

ALBERTO YIM JÚNIOR

**EFEITOS DA INFUSÃO INTRA-AMIGDALAR DO
INIBIDOR DA SÍNTESE PROTÉICA ANISOMICINA E
SISTÊMICA DO PROPRANOLOL APÓS A EVOCAÇÃO
SOBRE A EXPRESSÃO DE UMA PREFERÊNCIA
CONDICIONADA PELO LUGAR INDUZIDA PELA
MORFINA**

Tese apresentada à Universidade Federal de São
Paulo- Escola Paulista de Medicina para a obtenção
do título de Doutor em Ciências

**SÃO PAULO
2007**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATÁLOGO-NA- PUBLICAÇÃO
(Biblioteca do Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo)

Yim Júnior, Alberto

Efeitos da infusão intra-amigdalar do inibidor de síntese protéica anisomicina e da administração sistêmica do propranolol após a evocação sobre a expressão de uma preferência condicionada ao lugar induzida pela morfina. / Alberto Yim Júnior

121 f. :il

Dissertação (doutorado em Ciências) – Universidade Federal de São Paulo. Departamento de Psicobiologia. São Paulo, 2007.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Gabriela Menezes de Oliveira.

Unitermos: 1. reconsolidação 2. preferência condicionada pelo lugar
3. morfina 4. anisomicina 5. propranolol

*Morre lentamente quem não viaja,
quem não lê, quem não ouve música,
quem destrói o seu amor-próprio,
quem não se deixa ajudar.*

*Morre lentamente quem se transforma escravo do hábito,
repetindo todos os dias o mesmo trajeto,
quem não muda as marcas no supermercado,
não arrisca vestir uma cor nova,
não conversa com quem não conhece.*

*Morre lentamente quem evita uma paixão,
quem prefere o "preto no branco" e os "pontos nos is"
a um turbilhão de emoções indomáveis,
justamente as que resgatam brilho nos olhos,
sorrisos e soluços, coração aos tropeços, sentimentos.*

*Morre lentamente quem não vira a mesa quando está infeliz no trabalho,
quem não arrisca o certo pelo incerto atrás de um sonho,
quem não se permite, uma vez na vida, fugir dos conselhos sensatos.*

*Morre lentamente quem passa os dias queixando-se da má sorte ou da
chuva incessante, desistindo de um projeto antes de iniciá-lo,
não perguntando sobre um assunto que desconhece
e não respondendo quando lhe indagam o que sabe.*

*Evitemos a morte em doses suaves, recordando sempre que estar vivo
exige um esforço muito maior do que o simples ato de respirar. Somente a
perseverança fará com que conquistemos um estágio pleno de felicidade.*

*Pablo Neruda
(Poeta chileno, prêmio Nobel de literatura de 1971)*

Segundo Sócrates, cada indivíduo é seu próprio centro e o Universo gira à sua volta por que o conhecimento de si mesmo é o conhecimento de Deus.

(SØREN KIEKEGAARD, filósofo dinamarquês)

Não há diferenças fundamentais entre o homem e os animais nas suas faculdades mentais... os animais, como os homens, demonstram sentir prazer, dor, felicidade e sofrimento.

(CHARLES DARWIN)

Dedico especialmente este trabalho:

● *aos meus pais, Alberto e Ana, que sempre me apoiaram durante a minha longa jornada até este momento, e que, acima de tudo, foram responsáveis pela minha formação ética e moral.*

● *à minha irmã Juliana e ao meu sobrinho Eduardo, que mesmo estando tão distantes, sempre estiveram do meu lado, apoiando e incentivando o meu trabalho.*

● *à minha mãe científica Gabi, uma pessoa de extraordinária inteligência e energia contagiantes, uma verdadeira amiga, que me recebeu de braços abertos e sempre incentivou as minhas idéias científicas pouco convencionais.*

● *aos caríssimos amigos Sady, Césio, Tuba, Doda, Marcello, Mari, Celina, Natacha, Fred, Lúcia Sider, Nato, Dri e Gargamas, que me mostraram que a vida pode ser encarada sob um prisma diferente.*

● *aos amigos da Psicobio Gilbertinho, Marcos, Rosana, Marcelo, Francisco Godói e Ricardo Machado pelas conversas altamente frutíferas sobre filosofia, ciência, ética, política, religião e psicologia que enriqueceram em muito meus conhecimentos nestas áreas.*

● *aos animais utilizados neste estudo, que não foram vistos por este pesquisador como meros objetos de pesquisa, mas sim como seres que compartilham várias emoções semelhantes aos seres humanos como dor, prazer e medo e cujas vidas sacrificadas mereceram o mais profundo respeito.*

Agradecimentos

- *ao professor Orlando pelas sugestões e correções para a confecção do meu artigo, pela amizade e pelas aulas de filosofia.*
- *à professora Mônica Andersen, pelo gentil empréstimo da bomba de infusão, essencial para a realização de meus experimentos.*
- *à Marilde Aires Costa, pela presteza em atender aos meus pedidos e, acima de tudo, pela amizade demonstrada durante todo este período de trabalho no departamento.*
- *ao José Bernardo da Costa, pela valiosa assistência prestada durante meus experimentos.*
- *ao Dunga, Ricardo e Cris pela sincera amizade demonstrada durante todos estes anos.*
- *aos amigos de pós-graduação Francisco Dubiela, Flávia, Ivanda, Juliana Perry, Lúcio, Adriano, Léo, Sergio Rolim, Fúlvio, Sionaldo, Cláudia, Deinha e Karina pela agradável convivência e companheirismo.*
- *ao grupo da Gabi, em especial à Tati, à Raquel e à Larissa, pela colaboração e sugestões oferecidas nos experimentos.*
- *à Nereide Lourdes Garcia e à Cris pela solicitude, gentileza e simpatia demonstrados no atendimento aos pós-graduandos.*
- *ao CNPq pela bolsa concedida.*

RESUMO

Yim, A.J. Efeitos da infusão intra-amigdalár do inibidor da síntese protéica anisomicina e sistêmica do propranolol após a reativação sobre a expressão de uma preferência condicionada pelo lugar induzida pela morfina. [Effects of intra-amigdalár infusion of protein synthesis inhibitor anisomycin and systemic of propranolol following retrieval on expression of a morphine-induced conditioned place preference.] São Paulo, 121 folhas. Dissertação (Doutorado em Ciências)

Diversos estudos têm mostrado que memórias aversivas antigas, já consolidadas, quando reativadas, retornam em um estado frágil, necessitando de uma nova rodada de consolidação para que ela torne-se novamente estável. Este fenômeno é denominado de reconsolidação, sendo dependente tanto da síntese protéica quanto do sistema noradrenérgico.

