar esse procedimento, os roedores são primeiramente anestesiados com pentobarbital sódico (I.P., 100 mg/Kg) e então perfundidos através do coração, primeiro com salina 0,9%, seguida de paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1M (pH=7,4). Os cérebros são removidos do crânio e mantidos por 24 horas na mesma solução fixadora. Em seguida, são lavados por 12 horas em sucrose 20% em tampão fosfato 0,1M (pH=7,4). Em seguida os cérebros serão rapidamente congelados em uma mistura de gelo seco e etanol 100%. Subseqüentemente, sessões encefálicas seriais de 20 µm de espessura são cortadas usando um criostato e montadas em lâminas de vidro.

RESULTADOS

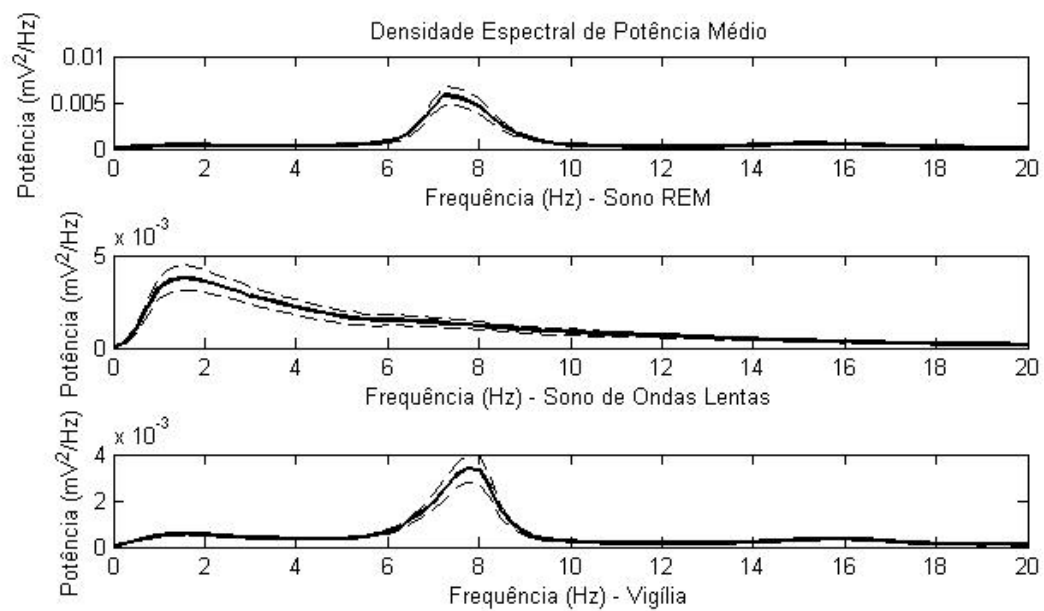


Figura 24. Espectro de potência do período basal representativo de um dos animais. Média e desvio padrão calculados para 16 canais de registro realizados durante 3 horas.

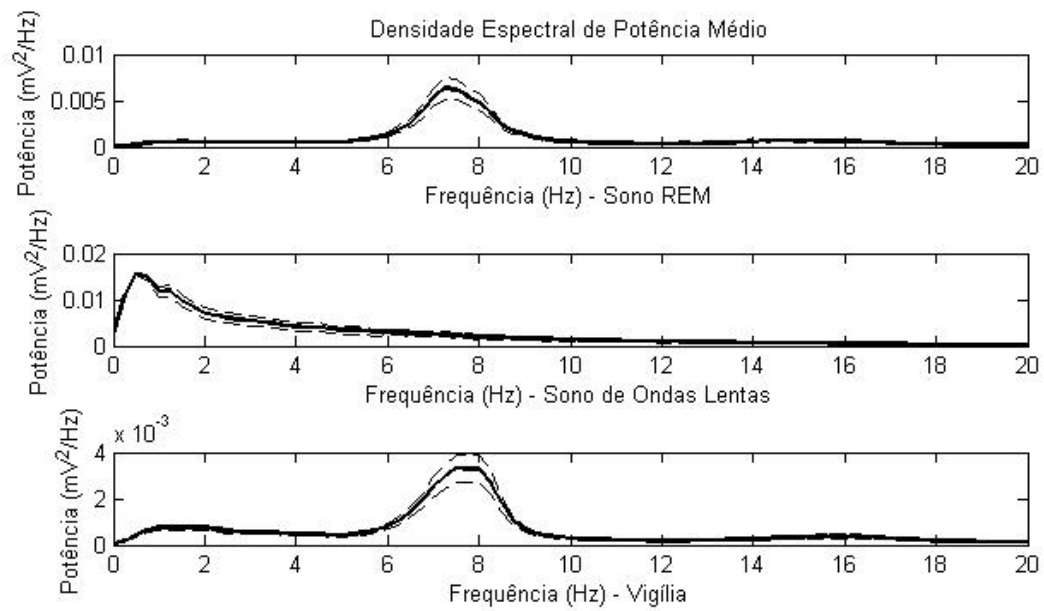


Figura 25. Espectro de potência do período de consolidação representativo de um dos animais.

Média e desvio padrão calculados para 16 canais de registro realizados durante 3 horas.

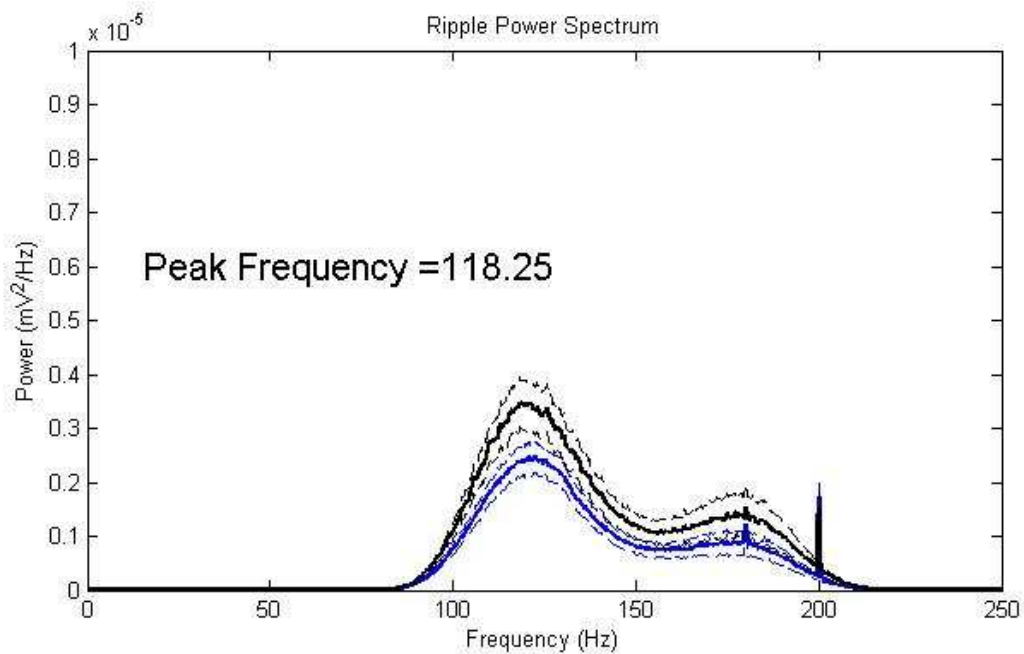


Figura 26. Espectro de potência filtrado para faixa de *ripple* durante a primeira hora basal (preto) e pós-aprendizado (azul). Média e desvio padrão calculados para 16 eletrodos de registro e 3 animais experimentais.

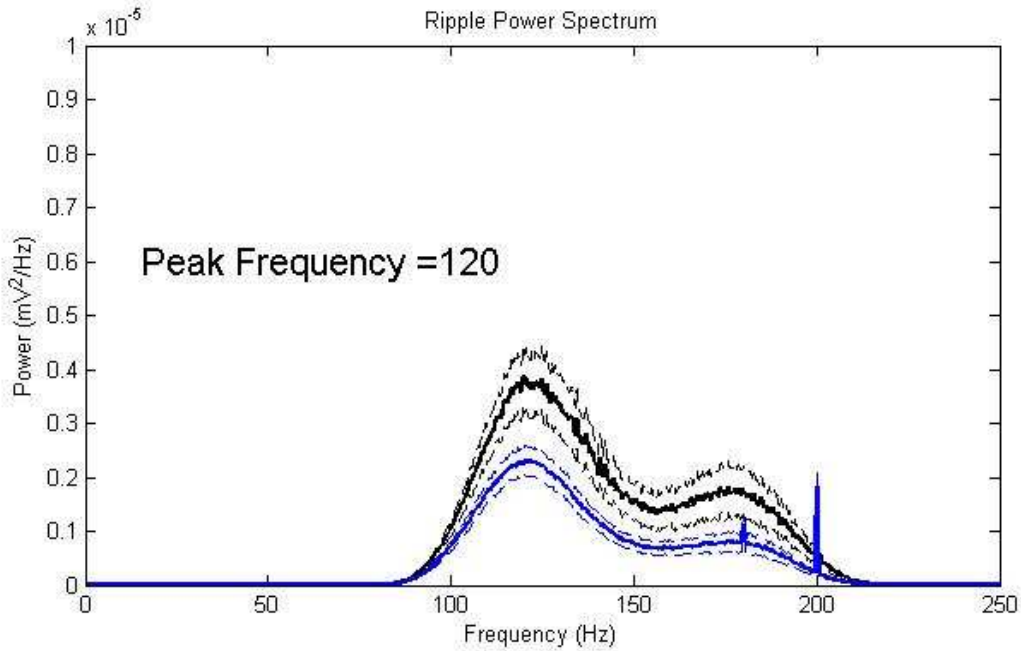


Figura 27. Espectro de potência filtrado para faixa de *ripple* durante a segunda hora basal (preto) e pós-aprendizado (azul). Média e desvio padrão calculados para 16 eletrodos de registro e 3 animais experimentais.

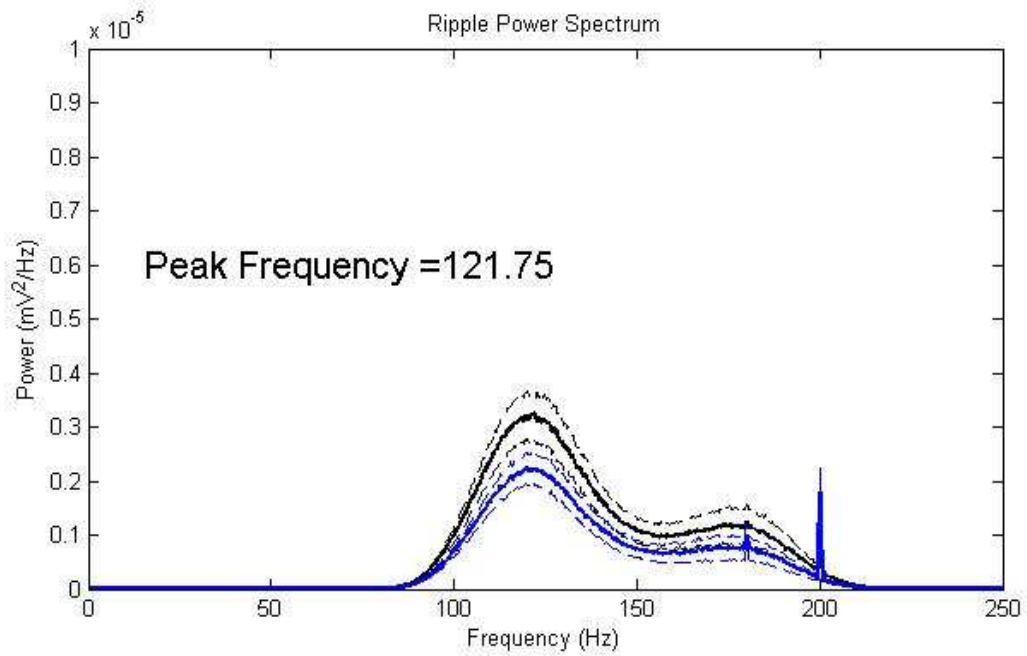


Figura 28. Espectro de potência filtrado para faixa de *ripple* durante a terceira hora basal (preto) e pós-aprendizado (azul). Média e desvio padrão calculados para 16 eletrodos de registro e 3 animais experimentais.