A tarefa da preferência condicionada pelo lugar é um tipo de condicionamento pavloviano no qual o animal aprende a associar pistas ambientais com uma recompensa, sendo amplamente utilizado para o estudo das propriedades recompensadoras dos alimentos e das drogas de abuso.

A amígdala basolateral é uma estrutura relacionada com o aprendizado aversivo, como o condicionamento do medo ao som e ao contexto. Esta estrutura está também envolvida com o aprendizado apetitivo, incluindo a preferência condicionada pelo lugar. Diversos trabalhos com farmacologia, inativação e lesão têm mostrado que esta estrutura está envolvida com a aquisição, a consolidação, a expressão e o restabelecimento dessa tarefa.

Como a infusão de um inibidor de síntese protéica (anisomicina) na amígdala basolateral bloqueou a reconsolidação em uma tarefa aversiva, e como esta estrutura também está envolvida na expressão da preferência condicionada pelo lugar, a primeira

parte deste estudo investigou se a infusão da anisomicina bloqueou a reconsolidação desta tarefa. Os resultados deste estudo mostraram que a anisomicina, quando infundida na amígdala basolateral imediatamente após a reativação (teste), não prejudicou o desempenho dos animais em um teste posterior, indicando que não houve reconsolidação dependente de síntese protéica nesta estrutura para a tarefa de preferência condicionada pelo lugar.

A segunda parte deste estudo teve por objetivo verificar se o propranolol, um antagonista β -noradrenérgico, quando injetado sistemicamente, bloquearia a reconsolidação da tarefa de preferência condicionada pelo lugar induzida pela morfina, uma vez que diversos estudos verificaram que essa droga bloqueia a reconsolidação, tanto de tarefas aversivas, quanto de apetitivas. Novamente, a administração sistêmica do propranolol após a reativação (teste), não prejudicou o desempenho dos animais, sugerindo que não houve reconsolidação dependente do sistema noradrenérgico na tarefa de preferência pelo lugar.

ABSTRACT

Yim, A.J. Effects of intra-amigdalal infusion of protein synthesis inhibitor anisomycin and systemic of propranolol following retrieval on expression of a morphine-induced conditioned place preference. [Efeitos da infusão intra-amigdalal do inibidor da síntese protéica anisomicina e sistêmica do propranolol após a reativação sobre a expressão de uma preferência condicionada pelo lugar induzida pela morfina.]

Several studies have shown that aversive old memories, when recalled, return to a fragile state, requiring a new round of consolidation to become stable again. This phenomenon, called reconsolidation, is dependent upon a new protein synthesis and noradrenergic system.

The conditioned place preference task is a kind of pavlovian conditioning in which animals learn to associate environmental cues (conditioned stimulus) with a reward (unconditioned stimulus). This task is widely utilized to evaluate the rewarding properties of food and drugs of abuse.

The basolateral amygdala is a cerebral structure related to aversive learning, including both contextual and auditory fear conditioning. This structure is also involved with the appetitive learning, including conditioned place preference. Several works have found that this structure is responsible by association between the conditioned stimulus and the reward. Moreover, it has been found that basolateral amygdala is involved with acquisition, consolidation, expression and reinstatement of conditioned place preference.

The infusion of the protein synthesis inhibitor anisomycin in the basolateral amygdala following retrieval blocked the reconsolidation of auditory fear conditioning.

Since this structure is required for the expression of conditioned place preference, the first objective of this study was to investigate if the anisomycin infusion in the basolateral amygdala following retrieval could block the reconsolidation of a morphine-associated conditioned place preference. The intra-amygdalar infusion of anisomycin did not impair the expression of a morphine-associated place preference following retrieval in three different reactivation procedures.

The second aim of this work was to verify if the systemic administration of a β -noradrenergic antagonist, propranolol, could block the reconsolidation of a morphine-induced place preference, since some studies have shown that this drug could block the reconsolidation both in aversive and appetitive tasks. The systemic administration of propranolol, after reactivation, did not impair the performance of the animals in a subsequent test. Again, this result suggests that did not occur reconsolidation dependent upon noradrenaline β -receptors in morphine-induced place preference.

SUMÁRIO

1.Introdução.....	1
1.1 O papel da síntese protéica na consolidação da memória	2
1.2 O papel da noradrenalina na consolidação da memória.....	6
1.3 O papel da síntese protéica na reconsolidação de tarefas aversivas	8
1.4 O papel da noradrenalina na reconsolidação em tarefas aversivas	12
1.5 Histórico dos métodos utilizados para avaliar as propriedades reforçadoras e recompensadoras dos alimentos e das drogas de abuso	13
1.6 O papel da noradrenalina na mediação dos efeitos recompensadores das drogas de abuso	20
1.7 O papel da amígdala no aprendizado aversivo e apetitivo.....	23
1.8 A reconsolidação dependente de síntese protéica e de noradrenalina nas tarefas apetitivas.....	29
2.Objetivos.....	32
3. Experimentos realizados.....	34
3.1 Materiais e métodos.....	35
Experimento 1.....	35
3.1.1 Animais.....	35
3.1.2 Drogas	35
3.1.3 Aparato de preferência condicionada pelo lugar.....	36
3.1.4 Aparato do condicionamento do medo ao contexto.....	36
3.1.5 Cirurgia estereotáxica e microinfusão.....	37
3.1.6 Histologia.....	38

3.1.7 Procedimentos comportamentais gerais	39
3.1.7.1 Preferência condicionada pelo lugar.....	39
3.1.7.2 Condicionamento de medo ao contexto.....	41
3.1.7.3 Atividade Locomotora.....	41
3.1.8 Análise estatística	42
3.2 Delineamentos experimentais e resultados comportamentais	42
3.2.1 Experimento 1A	42
3.2.1.1 Delineamento experimental.....	43
3.2.1.2 Resultados	43
3.2.2 Experimento 1B.....	47
3.2.2.1 Delineamento experimental.....	47
3.2.2.2 Resultados.....	48
3.2.3 Experimento 1C.....	50
3.2.3.1 Delineamento experimental.....	50
3.2.3.2 Resultados.....	52
3.2.4 Experimento 1D.....	54
3.2.4.1 Delineamento experimental.....	54
3.2.4.2 Resultados.....	55
3.2.4 Resultados histológicos.....	56
3.2 Experimento 2.....	59