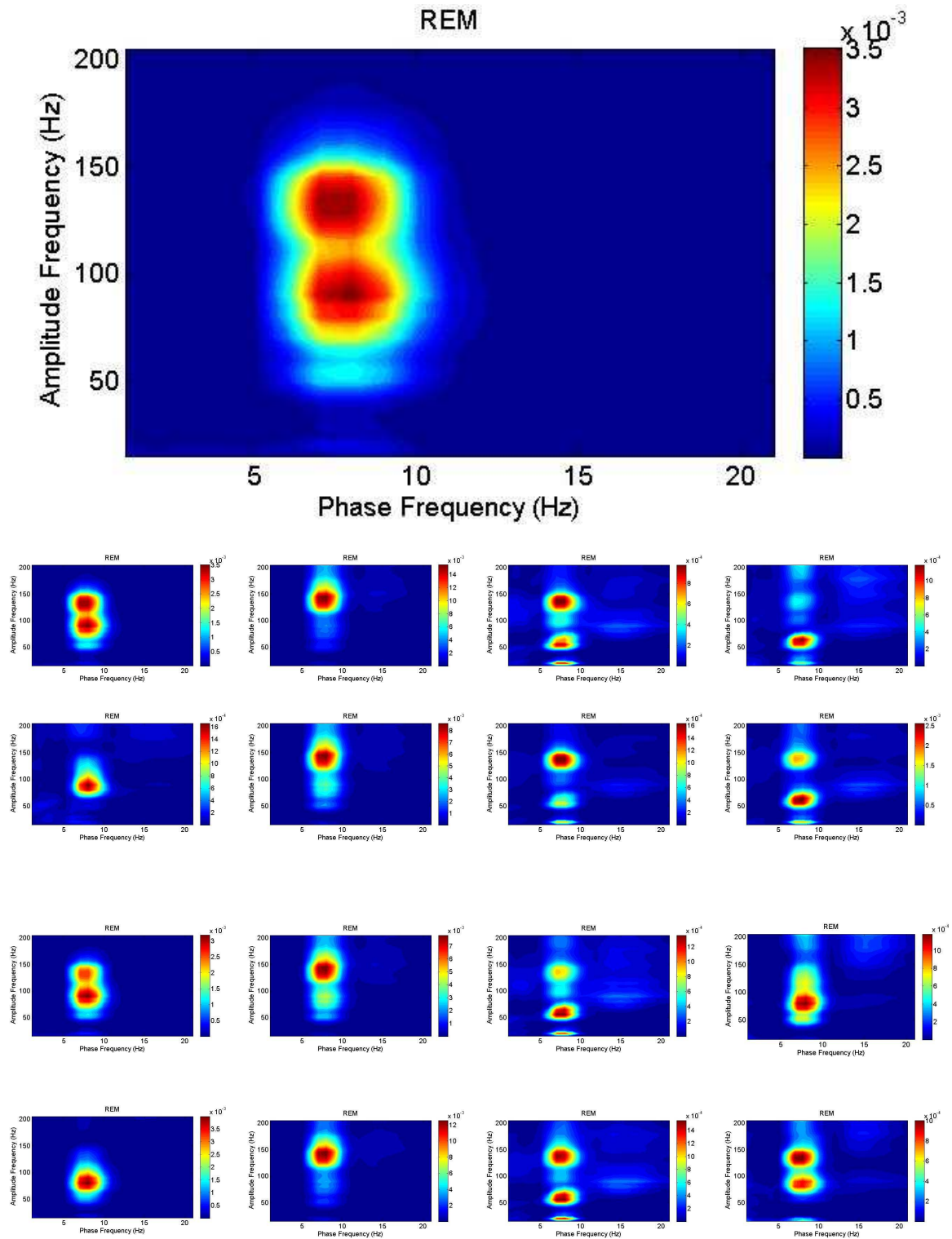


Figura 29. Comodulação durante o sono REM basal. Figura representativa de um dos 16 canais (parte superior).

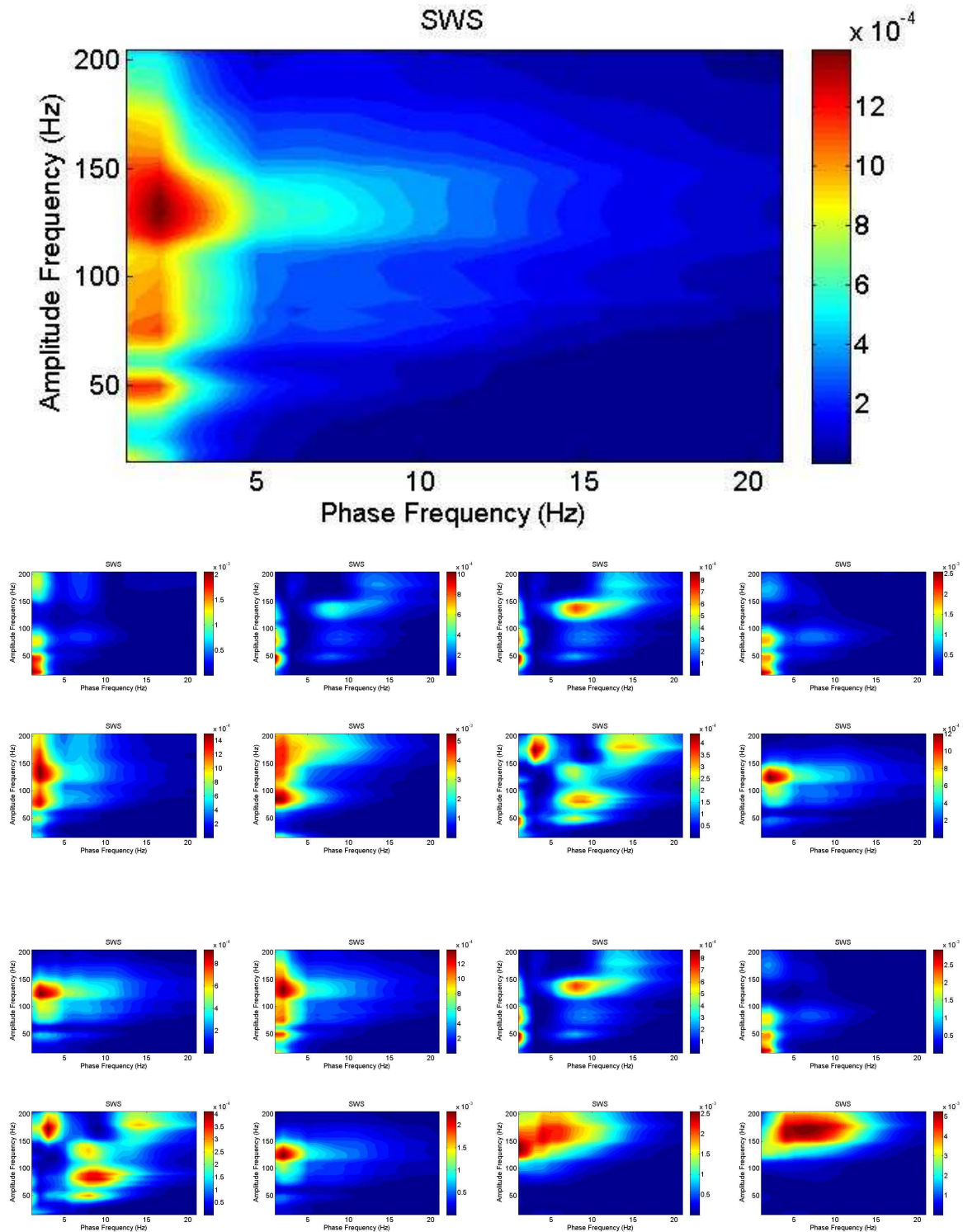


Figura 30. Comodulação durante o sono de ondas lentas basal. Figura representativa de um dos 16 canais (parte superior).

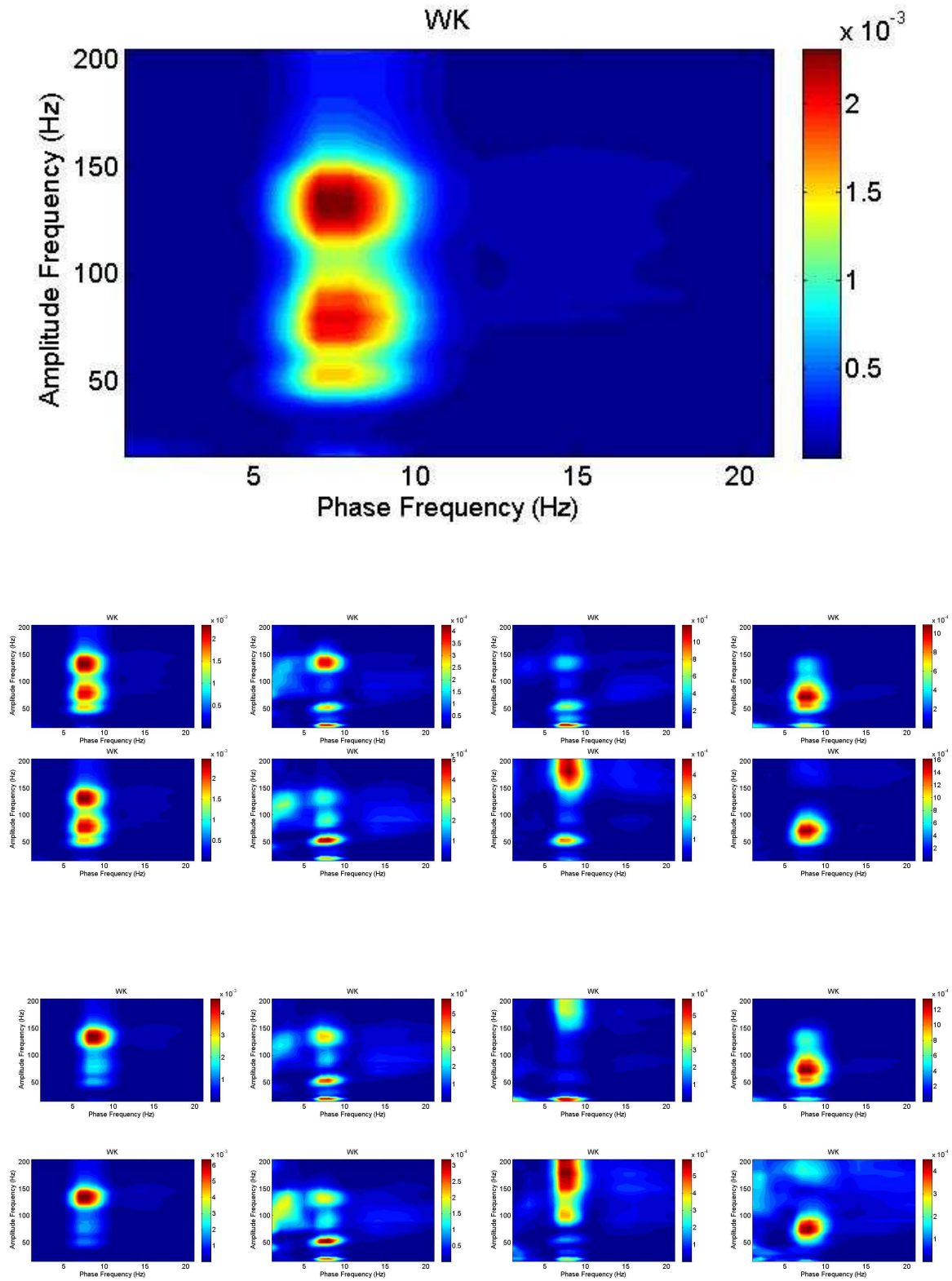


Figura 31. Comodulação durante a vigília basal. Figura representativa de um dos 16 canais (parte superior).

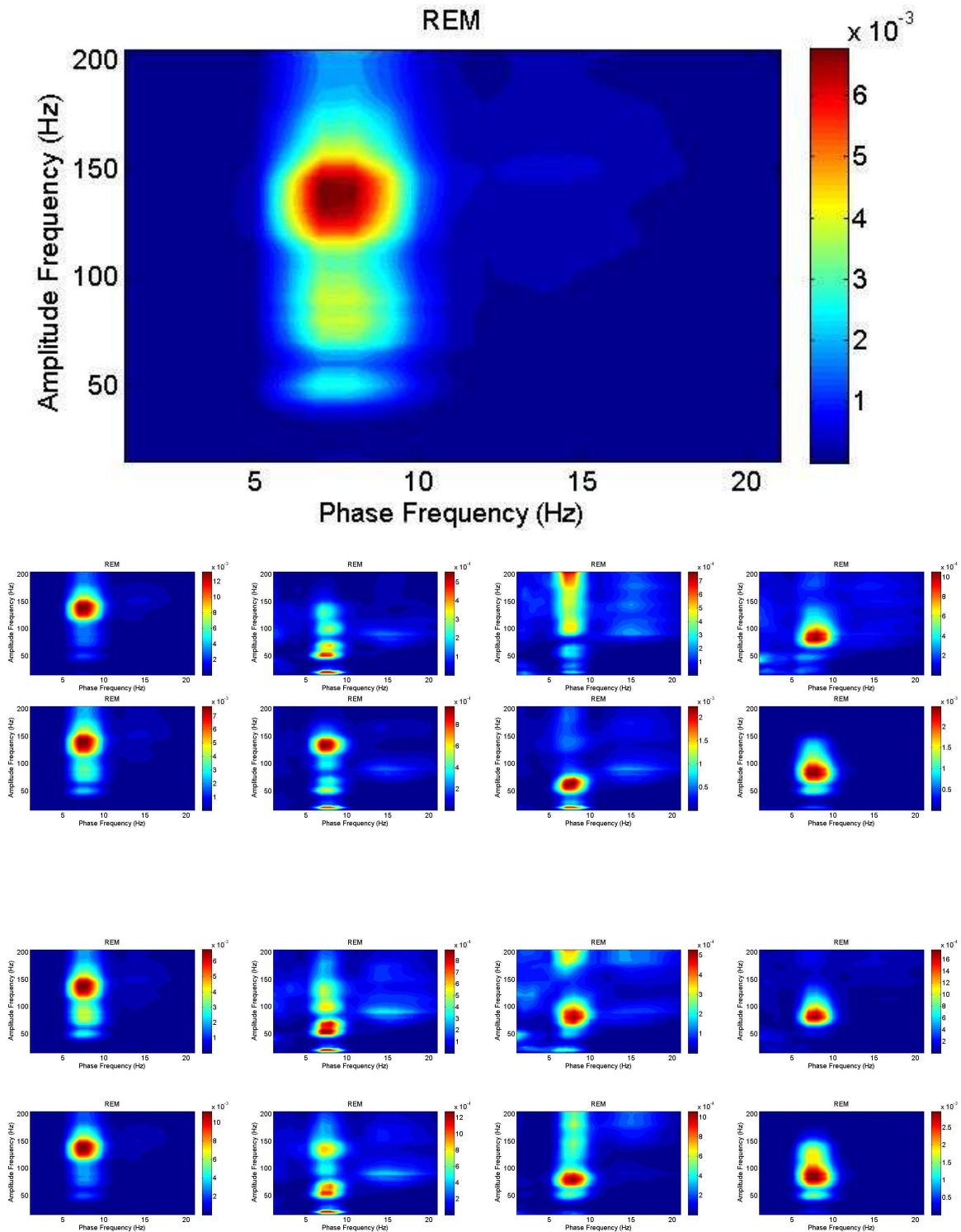


Figura 32. Comodulação durante o sono REM da consolidação. Figura representativa de um dos 16 canais (parte superior).