3.3) Materiais e métodos.....	59
3.3.1 Animais.....	59
3.3.2 Droga.....	59
3.3.3 Aparato de preferência condicionada pelo lugar.....	60
3.3.4 Procedimentos comportamentais gerais.....	60
3.3.4 Preferência condicionada pelo lugar.....	60
3.3.4.2 Atividade locomotora.....	61
3.3.5 Análise estatística.....	62
3.4 Delineamentos experimentais e resultados comportamentais.....	62
3.4.1 Experimento 2A	62
3.4.1.1 Delineamento experimental.....	62
3.4.1.2 Resultados.....	63
3.4.2 Experimento 2B.....	66
3.4.2.1 Delineamento experimental.....	66
3.4.2.2 Resultados.....	68
3.4.3 Experimento 2C.....	69
3.4.3.1 Delineamento experimental.....	70
3.4.3.2 Resultados.....	71
3.4.4 Experimento 2D.....	73
3.4.4.1 Delineamento experimental.....	73
3.4.4.2 Resultados.....	75
3.4.5 Experimento 2E.....	77
3.4.5.1 Delineamento experimental.....	77
3.4.5.2 Resultados.....	79
4. Discussão.....	82

4.1) Primeira parte.....	83
4.2 Segunda parte	95
5. Conclusões.....	102
6. Referências bibliográficas.....	104

1. INTRODUÇÃO

1.1) O papel da síntese protéica na consolidação da memória

Para que ocorra a formação da memória de longo prazo, é necessário que ela passe sucessivamente pelos estágios da aquisição, da consolidação, do armazenamento e da evocação da informação (WANG *et al.*, 2006).

Uma memória de longo prazo recente, recém-adquirida, é armazenada inicialmente num estado instável, transitório e susceptível à interrupção (ABEL & LATTAL, 2001). Contudo, com o passar do tempo, esta memória torna-se mais estável. Este processo de estabilização da memória é denominado de consolidação (FRANKLAND & BONTEMPI, 2005, MCGAUGH, 2000). A consolidação de novas memórias é um fenômeno dependente da síntese protéica. Os primeiros trabalhos que constataram que, em um teste posterior, a administração de antibióticos inibidores da síntese protéica induzia ao prejuízo do desempenho dos animais surgiram na década de 1960. FLEXNER, FLEXNER & STELLAR (1963) verificaram os efeitos da inibição da síntese protéica sobre a consolidação da memória, utilizando uma tarefa de esquiva em um labirinto em Y. Os animais tinham que aprender que, para evitar levar um choque nas patas em um determinado braço do labirinto, eles, quando colocados no corredor do labirinto, devem correr dentro de 5 segundos para o outro braço. Este trabalho verificou que a injeção bilateral combinada do inibidor da síntese protéica puromicina no lobo temporal, no frontal e no ventrículo, um dia após o treino, prejudicou o desempenho dos animais quando os mesmos foram testados 3 dias depois. Para tentar localizar o efeito eliciado pela puromicina, esta droga foi injetada separadamente nas três estruturas anteriores (ventrículo, córtex pré-frontal e córtex temporal). Constatou-se que a injeção bilateral da puromicina no lobo temporal (hipocampo mais córtex entorrinal) prejudicava o desempenho dos animais, quando administrado 1 ou 2 dias após o treino. Porém, quando a puromicina foi injetada no

lobo temporal 3, 4,5 e 6 dias após o treino, houve uma progressiva diminuição da vulnerabilidade da memória aos efeitos amnésicos desta droga. Os autores também constataram que a injeção bilateral de puromicina, no córtex pré-frontal ou no ventrículo, um dia após o treino, não prejudicou o desempenho dos animais nesta tarefa. As injeções bilaterais isoladas da puromicina no córtex pré-frontal, no lobo temporal ou no ventrículo não prejudicaram a memória do 11º ao 43º dia após o treino. No entanto, os animais que receberam injeções bilaterais combinadas nos córtices temporal e frontal e também no ventrículo lateral no intervalo entre o 11º e o 43º dia após o treino, apresentaram prejuízo de desempenho quando foram testados 3 dias depois da injeção. Portanto, para os autores, a memória vai migrando progressivamente do lobo temporal para as outras áreas corticais, sendo que este fenômeno ocorre em um intervalo de 3 a 6 dias após o treino. Em 1968, BARONDES & COHEN constataram que a administração subcutânea da acetoxicicloheximida, um outro inibidor da síntese protéica, 5 minutos antes do treino, não interferiu na aquisição de uma tarefa em que ratos foram treinados para escapar de um choque num labirinto em T, escolhendo o braço iluminado deste que não estava associado ao choque. Estes animais também apresentaram um desempenho normal quando foram testados 3 horas após o treino. Contudo, quando foram testados 6 horas após o treino, eles apresentaram prejuízo no desempenho da tarefa. Assim, este trabalho mostrou que existem processos de curto prazo que são independentes da síntese protéica, mas ela é necessária para a formação da memória de longo prazo.

Como os inibidores da síntese protéica utilizados até então, como a cicloheximide e a puromicina, eram extremamente tóxicos e provocavam uma alta taxa de mortalidade nos animais, FLOOD *et al.* (1973) testaram os efeitos de um novo inibidor, a anisomicina. Este antibiótico mostrou-se bem menos tóxico do que os

utilizados anteriormente e apresentou-se como sendo um potente inibidor da síntese protéica cerebral, uma vez que a administração subcutânea de 0,5, 1,0 e 3,0 mg produziram uma inibição de mais de 90% das proteínas cerebrais nas primeiras 2 horas após a injeção. Os autores também constataram que a anisomicina, quando injetada uma única vez, 15 minutos antes do treino da esQUIVA inibitória, prejudica o desempenho no teste realizado 24 horas depois. No entanto, quando a anisomicina foi injetada duas vezes, 15 minutos antes do treino e 2 horas após a primeira injeção, a amnésia induzida por este inibidor da síntese protéica é de intensidade maior, quando comparada com a dos animais que receberam uma única dose da anisomicina antes do treino. Por último, este trabalho verificou que a efetividade da anisomicina em induzir amnésia está relacionada com a intensidade do treino. Assim, quanto maior for a intensidade do treino, menor é a capacidade da anisomicina para eliciar amnésia. A partir deste estudo, a anisomicina passou a ser amplamente utilizada para investigar os efeitos da inibição da síntese protéica sobre a consolidação da memória.