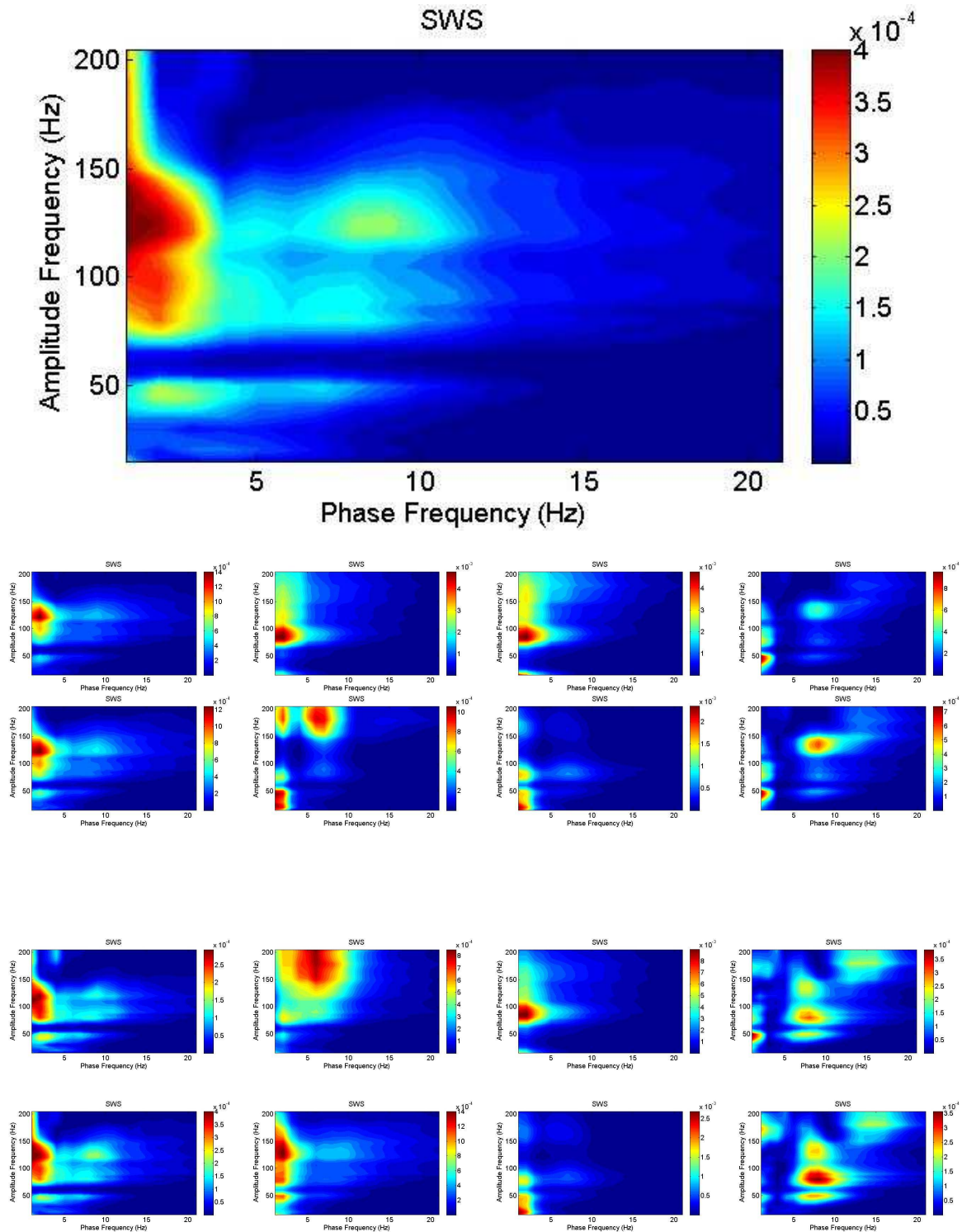


Figura 33. Comodulação durante o sono de ondas lentas da consolidação. Figura representativa de um dos 16 canais (parte superior).

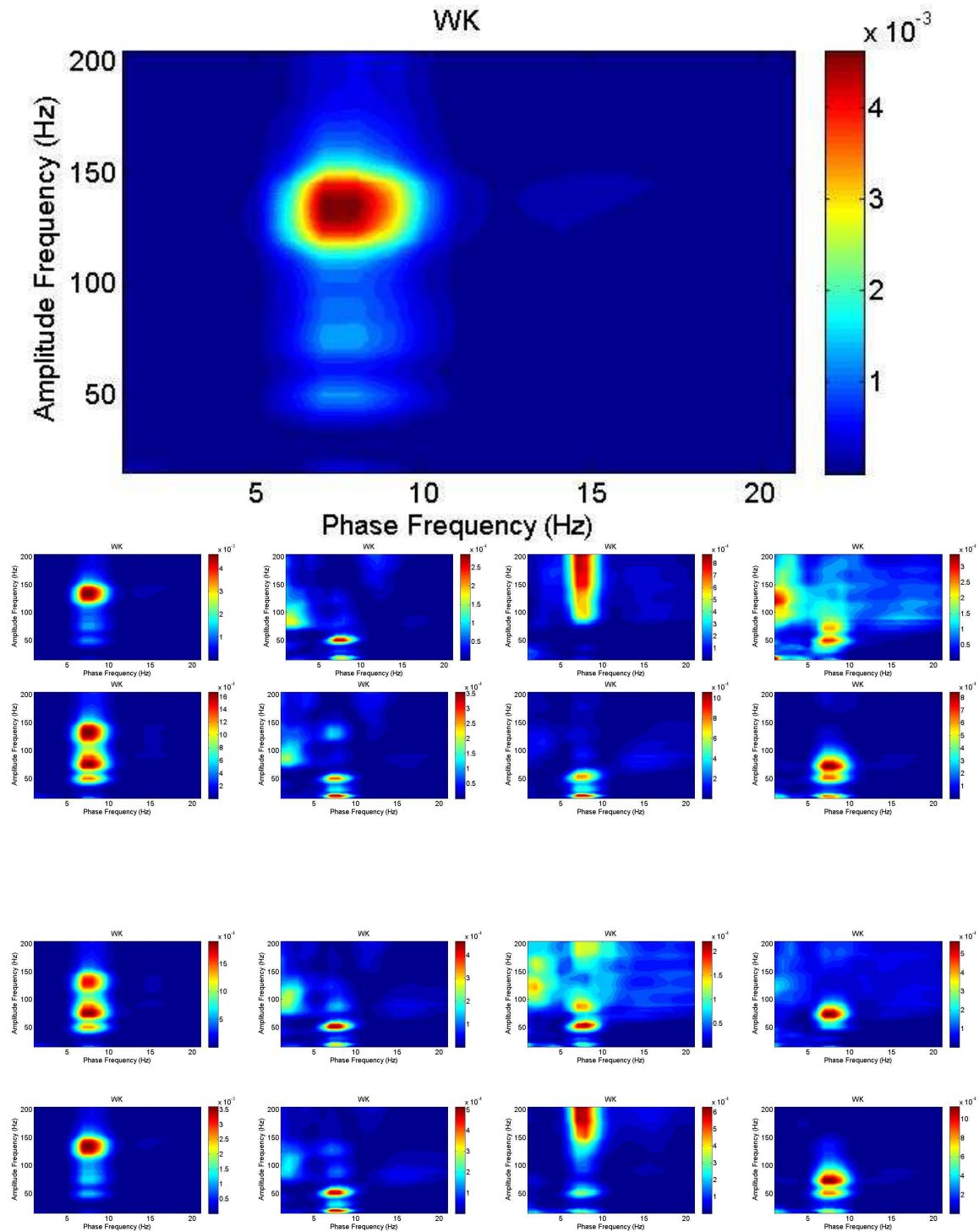


Figura 34. Comodulação durante a vigília da consolidação. Figura representativa de um dos 16 canais (parte superior).

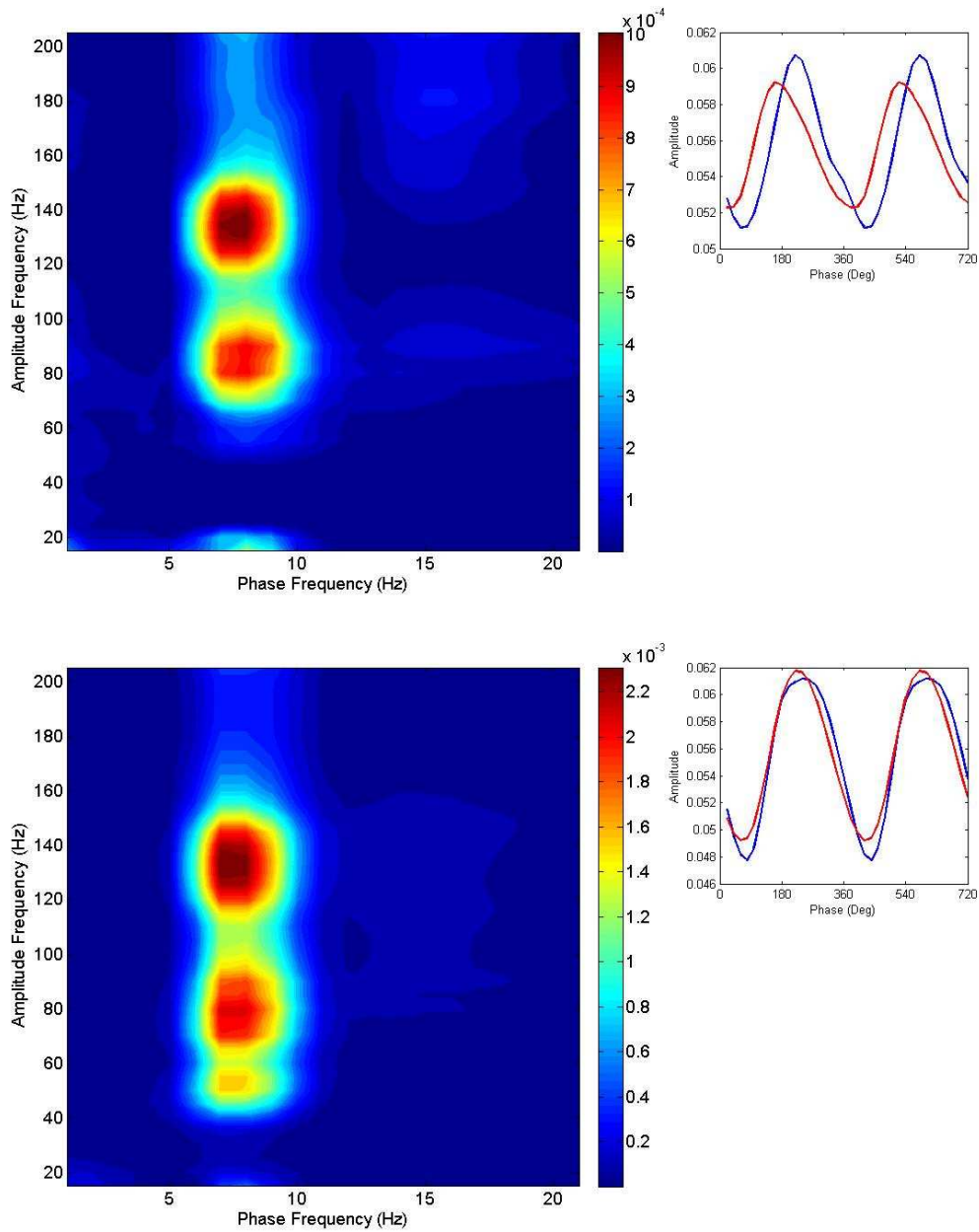


Figura 35. Modulação diferencial das amplitudes das ondas de alta frequência pela fase de teta (acima, sono REM; abaixo, vigília). À esquerda estão representados os comodulogramas obtidos durante a exploração do campo aberto (basal). À direita está a modulação diferencial da

amplitude das duas ilhas de modulação vistas nos comodulogramas pelas fases de teta (dois ciclos de 360°).

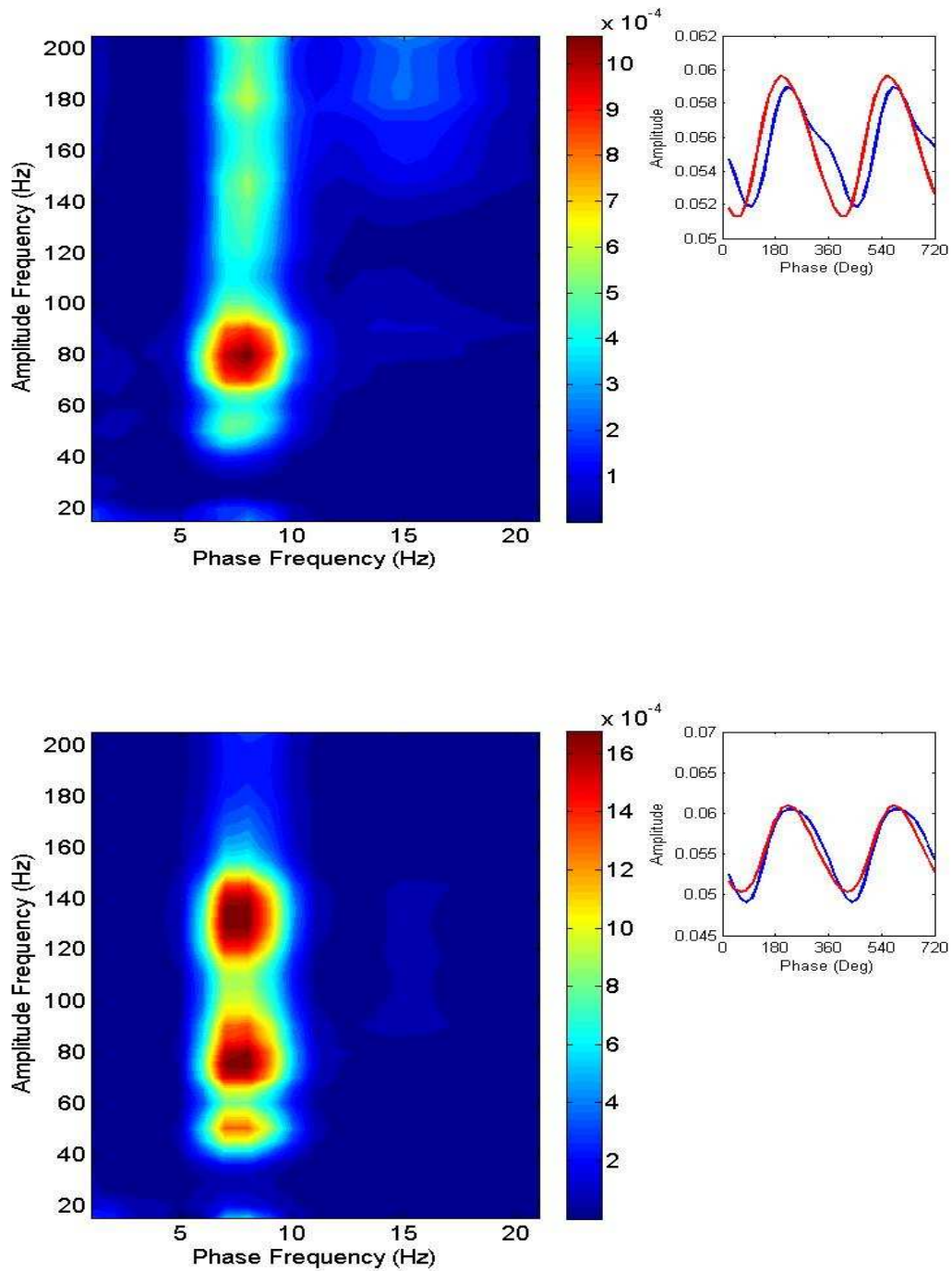


Figura 36. Modulação diferencial das amplitudes das ondas de alta frequência pela fase de teta (acima, sono REM; abaixo, vigília). À esquerda estão representados os comodulogramas obtidos

durante o período de consolidação. À direita está a modulação diferencial da amplitude das duas ilhas de modulação vistas nos comodulogramas pelas fases de teta (dois ciclos de 360°).

DISCUSSÃO

Nossos achados na área de eletrofisiologia incluem dois momentos no processamento cognitivo, a exploração e habituação de um campo aberto por 3 horas (período basal) e a consolidação de uma memória emocional aversiva (período de consolidação) e trabalham com dois tipos de eventos eletrofisiológicos:

- 1) Ondulações de alta frequência associadas às ondas agudas (complexo *Sharp wave – ripple*);
- 2) Acoplamentos modulatórios de frequências cruzadas: possibilidade de modulação diferencial da fase das ondas lentas (como delta e teta) pelas ondas rápidas (*ripples*, gama baixa, gama alta e HFO).

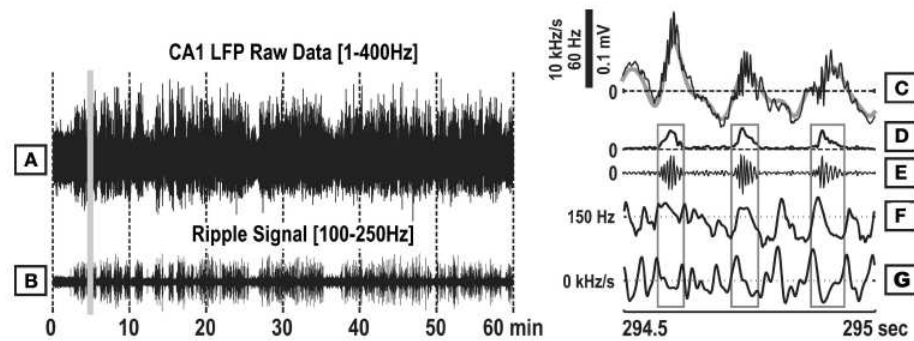


Figura 37. Ilustração do processamento de sinal usado para detecção de *ripples*. A. Sinal cru de PCL na área CA1 do hipocampo. B. Filtragem do sinal cru entre 100-250 Hz para detectar ondas rápidas. C. Ondas agudas (*Sharp waves*) retiradas do sinal cru. D. Envelope de amplitude do sinal filtrado para *ripple* (E). Estimativas de frequência instantânea (F) e de modulações (G). Retirado de Nguyen *et al.* (2009).

Nossos resultados, com base em características eletrofisiológicas de CA1, demonstram que (1) existem acoplamentos entre ondas cerebrais na área CA1 do hipocampo, seja na exploração de um campo aberto, seja no pós-processamento mnemônico de uma memória aversiva/emocional (Figuras 29 – 34); (2) estes acoplamentos têm características e/ou intensidades diferentes nos diferentes estágios do ciclo sono-vigília; (3) além da clássica modulação da onda gama, a onda teta modula também outras frequências mais rápidas (as chamadas HFO), somente descritas em Tort *et al.* (2008); (4) as amplitudes das ondas HFO e gama são moduladas por diferentes fases da onda teta (Figuras 35 e 36); (5) a fase da onda delta também modula a amplitude das ondas *ripples* durante o sono de ondas lentas; (6) há um aumento durante o período de consolidação da potência das ondas delta e *ripples* (Figura 26 - 28).

As oscilações neurais, traduzidas como mudanças na voltagem ao nível mesoscópico, são um fenômeno generalizado no encéfalo (Young & Eggermont, 2009). Durante comportamentos ativos exploratórios e o sono REM há uma atividade hipocampal rítmica lenta muito proeminente e característica chamada de ritmo teta, cuja banda de frequência está entre 4 – 12 Hz (Buzsáki *et al.*, 2003; Buzsáki, 1989, 1998), e se propaga ao longo do eixo septotemporal do hipocampo (Lubenov & Siapas, 2009). A aparição de teta no hipocampo está associada a eventos de navegação espacial, explicada pela precessão de fase (Buzsáki, 2001) e repetição de padrões de memória remota durante a vigília (Karlsson & Frank, 2009), bem como à memória (Jensen & Lisman, 1996) e ao sono (Fogel *et al.*, 2009), evidenciado pelos estudos de repetições durante o sono REM de padrões neuronais codificados durante a vigília (Hasselmo, 2008). Além disso, as ondas teta (neste caso são as ondas do *stratum lacunosum-moleculare* da área CA1) são capazes de separar de maneira fásica eventos de codificação (no vale) e evocação (no pico) de memórias (Figura 38; Hasselmo *et al.*, 2002a, 2002b; Hasselmo, 2005). Juntamente com teta aparecem as oscilações gama (30 – 100 Hz), moduláveis por teta e coerentes ao longo do eixo longitudinal do hipocampo (Bragin *et al.*, 2005). Tais ondas ocorrem após a ativação sincronizada de células piramidais que, por entrada convergente, ativava redes inibitórias de retroalimentação negativa. Isso assegura que os disparos das células piramidais limitem-se a uma pequena janela temporal (Bartos *et al.*, 2002). O papel das ondas gama está associado à ligação sensorial através de tamponamento da memória de trabalho que, subsequente, será codificada em memória de longa duração (Jensen & Lisman, 1996), atenção seletiva, formação de assembléias neuronais transientes, armazenamento e transmissão de informações (Buzsáki *et al.*, 2003), eficácia na completção de padrões nos ciclos recorrentes da área CA3 (Almeida *et al.*, 2007) e coordenação por acoplamento entre a atividade de CA3 e CA1 durante a evocação (Montgomery & Buzsáki,

2007). Uma das possíveis interações entre as duas oscilações (teta-gama) é explicada pelo modelo *Código de Fase Discreta Teta-Gama* (Figuras 38 e 39), o qual baseia-se num código de populações de neurônios, leva em consideração tanto as oscilações mesoscópicas como os disparos neuronais e é útil para descrever a representação e evocação de memórias de seqüências de itens (Lisman & Buzsáki, 2008). Note que, na assembléia de 12 neurônios exemplificada, se a relação fosse linear, um neurônio para uma memória, haveria uma limitação de 12 padrões; como trata-se de um código populacional, a combinação de atividade entre esses 12 neurônios é capaz de gerar um código mais robusto e com inúmeras possibilidades, incapaz de saturar a rede com acúmulo de informações.

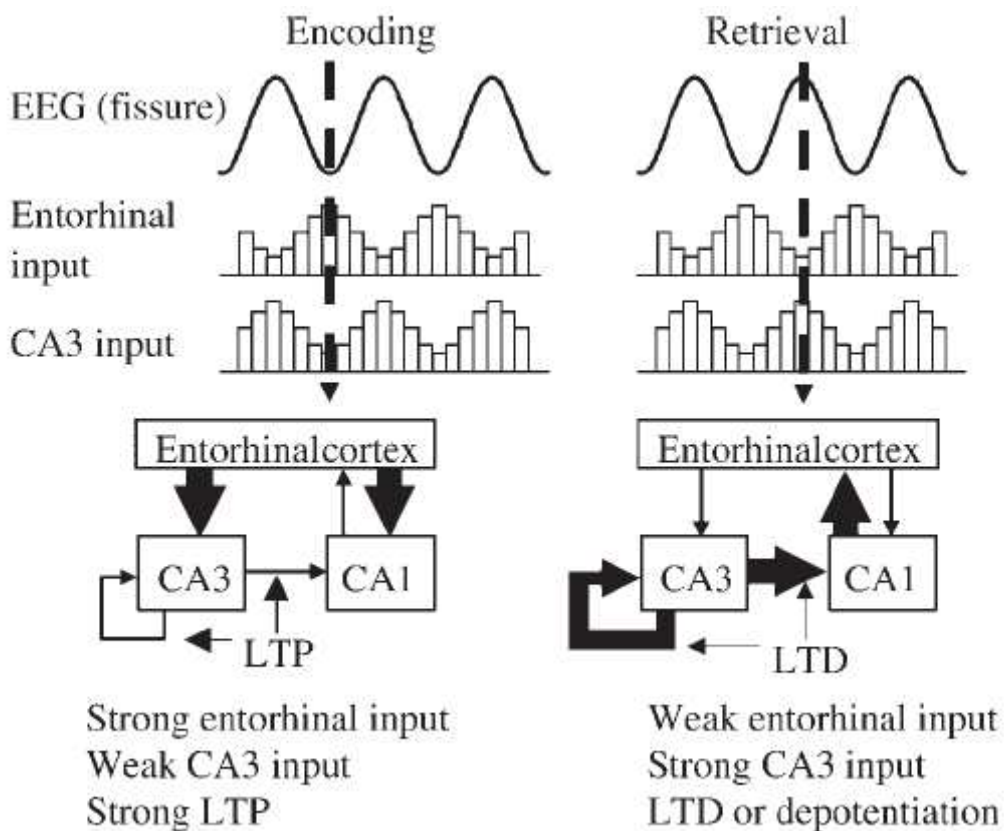


Figura 38. Separação de mecanismos de armazenamento e evocação durante o ciclo do ritmo teta. Retirado de Hasselmo (2005).

As SPW estão correlacionadas com um aumento na taxa de disparos de todos os tipos de neurônios. Hipotetiza-se que as SPW são um reflexo dos potenciais extracelulares somados como resultado da intensa ativação de células piramidais e conseqüente aumento dos disparos dos interneurônios e células granulares. Sua geração é interna e se dá por uma rajada da população da área CA3a-b, a qual age como um marcapasso, produzindo as SPW, atinge quase que unilateralmente a área CA3c e espalha a atividade para CA1 (Csicsvari *et al.*, 2000). A geração se dá por enfraquecimento ou inibição da atividade aferente extrahipocampal, normalmente ocorrendo em imobilidade, comportamento consumatório e sono de ondas lentas (Buzsáki, 1986). Essa descarga pré-sináptica coerente dentro de uma janela temporal de cerca de 5 ms é um evento significativo no encéfalo capaz de induzir modificações plásticas pós-sinápticas do tipo *hebbiana* (PDL, King *et al.*, 1999). Protocolos de estimulação tetânica de alta freqüência que levam à produção de PDL também são capazes de gerar SPW-R (Behrens *et al.*, 2005). Em conjunto com esse evento de descarga em massa em CA3, a área CA1 responde com uma oscilação de alta freqüência, chamada de *ripples* ou ondulações rápidas (Buzsáki *et al.*, 1992; Nakashiba *et al.*, 2009). Os resultados do projeto demonstram que, na segunda hora pós-aprendizado, há um aumento no potência da faixa de *ripples* (100 – 200 Hz), com dois picos principais: 120,5 Hz e 177 Hz, o que está de acordo com resultados da literatura. Memórias associativas são capazes de induzir, durante a consolidação, um aumento na ocorrência de complexos SPW-R na primeira hora pós-aprendizado, aumentos na duração e magnitude de eventos de *ripples* até 2 horas pós-

aprendizado, aumento na densidade (ocorrências) de *ripples* por um período mais curto, de 30 minutos (Eschenko *et al.*, 2008) e mudanças de frequências dominantes dentro do espectro das *ripples* (Ponomarenko *et al.*, 2008). A supressão seletiva da ocorrência das ondulações de alta frequência no hipocampo leva a déficit de memória espacial (Girardeau *et al.*, 2009). Registros de correntes de membrana das células piramidais de CA1 não explicam o evento por inteiro, sendo necessários eventos de rede de interneurônios inibitórios. A somação das PIPSS desencadeadas pelos disparos de alta frequência dos interneurônios será capaz de introduzir uma janela temporal na fase de decaimento das PIPS nos neurônios de CA1. Aqueles neurônios que conseguirem sincronizar seus disparos numa janela temporal precisa, poderão exercer uma forte influência nos seus alvos retrohipocampais (Ylinen *et al.*, 1995). Uma visão alternativa é que a inibição, ao invés de sincronizar positivamente os neurônios da rede, seria capaz de suprimir a atividade daqueles neurônios que não participam dela, aumentando a razão sinal/ruído (Nimmrich *et al.*, 2005); as duas hipóteses, sinteticamente, podem atuar em conjunto sinérgico (Maier *et al.*, 2003). O chamado complexo SPW-R (*Sharp wave – ripple*), por esse *modus operandi*, também é capaz de induzir as ondulações de alta frequência no córtex entorhinal de modo que todo o eixo CA3-CA1-retrohipocampal fica conectado e sincronizado, ou seja, esses neurônios esparsamente distribuídos no espaço anatômico se integram temporalmente (Chrobak & Buzsáki, 1996). Deste modo, esse eixo será capaz de induzir modificações plásticas extrahipocampais, uma hipótese de como ocorre a transmissão das memórias durante a consolidação para regiões neocorticais permanentes. Dado a alta taxa de SPW-R durante o sono de ondas lentas, a ocorrência de repetições de padrões de disparo comprimidas temporalmente durante esses eventos de SPW-R (Nádasdy *et al.*, 1999) e a indução de estados ativados neocorticais (*up-states*) pelos complexos

SPW-R (Battaglia *et al.*, 2004), deduz-se que o sono também tem um papel importante para a consolidação sistêmica de memórias.