Após estes primeiros trabalhos mostrando que a consolidação da memória depende da síntese protéica, uma série de outros estudos, em que foram injetados inibidores da síntese protéica nas regiões específicas do cérebro, têm mostrado um perfil de resultados semelhantes. Diversos trabalhos têm mostrado que a infusão da anisomicina no hipocampo, uma estrutura importante para o processamento e para o armazenamento das informações espaciais (O`KEEFE & NADEL, 1978) impede a consolidação das tarefas dependentes desta estrutura. GRECKSH & MATTHIES (1980) constataram que a infusão intra-hipocampal da anisomicina bloqueou a consolidação de uma tarefa de discriminação luminosa em uma câmara com formato de Y. Neste mesmo sentido, QUEVEDO *et al.* (1999) e QUEVEDO *et al.* (2004), utilizando a tarefa de esQUIVA inibitória, mostraram que a administração intra-

hipocampal da anisomicina prejudicava o desempenho dos animais em um teste de retenção realizado 24 horas depois, quando a mesma foi administrada 15 minutos antes e 3 horas após o treino, mas não imediatamente após e 6 horas depois deste. Além disso, os autores verificaram que a anisomicina apenas prejudica a consolidação da memória de longo prazo, não tendo efeito sobre a de curto prazo. Estes resultados sugerem que ocorrem duas ondas da síntese protéica para a consolidação da memória da tarefa da esquiva inibitória e, também, que a síntese protéica é necessária para a consolidação da memória de longo prazo. Contudo, os eventos que medeiam a memória de curto prazo são independentes da síntese protéica.

Um outro trabalho, que ressaltou a importância da síntese protéica na consolidação da memória nas tarefas do condicionamento do medo ao som e ao contexto, foi o de SCHAFE *et al.* (1999). Este estudo mostrou que a infusão intracerebroventricular da anisomicina não prejudicou o desempenho dos animais em um teste de retenção para a memória de curto prazo para estas duas tarefas (avaliados 30 minutos após o treino, no caso do condicionamento de medo ao som, e uma hora, no caso do contexto). Contudo, estas mesmas drogas prejudicaram o desempenho dos animais em um teste de retenção realizado 24 horas após o treino.

Diversos estudos constataram que a amígdala basolateral é uma estrutura importante para a consolidação das informações com conteúdo emocional. PARENT & MCGAUGH (1994) mostraram que a inativação da amígdala basolateral com a lidocaína, imediatamente após o treino da esquiva inibitória, prejudicou o desempenho dos animais em um teste posterior. Neste mesmo sentido, da CUNHA *et al.* (1999) verificaram que a infusão do flumazenil, um antagonista do receptor benzodiazepínico, na amígdala basolateral, logo depois do treino da esquiva inibitória, melhorou o desempenho dos animais em um teste subsequente. Com base nestes dados, tanto

SCHAFE & LEDOUX (2000) quanto MAREN *et al.* (2003) mostraram que a síntese protéica na amígdala basolateral é necessária para a consolidação do condicionamento do medo, tanto ao som quanto ao contexto.

Em relação às tarefas apetitivas, existem poucos trabalhos na literatura que tenham investigado o papel da síntese protéica na sua consolidação. Um dos poucos trabalhos que investigou o papel da síntese protéica na consolidação de uma tarefa apetitiva foi o de DANIELS (1970). Neste trabalho, o autor mostrou que a injeção intra-hipocampal de actinomicina D prejudicou a consolidação de uma tarefa apetitiva, no qual ratos privados de água aprendiam que, no interior de uma caixa maior, havia uma outra caixa menor cujo interior continha um bebedouro. Um outro trabalho, mais recente, publicado em 2003, realizado por HERNANDEZ, SADEGHIAN & KELLEY mostrou que uma tarefa instrumental apetitiva (pressionar uma alavanca para receber comida) necessita da síntese protéica no “core” do acumbens somente nos estágios iniciais deste aprendizado, uma vez que os animais que, imediatamente após as primeiras cinco sessões de treino, receberam uma injeção de anisomicina neste núcleo, não aprenderam esta tarefa. Contudo, quando o aprendizado já estava bem consolidado, a administração da anisomicina neste núcleo não interferiu com o desempenho dos animais na tarefa.

1.2) O papel da noradrenalina na consolidação da memória

O núcleo do trato solitário é um grupo de neurônios noradrenérgicos situado no tronco cerebral. Ele projeta-se para as vias ascendentes localizadas no feixe intersticial da estria terminal, na amígdala central (projeções massivas) e na basolateral (FALLON & CIOFI, 1992). Um outro agrupamento de células noradrenérgicas que se projeta para a amígdala (núcleo basolateral) é o locus coeruleus (CHEN & SARA, 2007).

As vias noradrenérgicas do núcleo do trato solitário e do locus coeruleus, que se projetam para a amígdala basolateral, parecem influenciar a consolidação das memórias com conteúdo emocional (MCGAUGH, 2004). LIANG, JULER & MCGAUGH (1986) constataram que a injeção bilateral da noradrenalina na amígdala, imediatamente após o treino da esquiva inibitória, melhorava o desempenho dos animais em um teste de retenção realizado 24 horas depois. Este efeito da noradrenalina na consolidação foi revertido pela injeção simultânea do antagonista β -adrenérgico propranolol. No mesmo sentido, LALUMIERE, BUEN & MCGAUGH (2003) verificaram que a infusão da noradrenalina na amígdala basolateral, imediatamente após o treino na tarefa de condicionamento de medo ao contexto, melhorou o desempenho dos animais em um teste de retenção realizado 24 horas depois. Assim, estes trabalhos mostraram que a neurotransmissão noradrenérgica da amígdala aumenta a consolidação das tarefas aversivas com forte impacto emocional e que este efeito é mediado pelos receptores β -adrenérgicos.

Os hormônios glicocorticóides interagem com o sistema noradrenérgico no interior da amígdala basolateral, aumentando a consolidação das memórias aversivas com um conteúdo emocional. Desta forma, QUIRARTE, ROOZENDAAL & MCGAUGH (1997) mostraram que o glicocorticóide dexametasona, quando injetado sistemicamente imediatamente após o treino na esquiva inibitória, melhora o desempenho dos animais em um teste posterior. Contudo, as micro-infusões dos antagonistas β -adrenérgicos propranolol (antagonista β inespecífico), atenolol (antagonista β -₁) e zinterol (antagonista β -₂) na amígdala basolateral, imediatamente antes do treino, reverteram os efeitos da dexametasona no teste de retenção. Um outro trabalho, que ressaltou a importância da interação entre a noradrenalina e os glicocorticóides no interior do amígdala basolateral para o aumento da consolidação, foi

o de ROOZENDAL *et al.* (2006). Utilizando a tarefa do condicionamento do medo ao som, estes autores mostraram que a corticosterona, quando injetada sistemicamente imediatamente após o treino, melhora o desempenho dos animais nesta tarefa em um teste de retenção posterior. Contudo, a injeção do antagonista β -₁ atenelol na amígdala basolateral bloqueou o efeito facilitador da memória induzida pela corticosterona.