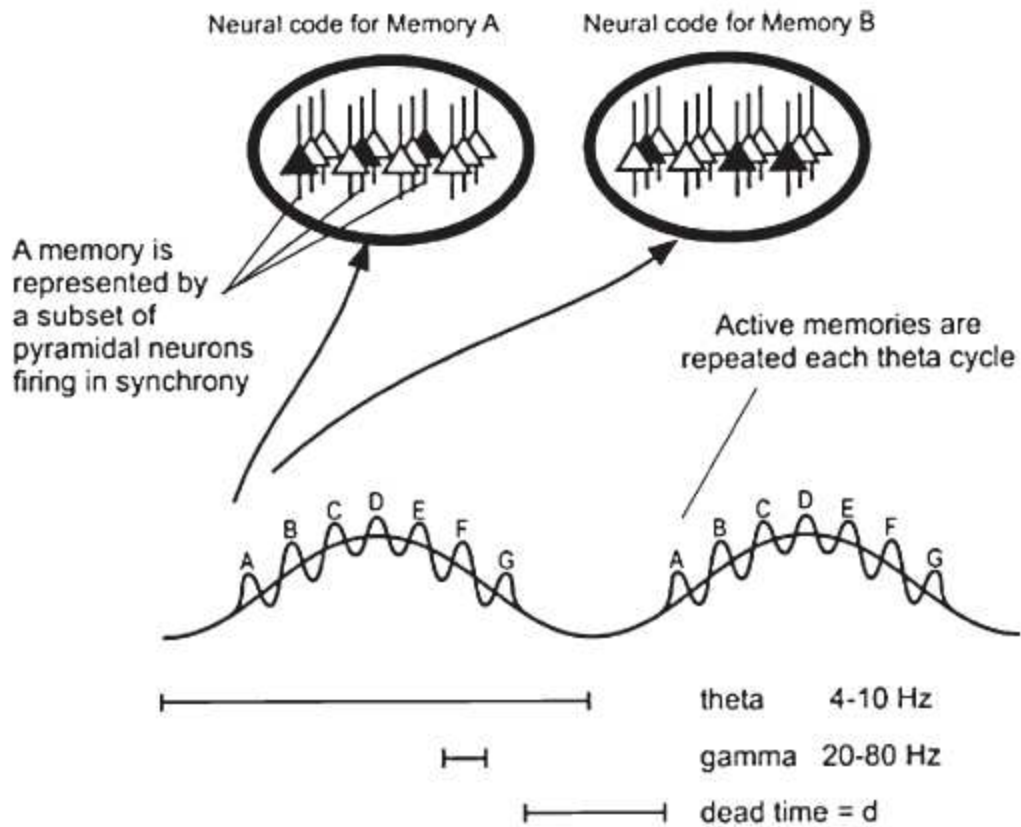


Figura 39. Código de Fase Discreta Teta-Gama. Cada ciclo Teta contém 7 ciclos de Gama, cada qual representado por um padrão de atividade sincrônica de alguns neurônios dentro de uma assembléia neuronal. Note a modulação da fase de teta/ amplitude de gama. Retirado de Lisman & Buzsáki (2008).

Os resultados do presente projeto estão de acordo com o modelo de dois estágios (tanto para vigília como para o sono) e propõe que a consolidação de memória envolva dois passos importantes:

- 1) Forma lábil do traço de memória: exploração ativa (aquisição ou armazenamento, período de aprendizado). Neste período, as células piramidais da região CA3 do hipocampo (região que é o centro de processamento do hipocampo) recebem convergência excitatória de células granulares quando há o comportamento associado ao complexo teta – gama, levando a uma fraca e transiente potenciação heterosináptica das células de CA3. É um estado sujeito a influências subcorticais.
- 2) Forma duradoura do traço de memória: modificação de longa duração da eficácia sináptica é feita pelo complexo de ondas agudas geradas pelo disparo conjunto e coordenado de populações de neurônios de CA3 e as oscilações rápidas associadas (*ripples*).

O sono tem papel importante também. Como visto, durante o sono de ondas lentas há maior ocorrência do complexo ondas agudas – oscilações rápidas após o aprendizado, envolvido no diálogo hipocampo/neocórtex; no sono de movimentos rápidos dos olhos (REM), por outro lado, ocorre o complexo teta-gama, usado como uma forma de reativar padrões estabelecidos durante a vigília. Há a ocorrência também de uma modulação diferencial das fases de teta para gama alta e HFO durante o sono REM, mas não durante a vigília durante a exploração do campo aberto. Durante o período de consolidação, a ilha de modulação de HFO durante o sono REM desaparece, apenas permanecendo na vigília. Ademais, durante o sono REM há um diálogo intenso e inverso, neocortical/hipocampo, o que pode rearranjar a circuitaria da área CA3

reativando memórias neocorticais (remotas) e colocando-as num contexto mais recente. Esses novos pesos sinápticos sobre as colaterais recorrentes de CA3 que o sono REM é capaz de estabelecer serão determinantes no ciclo subsequente, o sono de ondas lentas. Deste modo o sono REM age atualizando a conectividade de CA3, carregando-a de informações associativas, as quais serão novamente consolidadas durante o ciclo vindouro de sono de ondas lentas (Buzsáki, 1998). Os achados de acoplamento de frequência cruzada, respeitando a hierarquia de fases de ondas lentas (teta e delta) modulando amplitudes de ondas rápidas (gama baixa, gama alta, HFO e *ripple*), podem ser vistos como um mecanismo de potencialização deste fenômeno. Tort *et al.* (2008) demonstram que em tarefas de memória seqüencial, a organização e manutenção da memória de trabalho (memória no seu estado ativo e vivo, como esforço para manter itens ou números no pensamento por um tempo curto) são feitas em boa parte pelo acoplamento teta-gama. Ademais, a força desses acoplamentos de frequência cruzada muda dinamicamente e diferencialmente durante diferentes momentos da performance comportamental, como quando o animal precisa decidir ou agir. Assim, maiores demandas de processamento cognitivo/mnemônico podem requerer um sistema mais eficiente de transferência de informações, estruturando padrões de atividade temporal de modo a otimizar os estágios de “carregamento” (REM) e “consolidação” (sono de ondas lentas), do mesmo modo que se operam no processamento sensorial (Lakatos *et al.*, 2005). No âmbito celular, o mecanismo subjacente poderia ser um reforço da precisão da coordenação temporal dentro um ciclo teta lento por um ciclo mais rápido, sincronizado com hiperpolarizações do potencial de membrana (Schaefer *et al.* 2006).

Oscilações de redes e sincronia neural criam um mecanismo plausível para o armazenamento, leitura e transferência de informações entre estruturas. Oscilações impõem uma estrutura espaço-temporal na atividade de assembléias neuronais de diferentes estruturas. Ativação sincrônica de neurônios por oscilações rápidas e locais pode facilitar a ativação de assembléias de neurônios e plasticidade sináptica, enquanto que a somação temporal de eventos locais pode ser coordenada pelas oscilações mais lentas. Os fatores chave neste processo são as velocidades limitadas de condução pelos axônios e atrasos na transmissão de disparos (ou seja, o tempo necessário para que a chegada da descarga pré-sináptica ative a célula pós-sináptica). O recrutamento de neurônios é geralmente limitado a um único ciclo porque a distribuição de atividade é tanto terminada ou restringida pela inibição. Portanto, durante um ciclo de oscilação rápida, apenas poucos neurônios são recrutados; o ciclo de oscilação lenta, por outro lado, permite o recrutamento de neurônios em um espaço neuronal maior e, portanto, organiza temporalmente os eventos ao longo das estruturas. Pelo mesmo motivo, também são as oscilações lentas que modulam a potência dos eventos oscilatórios rápidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrari, K, A Rashidy-Pour, S Semnanian, e Y Fathollahi. 2008. Administration of corticosterone after memory reactivation disrupts subsequent retrieval of a contextual conditioned fear memory: dependence upon training intensity. *Neurobiology of Learning and Memory* 89, no. 2 (Fevereiro): 178-184. doi:10.1016/j.nlm.2007.07.005.
- Ahmed, Omar J, e Mayank R Mehta. 2009. The hippocampal rate code: anatomy, physiology and theory. *Trends in Neurosciences* 32, no. 6 (Junho): 329-338. doi:10.1016/j.tins.2009.01.009.
- Alberini, C M, M H Milekic, e S Tronel. 2006. Mechanisms of memory stabilization and destabilization. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 63, no. 9 (Maio): 999-1008. doi:10.1007/s00018-006-6025-7.
- Alberini, C. 2007. Reconsolidation: the samsara of memory consolidation. *Debates in Neuroscience*, Vol. 1, No. 1. (1 March), pp. 17-24.
- Alberini, Cristina M. 2008. The role of protein synthesis during the labile phases of memory: revisiting the skepticism. *Neurobiology of Learning and Memory* 89, no. 3 (Março): 234-246. doi:10.1016/j.nlm.2007.08.007.
- Amaral, Olavo B, Tatiana Luft, Martín Cammarota, Ivan Izquierdo, e Rafael Roesler. 2007. Temporary inactivation of the dorsal hippocampus induces a transient impairment in retrieval of aversive

memory. *Behavioural Brain Research* 180, no. 2 (Junho 18): 113-118.
doi:10.1016/j.bbr.2007.02.031.

American Psychiatric Association. 2000. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders DSM-IV-TR Fourth Edition (Text Revision). *American Psychiatric Publishing, Inc.*; 4th edition.

Bak, Tang, e Wiesenfeld. 1987. Self-organized criticality: An explanation of the 1/f noise. *Physical Review Letters* 59, no. 4 (Julho 27): 381-384.

Barros, D M, L A Izquierdo, J Quevedo, C Rodrigues, M Madruga, J H Medina, e I Izquierdo. 1998. Interaction between midazolam-induced anterograde amnesia and memory enhancement by treatments given hours later in hippocampus, entorhinal cortex or posterior parietal cortex. *Behavioural Pharmacology* 9, no. 2 (Março): 163-167.

Bartos, Marlene, Imre Vida, Michael Frotscher, Axel Meyer, Hannah Monyer, Jorg R P Geiger, e Peter Jonas. 2002. Fast synaptic inhibition promotes synchronized gamma oscillations in hippocampal interneuron networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, no. 20 (Outubro 1): 13222-13227. doi:10.1073/pnas.192233099.

Battaglia, Francesco P, Gary R Sutherland, e Bruce L McNaughton. 2004. Hippocampal sharp wave bursts coincide with neocortical "up-state" transitions. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 11, no. 6 (Dezembro): 697-704. doi:10.1101/lm.73504.

Bear, MF, Connors, BW e Paradiso, MA. 2002. Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso. PA: *Artmed Editora*.

Behrens, Christoph J, Leander P van den Boom, Livia de Hoz, Alon Friedman, e Uwe Heinemann. 2005. Induction of sharp wave-ripple complexes in vitro and reorganization of hippocampal networks. *Nature Neuroscience* 8, no. 11 (Novembro): 1560-1567. doi:10.1038/nn1571.

- Bekinschtein, Pedro, Cynthia Katche, Leandro N Slipczuk, Lionel Müller Igaz, Martín Cammarota, Iván Izquierdo, e Jorge H Medina. 2007. mTOR signaling in the hippocampus is necessary for memory formation. *Neurobiology of Learning and Memory* 87, no. 2 (Fevereiro): 303-307. doi:10.1016/j.nlm.2006.08.007.
- Bekinschtein, Pedro, Martín Cammarota, Iván Izquierdo, e Jorge H Medina. 2008. BDNF and memory formation and storage. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry* 14, no. 2 (Abril): 147-156. doi:10.1177/1073858407305850.
- Ben Mamou, Cyrinne, Karine Gamache, e Karim Nader. 2006. NMDA receptors are critical for unleashing consolidated auditory fear memories. *Nature Neuroscience* 9, no. 10 (Outubro): 1237-1239. doi:10.1038/nn1778.
- Bernabeu, R, L Bevilaqua, P Ardenghi, E Bromberg, P Schmitz, M Bianchin, I Izquierdo, e J H Medina. 1997. Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, no. 13 (Junho 24): 7041-7046.
- Biedenkapp, Joseph C, e Jerry W Rudy. 2004. Context memories and reactivation: constraints on the reconsolidation hypothesis. *Behavioral Neuroscience* 118, no. 5 (Outubro): 956-964. doi:10.1037/0735-7044.118.5.956.
- Bliss, T V, e G L Collingridge. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, no. 6407 (Janeiro 7): 31-39. doi:10.1038/361031a0.
- Boccia, M M, G B Acosta, M G Blake, e C M Baratti. 2004. Memory consolidation and reconsolidation of an inhibitory avoidance response in mice: effects of i.c.v. injections of hemicholinium-3. *Neuroscience* 124, no. 4: 735-741. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.01.001.