Em relação às tarefas apetitivas, existem poucos dados na literatura a respeito do papel da noradrenalina na sua consolidação. Assim, STERNBERG *et al.* (1985) verificaram os efeitos da noradrenalina injetada logo após o treino em uma tarefa de discriminação visual apetitiva. Nesta, animais privados de água tinham que aprender, em uma única sessão de treino, que um dos braços de um labirinto em Y estava pareado com água, e o outro não. Os autores constataram que administração sistêmica da noradrenalina, logo após o treino, melhora o desempenho dos animais em um teste de retenção 24 horas depois. A administração sistêmica do propranolol, antes do treino, reverteu a melhora do desempenho induzida pela noradrenalina nesta tarefa, sugerindo que a noradrenalina melhora a consolidação da memória numa tarefa apetitiva.

1.3) O papel da síntese protéica na reconsolidação de tarefas aversivas

O conceito de que as memórias já consolidadas, quando evocadas em um primeiro teste (ou seja, quando são reativadas), retornam em um estado lábil, e necessitam de uma nova rodada de consolidação para se tornarem novamente estáveis, surgiu a partir de um trabalho pioneiro realizado por MISANIN, MILLER & LEWIS (1968). Utilizando a tarefa do condicionamento do medo ao som, este estudo constatou que a administração de um choque eletroconvulsivo, imediatamente após um primeiro teste (reativação da memória), eliciava uma amnésia retrógrada em um teste posterior. Este prejuízo no desempenho só ocorreu quando o estímulo condicionado (som) foi

apresentado na primeira sessão de teste (reativação). Quando isto não ocorreu, os animais não apresentaram perda de desempenho em um teste posterior. Na década seguinte, vários outros estudos mostraram resultados semelhantes, tanto nas tarefas apetitivas quanto nas aversivas (para uma revisão, ver SARA; 2000 e RICCIO, MILLIN & BOGART, 2006). Contudo, o conceito de reconsolidação foi praticamente abandonado e esquecido pela literatura, talvez porque outros estudos, como o de DAWSON & MCGAUGH (1969), GOLD & KING (1972) e SQUIRE, SLATER & CHACE (1976) não tenham conseguido verificar este fenômeno.

O conceito da reconsolidação só tornou a ser mencionado na literatura por meio de dois trabalhos de impacto, publicados entre 1999 e 2000. O primeiro estudo, publicado por PRZBYSLAWSKI, ROULLET & SARA (1999), mostrou que os receptores β -noradrenérgicos desempenham um importante papel na reconsolidação na esquivia inibitória. O segundo, de maior impacto, foi publicado por NADER, SCHAFE & LEDOUX (2000). Neste trabalho, constatou-se que a injeção do inibidor da síntese protéica anisomicina na amígdala basolateral, imediatamente após uma sessão de reativação de uma memória de condicionamento do medo ao som, provocou uma amnésia retrógrada em um teste subsequente, independente de a reativação ocorrer 1 ou 14 dias após o treino. Não houve prejuízo no desempenho quando a injeção intramigdal da anisomicina ocorreu na ausência da sessão de reativação.

A partir destes dois trabalhos ocorreu um grande aumento pelo interesse do estudo da natureza do fenômeno da reconsolidação, uma vez que este poderia representar uma nova abordagem terapêutica para o tratamento do estresse pós-traumático. Contudo, os trabalhos posteriores que abordaram o fenômeno produziram resultados extremamente conflitantes, criando uma das maiores polêmicas na literatura dedicada ao estudo da neurobiologia da memória. Assim, existem controvérsias a

respeito da existência ou não do fenômeno mesmo nos experimentos que fizeram uso das mesmas tarefas. Por exemplo, enquanto que DEBIEC, LEDOUX & NADER (2002) verificaram que a injeção intra-hipocampal da anisomicina, após a evocação, eliciu uma amnésia retrógrada em um teste posterior, BIENDENKAPP & RUDY (2004) não verificaram esta perda de desempenho na tarefa do condicionamento do medo ao contexto. Na tarefa da esQUIVA inibitória, MILEKIC & ALBERINI (2002) mostraram que a administração subcutânea da anisomicina após o teste, prejudicou o desempenho em um reteste subsequente. Já CAMMAROTTA *et al.* (2004) constataram que a injeção bilateral da anisomicina na região CA1 do hipocampo, na amígdala basolateral e no córtex entorrinal, imediatamente após a sessão de reativação, não prejudicou a expressão do aprendizado desta tarefa num teste posterior realizado no dia seguinte. Entretanto, apesar do trabalho de CAMMAROTTA *et al.* (2004) não ter verificado a reconsolidação nas três estruturas cerebrais estudadas, não se pode descartar que o fenômeno da reconsolidação possa ocorrer em alguma outra estrutura.

Além da incompatibilidade de resultados encontrados na literatura, outros estudos sugerem que o prejuízo eliciado pela anisomicina, injetada imediatamente após a reativação, é temporário e pode ser revertido com o passar do tempo. LATTAL & ABEL (2004) mostraram que, na tarefa de condicionamento do medo ao contexto, animais que receberam sistemicamente múltiplas injeções da anisomicina, após a reativação, apresentaram um prejuízo no desempenho em um reteste realizado 24 horas depois. Contudo, ocorreu uma recuperação espontânea quando os mesmos animais foram testados novamente 21 dias após o treino. Resultados semelhantes foram encontrados com a infusão intra-hipocampal da anisomicina pós-reativação, tanto na tarefa do condicionamento do medo ao contexto (FISCHER *et al.*, 2004) quanto na tarefa da esQUIVA inibitória (POWER *et al.*, 2006). No trabalho de FISCHER *et al.*

(2004) foi constatado que a injeção intra-hipocampal da anisomicina, imediatamente após a reativação da memória, induziu um prejuízo no desempenho dos animais nos testes posteriores. Contudo, este estudo mostrou que a anisomicina não apaga permanentemente a memória, uma vez que a aplicação de um choque de baixa intensidade, no mesmo contexto no qual ocorreu o treino, imperceptível para os animais *naive*, prontamente restabeleceu a postura do congelamento em animais que receberam a anisomicina ou a puromicina, após a sessão de reativação. Assim, este estudo concluiu que a inibição de síntese protéica está mais relacionada com uma aceleração da extinção* do que com o bloqueio da reconsolidação. O estudo realizado por POWER *et al.* (2006) verificou, em primeiro lugar, que a injeção intra-hipocampal da anisomicina, imediatamente após a evocação da memória de uma tarefa da esquiva inibitória, induziu um prejuízo no desempenho dos animais em um teste posterior realizado 2 dias após a reativação. Todavia, em um novo teste, feito 6 dias após a reativação dessa memória, os animais apresentaram uma recuperação espontânea. O estudo verificou ainda que, a injeção intra-hipocampal da anisomicina após uma re-exposição maior ao contexto do treinamento durante a reativação, prejudicou a extinção em um teste realizado 24 horas depois. Os autores concluíram que a administração pós-reativação da anisomicina prejudica, de forma transitória, a retenção da memória em um teste posterior. Além disso, também foi constatado que a extinção é dependente de síntese protéica. Porém, um estudo feito por DUVARCI & NADER (2004) mostrou que a reconsolidação não pode ser confundida com uma extinção facilitada, e nem a uma incapacidade de evocar uma memória já consolidada. A extinção do condicionamento do medo ao som é um fenômeno contexto dependente, de tal forma que se a resposta condicionada for extinta num determinado contexto e os animais forem testados em um outro contexto, a resposta ao estímulo condicionado retorna. Assim, se o déficit da memória induzida

*A extinção é um fenômeno pelos quais as apresentações sucessivas apenas do estímulo condicionado, na ausência do estímulo incondicionado, elicia um novo aprendizado, caracterizado pelo fato do animal deixar de fazer a associação entre o estímulo condicionado e o incondicionado (IZQUIERDO *et al.*, 2005).

pela inibição da síntese protéica após a reativação fosse causado pelo aceleração da extinção, o animal apresentaria um retorno da resposta condicionada quando ele for testado em um outro contexto. Partindo deste pressuposto, o estudo constatou que, no condicionamento do medo ao som, o prejuízo do desempenho induzido pelo bloqueio da reconsolidação permanece mesmo quando os animais são colocados em um contexto diferente. Assim, este experimento diferenciou o fenômeno da reconsolidação da extinção. Para demonstrar que o bloqueio da reconsolidação apaga totalmente uma memória do condicionamento do medo ao som, também constatou-se que a amnésia eliciada pelo bloqueio da reconsolidação não sofria recuperação espontânea, uma vez que a aplicação de um choque de baixa intensidade não restabeleceu a memória.

1.4) O papel da noradrenalina na reconsolidação de tarefas aversivas

O primeiro estudo que indicou que os receptores β -noradrenérgicos estariam envolvidos com o fenômeno da reconsolidação foi realizado por PRZBYSLAWSKI, ROULLET & SARA (1999). Eles mostraram que, na tarefa da esquivas passiva, a administração sistêmica do antagonista β -adrenérgico propranolol, cinco minutos após a reativação destas memórias, prejudicou o desempenho dos animais em um teste posterior. Os autores sugeriram que os receptores β -adrenérgicos desempenham um importante papel na reconsolidação, permitindo assim que as memórias antigas fossem reorganizadas e atualizadas sempre que evocadas.

Um outro trabalho que mostrou que o antagonista β -noradrenérgico propranolol bloqueia a reconsolidação foi realizado por DEBIEC & LEDOUX (2004). Estes verificaram que tanto a injeção sistêmica quanto a infusão bilateral na amígdala basolateral do propranolol, imediatamente após o treino, não prejudicaram o desempenho dos animais na tarefa do condicionamento do medo ao som em um teste de

retenção realizado 48 horas depois. Contudo, tanto a injeção sistêmica quanto a infusão bilateral na amígdala basolateral do propranolol, imediatamente após uma sessão de reativação, prejudicaram o desempenho dos animais no teste da retenção. Os autores concluíram que, o bloqueio noradrenérgico na amígdala basolateral, interferia apenas na reconsolidação da tarefa do condicionamento do medo ao som, não exercendo nenhum efeito sobre sua consolidação. Eles sugeriram que o bloqueio da reconsolidação com o propranolol poderia representar uma nova abordagem terapêutica para o tratamento do estresse pós-traumático, uma vez que, ao contrário dos inibidores da síntese protéica, que somente podem ser administrados intracerebralmente, o propranolol pode ser administrado sistemicamente nos seres humanos. Portanto, tanto os inibidores da síntese protéica quanto o propranolol parecem interferir com a reconsolidação das memórias aversivas.

1.5) Histórico dos métodos utilizados para avaliar as propriedades reforçadoras e recompensadoras dos alimentos e das drogas de abuso

Parte dos problemas relacionados com o consumo crônico das drogas de abuso reside no fato de que o efeito reforçador destas é associado com estímulos condicionados ambientais, inicialmente neutros. Estes, após sucessivos pareamentos com a droga, eliciam um comportamento de busca pela mesma, tanto nos seus usuários da quanto nos indivíduos abstinentes (para revisão, ver BOSSERT *et al.*, 2005). Desta forma, foram desenvolvidos diversos modelos animais para o estudo do efeito reforçador/recompensador das drogas de abuso, sendo que 3 deles serão descritos abaixo.

Os primeiros estudos que sugeriram que determinadas estruturas cerebrais estavam envolvidas com a mediação da recompensa ou do reforço fizeram uso do

modelo da auto-administração elétrica intra-cranial. Este modelo animal surgiu com o trabalho pioneiro desenvolvido por OLDS & MILNER (1954). Estes pesquisadores constataram que a estimulação elétrica da área septal, do trato mamilotálâmico e do córtex cingulado, eliciava efeitos reforçadores. Neste trabalho, eles demonstraram que os animais aprendiam a pressionar uma alavanca para receber uma corrente elétrica que estimulava a área septal (maior grau), o córtex cingulado e o trato mamilotálâmico (menor grau). Assim, concluíram que estas regiões cerebrais poderiam ser consideradas reforçadoras, uma vez que os animais se auto-estimularam regularmente e por períodos de tempo prolongados. Em 1958, OLDS & OLDS verificaram que um inibidor da monoaminoxidase, a iproniazida, era capaz de induzir a auto-administração na área hipotalâmica, sendo este trabalho um dos primeiros a mostrar que as drogas reforçadoras poderiam ser auto-administradas intra-cranialmente nas estruturas cerebrais relacionadas com a recompensa.

Em um trabalho publicado em 1979, MOGENSEN *et al.* mostraram que o sistema dopaminérgico mesolímbico medeia os efeitos reforçadores da auto-estimulação elétrica cerebral. Este trabalho constatou que a injeção do espiroperidol, um antagonista dopaminérgico, no núcleo acumbens, reduziu significativamente a auto-estimulação na área tegmental ventral ipso-lateral. A injeção do espiroperidol no córtex pré-frontal não reduziu a auto-estimulação na área tegmental ventral ipso lateral. Ademais, a estimulação elétrica dos neurônios do acumbens, relacionados com a auto-estimulação, ativou os neurônios da área tegmental ventral. Portanto, este trabalho mostrou que o sistema dopaminérgico mesolímbico contribui para os efeitos reforçadores da auto-estimulação elétrica cerebral. Muitos estudos posteriores mostraram que as recompensas naturais e as drogas de abuso, inclusive as opiodérgicas, exercem seus

efeitos reforçadores aumentando a transmissão da dopamina no sistema mesolímbico (KELLEY *et al.*, 1980; STINUS *et al.*, 1980, DI CHIARA & IMPERATO, 1988).