- Bontempi, B, C Laurent-Demir, C Destrade, e R Jaffard. 1999. Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. *Nature* 400, no. 6745 (Agosto 12): 671-675. doi:10.1038/23270.
- Borchard, U. 1990. Pharmacokinetics of beta-adrenoceptor blocking agents: clinical significance of hepatic and/or renal clearance. *Clinical Physiology and Biochemistry* 8 Suppl 2: 28-34.
- Bragin, A, G Jandó, Z Nádasdy, J Hetke, K Wise, e G Buzsáki. 1995. Gama (40-100 Hz) oscillation in the hippocampus of the behaving rat. *The Journal of Neuroscience*, no. 1 Pt 1 (Janeiro): 47-60.
- Bruer, John T. 2006. Points of view: on the implications of neuroscience research for science teaching and learning: are there any? A skeptical theme and variations: the primacy of psychology in the science of learning. *CBE Life Sciences Education* 5, no. 2: 104-110. doi:10.1187/cbe.06-03-0153.
- Bustos, S G, H Maldonado, e V A Molina. 2006. Midazolam disrupts fear memory reconsolidation. *Neuroscience* 139, no. 3: 831-842. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.12.064.
- Bustos, Silvia G, Héctor Maldonado, e Víctor A Molina. 2009. Disruptive effect of midazolam on fear memory reconsolidation: decisive influence of reactivation time span and memory age. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 34, no. 2 (Janeiro): 446-457. doi:10.1038/npp.2008.75.
- Buzsáki, G. 1986. Hippocampal sharp waves: their origin and significance. *Brain Research* 398, no. 2 (Novembro 29): 242-252.
- Buzsáki, G. 1989. Two-stage model of memory trace formation: a role for "noisy" brain states. *Neuroscience* 31, no. 3: 551-570.
- Buzsáki, G, Z Horváth, R Urioste, J Hetke, e K Wise. 1992. High-frequency network oscillation in the hippocampus. *Science (New York, N.Y.)* 256, no. 5059 (Maio 15): 1025-1027.

- Buzsáki, G. 1998. Memory consolidation during sleep: a neurophysiological perspective. *Journal of Sleep Research* 7 Suppl 1: 17-23.
- Buzsáki, G. 2001. Hippocampal GABAergic interneurons: a physiological perspective. *Neurochemical Research* 26, no. 8-9 (Setembro): 899-905.
- Buzsáki, G. 2002. Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron* 33, no. 3 (Janeiro 31): 325-340.
- Buzsáki, G, D L Buhl, K D Harris, J Csicsvari, B Czéh, e A Morozov. 2003. Hippocampal network patterns of activity in the mouse. *Neuroscience* 116, no. 1: 201-211.
- Buzsáki, G. 2006. Rhythms of the Brain. *Oxford Univ Press*, Oxford.
- Cammarota, Martín, Lia R M Bevilaqua, Jorge H Medina, e Iván Izquierdo. 2004. Retrieval does not induce reconsolidation of inhibitory avoidance memory. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 11, no. 5 (Outubro): 572-578. doi:10.1101/lm.76804.
- Campbell, I G, M J Guinan, e J M Horowitz. 2002. Sleep deprivation impairs long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Journal of Neurophysiology* 88, no. 2 (Agosto): 1073-1076.
- Carbó Tano, M, V A Molina, H Maldonado, e M E Pedreira. 2009. Memory consolidation and reconsolidation in an invertebrate model: the role of the GABAergic system. *Neuroscience* 158, no. 2 (Janeiro 23): 387-401. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.10.039.
- Chrobak, J J, e G Buzsáki. 1996. High-frequency oscillations in the output networks of the hippocampal-entorhinal axis of the freely behaving rat. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 16, no. 9 (Maio 1): 3056-3066.
- Clark, R E, e L R Squire. 1998. Classical conditioning and brain systems: the role of awareness. *Science (New York, N.Y.)* 280, no. 5360 (Abril 3): 77-81.
- Clark, Robert E, Nicola J Broadbent, Stuart M Zola, e Larry R Squire. 2002. Anterograde amnesia and temporally graded retrograde amnesia for a nonspatial memory task after lesions of hippocampus

and subiculum. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 22, no. 11 (Junho 1): 4663-4669. doi:20026407.

Clement, J Q, e M F Wilkinson. 2000. Rapid induction of nuclear transcripts and inhibition of intron decay in response to the polymerase II inhibitor DRB. *Journal of Molecular Biology* 299, no. 5 (Junho 23): 1179-1191. doi:10.1006/jmbi.2000.3745.

Csicsvari, J, H Hirase, A Mamiya, e G Buzsáki. 2000. Ensemble patterns of hippocampal CA3-CA1 neurons during sharp wave-associated population events. *Neuron* 28, no. 2 (Novembro): 585-594.

Davis, Christopher J, Joseph W Harding, e John W Wright. 2003. REM sleep deprivation-induced deficits in the latency-to-peak induction and maintenance of long-term potentiation within the CA1 region of the hippocampus. *Brain Research* 973, no. 2 (Maio 30): 293-297.

Davis, H P, e L R Squire. 1984. Protein synthesis and memory: a review. *Psychological Bulletin* 96, no. 3 (Novembro): 518-559.

de Oliveira Alvares, L, B Pasqualini Genro, F Diehl, V A Molina, e J A Quillfeldt. 2008. Opposite action of hippocampal CB1 receptors in memory reconsolidation and extinction. *Neuroscience* 154, no. 4 (Julho 17): 1648-1655. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.05.005.

de Quervain, Dominique J-F, e Jürgen Margraf. 2008. Glucocorticoids for the treatment of post-traumatic stress disorder and phobias: a novel therapeutic approach. *European Journal of Pharmacology* 583, no. 2-3 (Abril 7): 365-371. doi:10.1016/j.ejphar.2007.11.068.

Debiec, Jacek, Joseph E LeDoux, e Karim Nader. 2002. Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. *Neuron* 36, no. 3 (Outubro 24): 527-538.

- Depue, Brendan E, Tim Curran, e Marie T Banich. 2007. Prefrontal regions orchestrate suppression of emotional memories via a two-phase process. *Science (New York, N.Y.)* 317, no. 5835 (Julho 13): 215-219. doi:10.1126/science.1139560.
- Diergaarde, Leontien, Anton N M Schoffelmeer, e Taco J De Vries. 2006. Beta-adrenoceptor mediated inhibition of long-term reward-related memory reconsolidation. *Behavioural Brain Research* 170, no. 2 (Junho 30): 333-336. doi:10.1016/j.bbr.2006.02.014.
- Diergaarde, Leontien, Anton N M Schoffelmeer, e Taco J De Vries. 2008. Pharmacological manipulation of memory reconsolidation: towards a novel treatment of pathogenic memories. *European Journal of Pharmacology* 585, no. 2-3 (Maio 13): 453-457. doi:10.1016/j.ejphar.2008.03.010.
- Doyère, Valérie, Jacek Debiec, Marie-H Monfils, Glenn E Schafe, e Joseph E LeDoux. 2007. Synapse-specific reconsolidation of distinct fear memories in the lateral amygdala. *Nature Neuroscience* 10, no. 4 (Abril): 414-416. doi:10.1038/nn1871.
- Draguhn, A, R D Traub, A Bibbig, e D Schmitz. 2000. Ripple (approximately 200-Hz) oscillations in temporal structures. *Journal of Clinical Neurophysiology: Official Publication of the American Electroencephalographic Society* 17, no. 4 (Julho): 361-376.
- Dudai, Yadin, e Mark Eisenberg. 2004. Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron* 44, no. 1 (Setembro 30): 93-100. doi:10.1016/j.neuron.2004.09.003.
- Dudai, Yadin, e Mark Eisenberg. 2004. Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron* 44, no. 1 (Setembro 30): 93-100. doi:10.1016/j.neuron.2004.09.003.
- Dudai, Yadin. 2006. Reconsolidation: the advantage of being refocused. *Current Opinion in Neurobiology* 16, no. 2 (Abril): 174-178. doi:10.1016/j.conb.2006.03.010.

- Eckel-Mahan, Kristin L, Trongha Phan, Sung Han, Hongbing Wang, Guy C K Chan, Zachary S Scheiner, e Daniel R Storm. 2008. Circadian oscillation of hippocampal MAPK activity and cAmp: implications for memory persistence. *Nature Neuroscience* 11, no. 9 (Setembro): 1074-1082.
- Ellenbogen, Jeffrey M, Jessica D Payne, e Robert Stickgold. 2006. The role of sleep in declarative memory consolidation: passive, permissive, active or none? *Current Opinion in Neurobiology* 16, no. 6 (Dezembro): 716-722. doi:10.1016/j.conb.2006.10.006.
- Emptage, N J, e T J Carew. 1993. Long-term synaptic facilitation in the absence of short-term facilitation in Aplysia neurons. *Science (New York, N.Y.)* 262, no. 5131 (Outubro 8): 253-256.
- Eschenko, Oxana, e Susan J Sara. 2008. Learning-dependent, transient increase of activity in noradrenergic neurons of locus coeruleus during slow wave sleep in the rat: brain stem-cortex interplay for memory consolidation? *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)* 18, no. 11 (Novembro): 2596-2603. doi:10.1093/cercor/bhn020.
- Eschenko, Oxana, Wiâm Ramadan, Matthias Mölle, Jan Born, e Susan J Sara. 2008. Sustained increase in hippocampal sharp-wave ripple activity during slow-wave sleep after learning. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 15, no. 4: 222-228. doi:10.1101/lm.726008.
- Fanselow, M.S. 1990. Factors governing one trial contextual conditioning. *Anim. Learn. Behav.* **18**: 264-270.
- Ferrara, M, L De Gennaro, e M Bertini. 1999. Selective slow-wave sleep (SWS) deprivation and SWS rebound: do we need a fixed SWS amount per night? *Sleep Research Online: SRO* 2, no. 1: 15-19.

- Fogel, Stuart M, Carlyle T Smith, e Richard J Beninger. 2009. Evidence for 2-stage models of sleep and memory: learning-dependent changes in spindles and teta in rats. *Brain Research Bulletin* 79, no. 6 (Agosto 14): 445-451. doi:10.1016/j.brainresbull.2009.03.002.
- Fonseca, Rosalina, U Valentin Nägerl, e Tobias Bonhoeffer. 2006. Neuronal activity determines the protein synthesis dependence of long-term potentiation. *Nature Neuroscience* 9, no. 4 (Abril): 478-480. doi:10.1038/nn1667.
- Forcato, Cecilia, Valeria L Burgos, Pablo F Argibay, Victor A Molina, María E Pedreira, e Hector Maldonado. 2007. Reconsolidation of declarative memory in humans. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 14, no. 4 (Abril): 295-303. doi:10.1101/lm.486107.
- Fricks-Gleason, Ashley N, e John F Marshall. 2008. Post-retrieval beta-adrenergic receptor blockade: effects on extinction and reconsolidation of cocaine-cue memories. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 15, no. 9: 643-648. doi:10.1101/lm.1054608.
- Furtak, Sharon C, Shau-Ming Wei, Kara L Agster, e Rebecca D Burwell. 2007. Functional neuroanatomy of the parahippocampal region in the rat: the perirhinal and postrhinal cortices. *Hippocampus* 17, no. 9: 709-722. doi:10.1002/hipo.20314.
- Gervasoni, D., et al., *Global forebrain dynamics predict rat behavioral states and their transitions*. *J. Neurosci.*, 2004. **24**(49): p. 11137-11147.
- Gilbert, P E, R P Kesner, e I Lee. 2001. Dissociating hippocampal subregions: double dissociation between dentate gyrus and CA1. *Hippocampus* 11, no. 6: 626-636. doi:10.1002/hipo.1077.
- Girardeau, Gabrielle, Karim Benchenane, Sidney I Wiener, György Buzsáki, e Michaël B Zugaro. 2009. Selective suppression of hippocampal ripples impairs spatial memory. *Nature Neuroscience* 12, no. 10 (Outubro): 1222-1223. doi:10.1038/nn.2384.

- Gold, Paul E. 2006. The many faces of amnesia. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 13, no. 5 (Outubro): 506-514. doi:10.1101/lm.277406.
- Goshen-Gottstein, Y, e H Kempinsky. 2001. Probing memory with conceptual cues at multiple retention intervals: a comparison of forgetting rates on implicit and explicit tests. *Psychonomic Bulletin & Review* 8, no. 1 (Março): 139-146.
- Harley, C W, e S J Sara. 1992. Locus coeruleus bursts induced by glutamate trigger delayed perforant path spike amplitude potentiation in the dentate gyrus. *Experimental Brain Research. Experimentelle Hirnforschung. Expérimentation Cérébrale* 89, no. 3: 581-587.
- Hasselmo, Michael E, Clara Bodelón, e Bradley P Wyble. 2002. A proposed function for hippocampal theta rhythm: separate phases of encoding and retrieval enhance reversal of prior learning. *Neural Computation* 14, no. 4 (Abril): 793-817. doi:10.1162/089976602317318965.
- Hasselmo, Michael E, e Mark P Brandon. 2008. Linking cellular mechanisms to behavior: entorhinal persistent spiking and membrane potential oscillations may underlie path integration, grid cell firing, and episodic memory. *Neural Plasticity* 2008: 658323. doi:10.1155/2008/658323.
- Hasselmo, Michael E, Jonathan Hay, Maxim Ilyn, e Anatoli Gorchetchnikov. 2002. Neuromodulation, theta rhythm and rat spatial navigation. *Neural Networks: The Official Journal of the International Neural Network Society* 15, no. 4-6 (Julho): 689-707.
- Hasselmo, Michael E. 2005. What is the function of hippocampal theta rhythm?--Linking behavioral data to phasic properties of field potential and unit recording data. *Hippocampus* 15, no. 7: 936-949. doi:10.1002/hipo.20116.
- Henrie, J Andrew, e Robert Shapley. 2005. LFP power spectra in V1 cortex: the graded effect of stimulus contrast. *Journal of Neurophysiology* 94, no. 1 (Julho): 479-490. doi:10.1152/jn.00919.2004.

- Holbro, Niklaus, Asa Grunditz, e Thomas G Oertner. 2009. Differential distribution of endoplasmic reticulum controls metabotropic signaling and plasticity at hippocampal synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, no. 35 (Setembro 1): 15055-15060. doi:10.1073/pnas.0905110106.
- Igaz, Lionel Muller, Monica R M Vianna, Jorge H Medina, e Ivan Izquierdo. 2002. Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 22, no. 15 (Agosto 1): 6781-6789. doi:20026642.
- Inoue, Sana, e Tetsuro Matsuzawa. 2007. Working memory of numerals in chimpanzees. *Current Biology: CB* 17, no. 23 (Dezembro 4): R1004-1005. doi:10.1016/j.cub.2007.10.027.
- Izquierdo, I, D M Barros, T Mello e Souza, M M de Souza, L A Izquierdo, e J H Medina. 1998. Mechanisms for memory types differ. *Nature* 393, no. 6686 (Junho 18): 635-636. doi:10.1038/31371.
- Izquierdo, I, J A Quillfeldt, M S Zanatta, J Quevedo, E Schaeffer, P K Schmitz, e J H Medina. 1997. Sequential role of hippocampus and amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats. *The European Journal of Neuroscience* 9, no. 4 (Abril): 786-793.
- Izquierdo, I. *Memória*. Editora Artmed. Porto Alegre. 95 p. (2002).
- Izquierdo, Iván, Lia R M Bevilaqua, Janine I Rossato, Juliana S Bonini, Jorge H Medina, e Martín Cammarota. 2006. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends in Neurosciences* 29, no. 9 (Setembro): 496-505. doi:10.1016/j.tins.2006.07.005.
- Jenkins JG, Dallenbach KM: Obliviscence during sleep and waking. *Am J Psychol* 1924, 35:605-612.

- Jensen, O, e J E Lisman. 1996. Teta/gama networks with slow NMDA channels learn sequences and encode episodic memory: role of NMDA channels in recall. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 3, no. 2-3 (Outubro): 264-278.
- Jensen, Ole, e Laura L Colgin. 2007. Cross-frequency coupling between neuronal oscillations. *Trends in Cognitive Sciences* 11, no. 7 (Julho): 267-269. doi:10.1016/j.tics.2007.05.003.
- Karlsson, Mattias P, e Loren M Frank. 2009. Awake replay of remote experiences in the hippocampus. *Nature Neuroscience* 12, no. 7 (Julho): 913-918. doi:10.1038/nn.2344.
- Kemenes, György, Ildikó Kemenes, Maximilian Michel, Andrea Papp, e Uli Müller. 2006. Phase-dependent molecular requirements for memory reconsolidation: differential roles for protein synthesis and protein kinase A activity. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26, no. 23 (Junho 7): 6298-6302. doi:10.1523/JNEUROSCI.0890-06.2006.
- Kerr, Kristin M, Kara L Agster, Sharon C Furtak, e Rebecca D Burwell. 2007a. Functional neuroanatomy of the parahippocampal region: the lateral and medial entorhinal areas. *Hippocampus* 17, no. 9: 697-708. doi:10.1002/hipo.20315.
- Kerr, Kristin M, Kara L Agster, Sharon C Furtak, e Rebecca D Burwell. 2007b. Functional neuroanatomy of the parahippocampal region: the lateral and medial entorhinal areas. *Hippocampus* 17, no. 9: 697-708. doi:10.1002/hipo.20315.
- Kim, H K, J H Hong, M S Park, J S Kang, e M H Lee. 2001. Determination of propranolol concentration in small volume of rat plasma by HPLC with fluorometric detection. *Biomedical Chromatography: BMC* 15, no. 8 (Dezembro): 539-545. doi:10.1002/bmc.110.
- King, C, D A Henze, X Leinekugel, e G Buzsáki. 1999. Hebbian modification of a hippocampal population pattern in the rat. *The Journal of Physiology* 521 Pt 1 (Novembro 15): 159-167.

- Koch, C. 1993. Good vibes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, no. 5 (Março 1): 1637-1638.
- Kopelman, Michael D. 2002. Disorders of memory. *Brain: A Journal of Neurology* 125, no. Pt 10 (Outubro): 2152-2190.
- Kralik, J., et al., *Techniques for long-term multisite neuronal ensemble recordings in behaving animals. Methods.*, 2001. **25**(2): p. 121-50.
- Lakatos, Peter, Ankoor S Shah, Kevin H Knuth, Istvan Ulbert, George Karmos, e Charles E Schroeder. 2005. An oscillatory hierarchy controlling neuronal excitability and stimulus processing in the auditory cortex. *Journal of Neurophysiology* 94, no. 3 (Setembro): 1904-1911. doi:10.1152/jn.00263.2005.
- LeDoux, J E. 2000. Emotion circuits in the brain. *Annual Review of Neuroscience* 23: 155-184. doi:10.1146/annurev.neuro.23.1.155.
- Lee, Jonathan L C, Barry J Everitt, e Kerrie L Thomas. 2004. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science (New York, N.Y.)* 304, no. 5672 (Maio 7): 839-843. doi:10.1126/science.1095760.
- Lee, Jonathan L C, Patricia Di Ciano, Kerrie L Thomas, e Barry J Everitt. 2005. Disrupting reconsolidation of drug memories reduces cocaine-seeking behavior. *Neuron* 47, no. 6 (Setembro 15): 795-801. doi:10.1016/j.neuron.2005.08.007.
- Lee, Jonathan L C. 2008. Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nature Neuroscience* 11, no. 11 (Novembro): 1264-1266. doi:10.1038/nn.2205.
- Lee, Jonathan L.C. e Everitt, Barry J. Reactivation-Dependent Amnesia: Disrupting Memory Reconsolidation as a Novel Approach for the Treatment of Maladaptive Memory Disorders

- Lewis, D.J. Psychobiology of Active and Inactive Memory. *Psychological Bulletin*. 1979, Vol. 86, No. 5, 1054-1083.
- Lisman, John, e György Buzsáki. 2008. A neural coding scheme formed by the combined function of gamma and theta oscillations. *Schizophrenia Bulletin* 34, no. 5 (Setembro): 974-980. doi:10.1093/schbul/sbn060.
- Lisman, John, e Sridhar Raghavachari. 2006. A unified model of the presynaptic and postsynaptic changes during LTP at CA1 synapses. *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment* 2006, no. 356 (Outubro 10): re11. doi:10.1126/stke.3562006re11.
- Lisman, J. 2001. Long-Term Potentiation. *Encyclopedia of Life Sciences*. *Nature Publishing Group*.
- Loftus, E F. 1993. The reality of repressed memories. *The American Psychologist* 48, no. 5 (Maio): 518-537.
- Loftus, Elizabeth F, e Deborah Davis. 2006. Recovered memories. *Annual Review of Clinical Psychology* 2: 469-498. doi:10.1146/annurev.clinpsy.2.022305.095315.
- Loftus, Elizabeth F. 2005. Planting misinformation in the human mind: a 30-year investigation of the malleability of memory. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 12, no. 4 (Agosto): 361-366. doi:10.1101/lm.94705.
- Lubenov, Evgueniy V, e Athanassios G Siapas. 2009. Hippocampal theta oscillations are travelling waves. *Nature* 459, no. 7246 (Maio 28): 534-539. doi:10.1038/nature08010.
- Maier, Nikolaus, Volker Nimmrich, e Andreas Draguhn. 2003. Cellular and network mechanisms underlying spontaneous sharp wave-ripple complexes in mouse hippocampal slices. *The Journal of Physiology* 550, no. Pt 3 (Agosto 1): 873-887. doi:10.1113/jphysiol.2003.044602.
- Manns, Joseph R, e Howard Eichenbaum. 2006. Evolution of declarative memory. *Hippocampus* 16, no. 9: 795-808. doi:10.1002/hipo.20205.

- McDermott, Carmel M, Mattie N Hardy, Nicolas G Bazan, e Jeffrey C Magee. 2006. Sleep deprivation-induced alterations in excitatory synaptic transmission in the CA1 region of the rat hippocampus. *The Journal of Physiology* 570, no. Pt 3 (Fevereiro 1): 553-565. doi:10.1113/jphysiol.2005.093781.
- McDevitt, D G. 1987. Comparison of pharmacokinetic properties of beta-adrenoceptor blocking drugs. *European Heart Journal* 8 Suppl M (Dezembro): 9-14.
- McGaugh, J L. 1966. Time-dependent processes in memory storage. *Science (New York, N.Y.)* 153, no. 742 (Setembro 16): 1351-1358.
- McGaugh, J L. 2000. Memory--a century of consolidation. *Science (New York, N.Y.)* 287, no. 5451 (Janeiro 14): 248-251.
- Medina, Jorge H, Pedro Bekinschtein, Martín Cammarota, e Iván Izquierdo. 2008. Do memories consolidate to persist or do they persist to consolidate? *Behavioural Brain Research* 192, no. 1 (Setembro 1): 61-69. doi:10.1016/j.bbr.2008.02.006.
- Memories: Molecules and Circuits. © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2007.
- Milekic, Maria H, Sheena D Brown, Claudia Castellini, e Cristina M Alberini. 2006. Persistent disruption of an established morphine conditioned place preference. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26, no. 11 (Março 15): 3010-3020. doi:10.1523/JNEUROSCI.4818-05.2006.
- Miller, Courtney A, e John F Marshall. 2005. Molecular substrates for retrieval and reconsolidation of cocaine-associated contextual memory. *Neuron* 47, no. 6 (Setembro 15): 873-884. doi:10.1016/j.neuron.2005.08.006.

- Milton, Amy L, Jonathan L C Lee, e Barry J Everitt. 2008. Reconsolidation of appetitive memories for both natural and drug reinforcement is dependent on β -adrenergic receptors. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 15, no. 2 (Fevereiro): 88-92. doi:10.1101/lm.825008.
- Misanin, J R, R R Miller, e D J Lewis. 1968. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science (New York, N.Y.)* 160, no. 827 (Maio 3): 554-555.
- Montgomery, Sean M, e György Buzsáki. 2007. Gama oscillations dynamically couple hippocampal CA3 and CA1 regions during memory task performance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, no. 36 (Setembro 4): 14495-14500. doi:10.1073/pnas.0701826104.
- Müller, G.E. & Pilzecker, A. *Z. Psychol.* 1, 1 (1900).
- Nádasdy, Z, H Hirase, A Czurkó, J Csicsvari, e G Buzsáki. 1999. Replay and time compression of recurring spike sequences in the hippocampus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 19, no. 21 (Novembro 1): 9497-9507.
- Nader, Karim, e Oliver Hardt. 2009. A single standard for memory: the case for reconsolidation. *Nature Reviews. Neuroscience* 10, no. 3 (Março): 224-234. doi:10.1038/nrn2590.
- Nader, Karim, e Szu-Han Wang. 2006. Fading in. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 13, no. 5 (Outubro): 530-535. doi:10.1101/lm.350906.
- Nader, Karim, G E Schafe, e J E Le Doux. 2000. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* 406, no. 6797 (Agosto 17): 722-726. doi:10.1038/35021052.
- Nader, Karim, G E Schafe, e J E LeDoux. 2000. The labile nature of consolidation theory. *Nature Reviews. Neuroscience* 1, no. 3 (Dezembro): 216-219.

- Nader, Karim, Oliver Hardt, e Szu-Han Wang. 2005. Response to Alberini: right answer, wrong question. *Trends in Neurosciences* 28, no. 7 (Julho): 346-347. doi:10.1016/j.tins.2005.04.011.
- Nader, Karim. 2003a. Memory traces unbound. *Trends in Neurosciences* 26, no. 2 (Fevereiro): 65-72.
- Nader, Karim. 2003b. Neuroscience: re-recording human memories. *Nature* 425, no. 6958 (Outubro 9): 571-572. doi:10.1038/425571a.
- Nakashiba, Toshiaki, Derek L Buhl, Thomas J McHugh, e Susumu Tonegawa. 2009. Hippocampal CA3 output is crucial for ripple-associated reactivation and consolidation of memory. *Neuron* 62, no. 6 (Junho 25): 781-787. doi:10.1016/j.neuron.2009.05.013.
- Nguyen, David P, Fabian Kloosterman, Riccardo Barbieri, Emery N Brown, e Matthew A Wilson. 2009. Characterizing the dynamic frequency structure of fast oscillations in the rodent hippocampus. *Frontiers in Integrative Neuroscience* 3: 11. doi:10.3389/neuro.07.011.2009.
- Nicolelis, M., et al., *Methods for simultaneous multisite neural ensemble recordings in behaving primates*, in *Methods for neural ensemble recordings*, M.A.L. Nicolelis, Editor. 1999, CRC Press: New York. p. 121-156.
- Nicolelis, Miguel A L, e Sidarta Ribeiro. 2006. Seeking the neural code. *Scientific American* 295, no. 6 (Dezembro): 70-77.
- Nimmrich, Volker, Nikolaus Maier, Dietmar Schmitz, e Andreas Draguhn. 2005. Induced sharp wave-ripple complexes in the absence of synaptic inhibition in mouse hippocampal slices. *The Journal of Physiology* 563, no. Pt 3 (Março 15): 663-670. doi:10.1113/jphysiol.2004.079558.
- Pareti, G, e A De Palma. 2004. Does the brain oscillate? The dispute on neuronal synchronization. *Neurological Sciences: Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* 25, no. 2 (Junho): 41-47. doi:10.1007/s10072-004-0235-2.