Um outro modelo animal usado para o estudo dos efeitos recompensadores das drogas de abuso é o da auto-administração operante. O conceito do condicionamento operante foi formulado, em 1938, por SKINNER. Influenciado pela Lei do Efeito, formulada por THONRDIKE (1913), SKINNER acreditava que o aprendizado animal é regido e mantido por suas conseqüências reforçadoras. Além disso, segundo ele, o comportamento é explicado sem referências aos eventos mentais ou neurológicos. Assim, umas das conseqüências de uma resposta emitida é o reforço. O reforço ocorre quando, após a emissão da resposta, há uma sensação de bem-estar no animal ou o alívio de uma situação desagradável, aumentando, assim, a probabilidade de que esta mesma resposta seja emitida no futuro.

Os estudos com o condicionamento operante utilizavam os alimentos como reforçadores. Contudo, alguns pesquisadores, como WEEKS (1962), perceberam que os efeitos reforçadores das drogas de abuso, como a morfina, poderiam ser estudados com os conceitos e as técnicas do condicionamento operante. Assim, WEEKS (1962) desenvolveu um método para estudar o vício à morfina, administrando injeções endovenosas automáticas desta nos ratos. A metodologia empregada no modelo da auto-administração é uma adaptação do condicionamento operante. Neste modelo, um cateter é implantado na jugular do animal para que ele possa auto-administrar pequenas doses de uma droga reforçadora. Dentro de uma caixa apropriada (caixa de Skinner), os animais são condicionados a associar um estímulo, inicialmente neutro (estímulo discriminativo, som ou luz), com a entrega da droga reforçadora. O animal, para receber uma dose da droga, deve aprender a emitir uma resposta motora (pressionar uma alavanca ou enfiar o focinho num buraco) logo após a apresentação do estímulo

discriminativo. Após um período de treinamento, e caso haja uma relação de contingência entre o estímulo e a resposta, os animais emitem uma resposta motora mesmo na ausência do reforçador (SANCHIS-SEGURA & SPANAGEL, 2006).

A tarefa de preferência condicionada pelo lugar é também um outro modelo animal usado para o estudo dos efeitos recompensadores eliciados pelos alimentos e pelas drogas de abuso. O trabalho primordial, que mais tarde deu origem à tarefa de preferência condicionada ao lugar, remonta à década de 1930. Durante esta, foi escrito o primeiro trabalho que sugeriu que, o condicionamento pelo lugar, poderia ser um modelo útil para se avaliar os efeitos recompensadores das drogas de abuso. Neste trabalho, conduzido por SPRAGG (apud BARDO & BEVINS, 2000*), os chimpanzés foram tratados com doses diárias de morfina até que eles se tornassem dependentes desta droga. Após o estabelecimento da dependência, os animais foram treinados para escolher entre uma caixa preta, que continha uma banana em seu interior, e uma branca, que continha uma seringa com uma dose de morfina. Eles foram testados em quatro condições diferentes. Na primeira situação, os animais apresentavam-se famintos e abstinentes à morfina, na segunda, os mesmos encontravam-se famintos, mas sob o efeito da morfina, na terceira, os mesmos foram alimentados, mas estavam abstinentes à esta droga, e, na última situação, os mesmos foram alimentados e sob o efeito desta droga. SPRAGG constatou que os animais abstinentes da morfina sempre escolhiam a caixa contendo no seu interior a seringa com a dose de morfina (caixa branca), enquanto que os animais sob o efeito desta droga sempre preferiam a caixa pareada com a banana (preta). Com estes resultados, o autor concluiu que o desejo pela morfina foi estabelecido de uma forma inequívoca, sendo muito semelhante ao comportamento dos viciados humanos.

*BARDO, M. T.; BEVINS, R.A. Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? *Psychopharmacology*, v.153, p.31-43, 2000.

Baseado neste trabalho de SPRAGG, BEACH, em 1957 (*apud* BARDO & BEVINS, 2000), foi o primeiro pesquisador a trabalhar com uma tarefa semelhante à da preferência condicionada pelo lugar com ratos. Utilizando um labirinto em Y, este trabalho constatou que os animais, tratados cronicamente com morfina, poderiam ser treinados para preferir entre um braço previamente pareado com esta e um outro não pareado. Neste trabalho, BEACH também demonstrou que ratos não dependentes da morfina também eram capazes de preferir o braço pareado com esta droga, mostrando que a dependência física não é um pré-requisito para a obtenção da preferência condicionada pelo lugar.

Na década de 1970, os métodos utilizados para o estudo dos efeitos reforçadores das drogas de abuso eram a auto-administração operante e a auto-estimulação elétrica. Contudo, como estes dois métodos eram extremamente custosos e trabalhosos, os pesquisadores, que estudavam os efeitos reforçadores de drogas de abuso, começaram a pensar em elaborar uma metodologia alternativa, mais rápida e barata, para estudar estes efeitos reforçadores.

Em 1976, ROSSI & REID publicaram um trabalho cujo objetivo inicial foi o de comprovar que o aumento progressivo nas taxas de auto-estimulação intra-cranial, eliciada pela morfina, era devido a um estado afetivo positivo eliciado por esta droga. Conseqüentemente, estes pesquisadores desenvolveram uma técnica para avaliar os efeitos recompensadores da morfina com base na preferência pelo lugar. Deste modo, foi utilizada uma caixa de condicionamento contendo 3 compartimentos diferentes, em que um era branco com chão sólido, outro preto com uma malha de aço e um terceiro compartimento central. Um grupo de animais recebeu uma injeção subcutânea de morfina (10,0 mg/kg), tendo 45 a 75 minutos depois, metade dos animais sido colocada

no compartimento branco e a outra metade no preto por 30 minutos, para se realizar uma sessão de condicionamento por dia (não foi feito pareamento com salina no compartimento alternativo). Um outro grupo recebeu a salina e foi submetido ao mesmo procedimento do grupo da morfina. Após 3 sessões de condicionamento, foi feito o teste (um dia após a última sessão de treino) para as preferências em relação aos compartimentos pareados com a morfina ou a salina, respectivamente, para o grupo morfina ou o salina. O grupo que recebeu a morfina passou um tempo significativamente maior no compartimento pareado com esta droga, quando comparado com o grupo salina. Com o resultado deste trabalho, ROSSI & REID (1976) concluíram que o aumento progressivo da auto-estimulação elétrica intra-cranial, induzida pela morfina, era devido a um estado afetivo positivo, eliciado por esta droga. Além disso, eles construíram os pilares da tarefa da preferência condicionada pelo lugar, mesmo que o objetivo inicial do trabalho não fosse este.