- Paxinos, G. and C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Compact 3rd edition. ed. 1997, San Diego: Academic Press.
- Pedreira, María Eugenia, Luis María Pérez-Cuesta, e Héctor Maldonado. 2002. Reactivation and reconsolidation of long-term memory in the crab *Chasmagnathus*: protein synthesis requirement and mediation by NMDA-type glutamatergic receptors. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 22, no. 18 (Setembro 15): 8305-8311.
- Penfold, P S. 1996. The repressed memory controversy: is there middle ground? *CMAJ: Canadian Medical Association Journal = Journal De l'Association Medicale Canadienne* 155, no. 6 (Setembro 15): 647-653.
- Ponomarenko, Alexey A, Jay-Shake Li, Tatiana M Korotkova, Joseph P Huston, e Helmut L Haas. 2008. Frequency of network synchronization in the hippocampus marks learning. *The European Journal of Neuroscience* 27, no. 11 (Junho): 3035-3042. doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06232.x.
- Przybylski, J, e S J Sara. 1997. Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behavioural Brain Research* 84, no. 1-2 (Março): 241-246.
- Przybylski, J, P Roulet, e S J Sara. 1999. Attenuation of emotional and nonemotional memories after their reactivation: role of beta adrenergic receptors. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 19, no. 15 (Agosto 1): 6623-6628.
- Quiñan Quiroga, Rodrigo, e Stefano Panzeri. 2009. Extracting information from neuronal populations: information theory and decoding approaches. *Nature Reviews. Neuroscience* 10, no. 3 (Março): 173-185. doi:10.1038/nrn2578.
- Quinette, Peggy, Bérengère Guillery-Girard, Jacques Dayan, Vincent de la Sayette, Sophie Marquis, Fausto Viader, Béatrice Desgranges, e Francis Eustache. 2006. What does transient global

amnesia really mean? Review of the literature and thorough study of 142 cases. *Brain: A Journal of Neurology* 129, no. Pt 7 (Julho): 1640-1658. doi:10.1093/brain/awl105.

Quirk, Gregory J, e Devin Mueller. 2008. Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 33, no. 1 (Janeiro): 56-72. doi:10.1038/sj.npp.1301555.

Remondes, Miguel, e Erin M Schuman. 2002. Direct cortical input modulates plasticity and spiking in CA1 pyramidal neurons. *Nature* 416, no. 6882 (Abril 18): 736-740. doi:10.1038/416736a.

Ribeiro, S, V Goyal, C V Mello, e C Pavlides. 1999. Brain gene expression during REM sleep depends on prior waking experience. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 6, no. 5 (Outubro): 500-508.

Ribeiro, Sidarta, Claudio V Mello, Tarciso Velho, Timothy J Gardner, Erich D Jarvis, e Constantine Pavlides. 2002. Induction of hippocampal long-term potentiation during waking leads to increased extrahippocampal zif-268 expression during ensuing rapid-eye-movement sleep. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 22, no. 24 (Dezembro 15): 10914-10923.

Ribeiro, Sidarta, Damien Gervasoni, Ernesto S Soares, Yi Zhou, Shih-Chieh Lin, Janaina Pantoja, Michael Lavine, e Miguel A L Nicolelis. 2004. Long-lasting novelty-induced neuronal reverberation during slow-wave sleep in multiple forebrain areas. *PLoS Biology* 2, no. 1 (Janeiro): E24. doi:10.1371/journal.pbio.0020024.

Ribeiro, Sidarta, Damien Gervasoni, Ernesto S Soares, Yi Zhou, Shih-Chieh Lin, Janaina Pantoja, Michael Lavine, e Miguel A L Nicolelis. 2004. Long-lasting novelty-induced neuronal reverberation during slow-wave sleep in multiple forebrain areas. *PLoS Biology* 2, no. 1 (Janeiro): E24. doi:10.1371/journal.pbio.0020024.

- Ribeiro, Sidarta, e Miguel A L Nicolelis. 2004. Reverberation, storage, and postsynaptic propagation of memories during sleep. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 11, no. 6 (Dezembro): 686-696. doi:10.1101/lm.75604.
- Ribot T. Les maladies de la memoire. NewYork: Appleton-Century-Crofts;1881.
- Robinson, M J F, e K B J Franklin. 2007. Central but not peripheral beta-adrenergic antagonism blocks reconsolidation for a morphine place preference. *Behavioural Brain Research* 182, no. 1 (Agosto 22): 129-134. doi:10.1016/j.bbr.2007.05.023.
- Rossato, Janine I, Lia R M Bevilaqua, Iván Izquierdo, Jorge H Medina, e Martín Cammarota. 2009. Dopamine controls persistence of long-term memory storage. *Science (New York, N.Y.)* 325, no. 5943 (Agosto 21): 1017-1020. doi:10.1126/science.1172545.
- Roullet, P, e S Sara. 1998. Consolidation of memory after its reactivation: involvement of beta noradrenergic receptors in the late phase. *Neural Plasticity* 6, no. 3 (Setembro): 63-68. doi:10.1155/NP.1998.63.
- Rudy, Jerry W, e Karli Wright-Hardesty. 2005. The temporal dynamics of retention of a context memory: something is missing. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 12, no. 2 (Abril): 172-177. doi:10.1101/lm.84005.
- Rudy, Jerry W, Joseph C Biedenkapp, Jeannine Moineau, e Kevin Bolding. 2006. Anisomycin and the reconsolidation hypothesis. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 13, no. 1 (Fevereiro): 1-3. doi:10.1101/lm.157806.
- Sara, S J, C Dyon-Laurent, e A Hervé. 1995. Novelty seeking behavior in the rat is dependent upon the integrity of the noradrenergic system. *Brain Research. Cognitive Brain Research* 2, no. 3 (Julho): 181-187.

- Sara, S J, P Roulet, e J Przybyslawski. 1999. Consolidation of memory for odor-reward association: beta-adrenergic receptor involvement in the late phase. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 6, no. 2 (Abril): 88-96.
- Sara, S J. 2000. Strengthening the shaky trace through retrieval. *Nature Reviews. Neuroscience* 1, no. 3 (Dezembro): 212-213.
- Sara, Susan J, e Bernard Hars. 2006. In memory of consolidation. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 13, no. 5 (Outubro): 515-521. doi:10.1101/lm.338406.
- Schacter, D L. 1999. The seven sins of memory. Insights from psychology and cognitive neuroscience. *The American Psychologist* 54, no. 3 (Março): 182-203.
- Schaefer, Andreas T, Kamilla Angelo, Hartwig Spors, e Troy W Margrie. 2006. Neuronal oscillations enhance stimulus discrimination by ensuring action potential precision. *PLoS Biology* 4, no. 6 (Junho): e163. doi:10.1371/journal.pbio.0040163.
- Scheffer Teixeira, R. Fear memories can lie [resposta eletrônica a Kim, *et al.* Fear Extinction across Development: The Involvement of the Medial Prefrontal Cortex as Assessed by Temporary Inactivation and Immunohistochemistry]. *J Neurosci* September 2, 2009, 29(35):10802-10808; doi:10.1523/JNEUROSCI.0596-09.2009.
- Schopenhauer, A. O mundo como vontade e como representação. São Paulo: editora UNESP, 2005.
- Scoville, W. B. and Milner, B. 1957. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 20, 11–21
- Sherry, D. F. & Schacter, D. L. The Evolution of Multiple Memory Systems *Psychological Review*. 1987, Vol. 94, No. 4, 439—454
- Shors T. J. and Matzel L. D. (1997). Long-Term Potentiation: What's Learning Got to Do With It? *Behav. Brain Sci* 20, 597–655.

- Siegel, J M. 2001. The REM sleep-memory consolidation hypothesis. *Science (New York, N.Y.)* 294, no. 5544 (Novembro 2): 1058-1063. doi:10.1126/science.1063049.
- Stark, Eran, e Moshe Abeles. 2007. Predicting movement from multiunit activity. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27, no. 31 (Agosto 1): 8387-8394. doi:10.1523/JNEUROSCI.1321-07.2007.
- Stickgold, R, J A Hobson, R Fosse, e M Fosse. 2001. Sleep, learning, and dreams: off-line memory reprocessing. *Science (New York, N.Y.)* 294, no. 5544 (Novembro 2): 1052-1057. doi:10.1126/science.1063530.
- Stickgold, Robert, e Matthew P Walker. 2005. Memory consolidation and reconsolidation: what is the role of sleep? *Trends in Neurosciences* 28, no. 8 (Agosto): 408-415. doi:10.1016/j.tins.2005.06.004.
- Stickgold, Robert. 2007. Of sleep, memories and trauma. *Nature Neuroscience* 10, no. 5 (Maio): 540-542. doi:10.1038/nn0507-540.
- Suzuki, Akinobu, Sheena A Josselyn, Paul W Frankland, Shoichi Masushige, Alcino J Silva, e Satoshi Kida. 2004. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24, no. 20 (Maio 19): 4787-4795. doi:10.1523/JNEUROSCI.5491-03.2004.
- Szapiro, German, Julieta M Galante, Daniela M Barros, Miguelina Levi de Stein, Monica R M Vianna, Luciana A Izquierdo, Ivan Izquierdo, e Jorge H Medina. 2002. Molecular mechanisms of memory retrieval. *Neurochemical Research* 27, no. 11 (Novembro): 1491-1498.
- Tartar, Jaime L, Christopher P Ward, James T McKenna, Mahesh Thakkar, Elda Arrigoni, Robert W McCarley, Ritchie E Brown, e Robert E Strecker. 2006. Hippocampal synaptic plasticity and

spatial learning are impaired in a rat model of sleep fragmentation. *The European Journal of Neuroscience* 23, no. 10 (Maio): 2739-2748. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.04808.x.

Taubenfeld, S M, M H Milekic, B Monti, e C M Alberini. 2001. The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPbeta. *Nature Neuroscience* 4, no. 8 (Agosto): 813-818. doi:10.1038/90520.

Tian, Shaowen, Fulian Huang, Peng Li, Xinping Ouyang, Zengbang Li, Haifeng Deng, e Yufeng Yang. 2009. Rapid eye movement sleep deprivation does not affect fear memory reconsolidation in rats. *Neuroscience Letters* 463, no. 1 (Setembro 29): 74-77. doi:10.1016/j.neulet.2009.07.044.

Tort, Adriano B L, Mark A Kramer, Catherine Thorn, Daniel J Gibson, Yasuo Kubota, Ann M Graybiel, e Nancy J Kopell. 2008. Dynamic cross-frequency couplings of local field potential oscillations in rat striatum and hippocampus during performance of a T-maze task. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, no. 51 (Dezembro 23): 20517-20522. doi:10.1073/pnas.0810524105.

Traub, R D, N Spruston, I Soltesz, A Konnerth, M A Whittington, e G R Jefferys. 1998. Gama-frequency oscillations: a neuronal population phenomenon, regulated by synaptic and intrinsic cellular processes, and inducing synaptic plasticity. *Progress in Neurobiology* 55, no. 6 (Agosto): 563-575.

Tronson, Natalie C, e Jane R Taylor. 2007. Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nature Reviews. Neuroscience* 8, no. 4 (Abril): 262-275. doi:10.1038/nrn2090.

Vertes, R P, e K E Eastman. 2000. The case against memory consolidation in REM sleep. *The Behavioral and Brain Sciences* 23, no. 6 (Dezembro): 867-876; discussion 904-1121.

Vianna, M R, G Szapiro, J L McGaugh, J H Medina, e I Izquierdo. 2001. Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the rat hippocampus.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98, no. 21 (Outubro 9): 12251-12254. doi:10.1073/pnas.211433298.

Vianna, Monica R, Lionel Muller Igaz, Adriana S Coitinho, Jorge H Medina, e Ivan Izquierdo. 2003. Memory extinction requires gene expression in rat hippocampus. *Neurobiology of Learning and Memory* 79, no. 3 (Maio): 199-203.

Wilson, M A, e B L McNaughton. 1994. Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep. *Science (New York, N.Y.)* 265, no. 5172 (Julho 29): 676-679.

Wiltgen, Brian J, Robert A M Brown, Lynn E Talton, e Alcino J Silva. 2004. New circuits for old memories: the role of the neocortex in consolidation. *Neuron* 44, no. 1 (Setembro 30): 101-108. doi:10.1016/j.neuron.2004.09.015.

Witter, M P, P A Naber, T van Haeften, W C Machielsen, S A Rombouts, F Barkhof, P Scheltens, e F H Lopes da Silva. 2000. Cortico-hippocampal communication by way of parallel parahippocampal-subicular pathways. *Hippocampus* 10, no. 4: 398-410. doi:10.1002/1098-1063(2000)10:4<398::AID-HIPO6>3.0.CO;2-K.

Wixted, John T. 2004. The psychology and neuroscience of forgetting. *Annual Review of Psychology* 55: 235-269. doi:10.1146/annurev.psych.55.090902.141555.

Ylinen, A, A Bragin, Z Nádasdy, G Jandó, I Szabó, A Sik, e G Buzsáki. 1995. Sharp wave-associated high-frequency oscillation (200 Hz) in the intact hippocampus: network and intracellular mechanisms. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 15, no. 1 Pt 1 (Janeiro): 30-46.

Young, Calvin K, e Jos J Eggermont. 2009. Coupling of mesoscopic brain oscillations: Recent advances in analytical and theoretical perspectives. *Progress in Neurobiology* (Junho 20). doi:10.1016/j.pneurobio.2009.06.002.

Yun, K. Lebedev, M. Nicolelis, M.A.L. 2007. Prediction of motor timing using nonlinear analysis of local field potentials. *Ifmbe Proceedings*. 2007, Vol. 14; n.2, pages 1005-1008