Em 1978, KATZ & GORMEZANO propuseram, oficialmente, uma técnica nova, barata e rápida, para avaliar as propriedades motivacionais da morfina e da encefalina, baseada em um condicionamento clássico: a preferência condicionada pelo lugar. Neste estudo, os autores usaram um aparato contendo 2 compartimentos (um branco, cúbico e com um chão com grade, e o outro preto, prismático e com um formato triangular) separados entre si por uma porta guilhotina. Os animais foram submetidos às fases de habituação, de condicionamento e de teste. Na da habituação (1 sessão diária por 3 dias, com a duração de 30 minutos) os animais foram colocados, por 30 minutos, de forma balanceada, em cada compartimento, tendo sido medido o tempo em que eles permaneceram em cada um dos dois. Após 3 sessões de habituação, mediu-se o tempo médio em que os animais permaneceram em cada um dos dois compartimentos. No condicionamento, os animais foram colocados durante 10 minutos no

compartimento menos preferido durante a habituação. Logo a seguir, eles receberam uma infusão intra-cerebral de um análogo da encefalina (D-ala-leu encefalinamida) ou uma dose de morfina intra-peritoneal. Os grupos controle receberam salina, intra-cerebral e intra-peritoneal. Logo depois, eles retornaram para o compartimento menos preferido durante a habituação por mais 20 minutos. No dia seguinte, foi feito o teste, com os animais livres da droga e tendo acesso aos 2 compartimentos. Os resultados indicaram que, tanto o análogo da encefalina quanto o da morfina, provocaram uma mudança na preferência dos animais, mostrando que este modelo poderia ser uma ferramenta útil para o estudo do efeito reforçador dos opióides.

Em 1982, MUCHA *et al.* publicaram um extenso trabalho em que forneceram informações essenciais para avaliar as propriedades reforçadoras da morfina, usando a preferência condicionada pelo lugar. Assim, este trabalho mostrou que tanto uma dose baixa de morfina (0,08 mg/kg, iv) quanto uma dose maior (15 mg/kg, iv) induziam à preferência pelo lugar. Os pesquisadores também verificaram que, tanto as sessões de condicionamentos curtos (10 minutos, 4 sessões) no ambiente pareado com a morfina quanto os condicionamentos mais prolongados (90 minutos, 4 sessões), também induziam à preferência condicionada pelo lugar. Além disso, foi constatado que uma única sessão de condicionamento de 30 minutos, no compartimento pareado com a morfina, era suficiente para induzir à preferência pelo lugar. Também se verificou que a naloxona, um antagonista dos receptores opióides, bloqueava o desenvolvimento de uma preferência pelo lugar induzida pela morfina, sugerindo que a preferência condicionada pelo lugar, eliciada por esta droga, era mediada pelos receptores opióides específicos. Em 1984, MUCHA & IVERSEN descartaram que o aprendizado existente na preferência pelo lugar fosse, como outros autores sugeriram (OVERTEN, 1973) estado-dependente, uma vez que os ratos são treinados sob o efeito da morfina e

testados em um estado livre da droga. Assim, ratos condicionados para esta tarefa foram testados sob duas condições diferentes, em que em uma eles receberam a salina antes do teste, portanto, em um estado livre da droga e, no outro, receberam uma injeção da droga (morfina) antes do teste. Em ambas as situações, os animais preferiram permanecer por mais tempo no compartimento pareado com a morfina, o que descartou qualquer possibilidade de que este aprendizado fosse estado-dependente.

Resumindo, a tarefa da preferência condicionada pelo lugar é um tipo de condicionamento pavloviano em que o ambiente pareado com a recompensa representa o estímulo condicionado, o tempo gasto no compartimento pareado com a recompensa é denominado de resposta condicionada e a recompensa representa o estímulo incondicionado. A memória do condicionamento para a tarefa de preferência condicionada pelo lugar é duradoura, uma vez que os animais, quando são re-expostos ao aparato de condicionamento, continuam permanecendo mais tempo no ambiente pareado com a recompensa (HARRIS & ASTON-JONES, 2003)..

1.6) O papel da noradrenalina na mediação dos efeitos recompensadores das drogas de abuso

Um dos primeiros trabalhos que ressaltou a importância da noradrenalina na mediação dos efeitos recompensadores dos psicoestimulantes e opióides foi o de DROUIN *et al.* (2002). Os autores verificaram que a hiperatividade locomotora induzida pela d-anfetamina, pela cocaína e pela morfina foi drasticamente diminuída nos camundongos-nocaute para o receptor noradrenérgico $\alpha 1$ -b, quando comparados com os camundongos-selvagem para este receptor. Este estudo verificou que as sensibilizações comportamentais (um fenômeno de aumento da suscetibilidade adquirida pelo uso crônico de uma droga, onde os efeitos obtidos após uma dose aguda

posterior a um período de abstinência à droga são de intensidade maior do que os obtidos após uma administração aguda da mesma droga pela primeira vez) induzidas por estas três drogas estavam diminuídas nos camundongos-nocaute para o receptor $\alpha 1$ -b, quando comparadas com os seus respectivos selvagens. Um outro dado interessante foi o de que, no teste de preferência oral, as propriedades recompensadoras da cocaína e da morfina não foram observadas nos camundongos-nocaute. Os nocautes para este receptor também não expressaram uma preferência condicionada pelo lugar induzida pela morfina.

Dois outros trabalhos posteriores, realizados por VENTURA *et al.* (2003) e VENTURA, ALCARO & PUGLISI-ALLEGRA (2005), verificaram que a noradrenalina do córtex pré-frontal media os efeitos recompensadores da anfetamina e da morfina, modulando a liberação da dopamina no sistema mesolímbico. Assim, no trabalho publicado no ano de 2003, VENTURA *et al.* constataram que, os camundongos submetidos a uma depleção seletiva da via noradrenérgica do córtex pré-frontal não expressavam uma preferência condicionada pelo lugar associada à anfetamina. Adicionalmente, os autores também mostraram que esta depleção noradrenérgica no córtex pré-frontal reduziu dramaticamente a liberação da dopamina no sistema mesolímbico, quando medido por microdiálise. VENTURA, ALCARO & PUGLISI-ALLEGRA (2005) encontraram um resultado semelhante com a morfina. Utilizando o mesmo procedimento da depleção da via noradrenérgica do córtex pré-frontal do trabalho anterior, eles constataram que este procedimento aboliu tanto a expressão quanto o restabelecimento de uma preferência condicionada pelo lugar induzida pela morfina anteriormente extinta. Utilizando a técnica de microdiálise, os autores verificaram que a morfina aumentava a liberação da noradrenalina e da dopamina no córtex pré-frontal e da dopamina no núcleo acumbens. Contudo, a depleção seletiva da

via noradrenérgica do córtex pré-frontal aboliu o aumento da liberação de dopamina no acumbens induzida pela morfina. Um outro trabalho que mostrou que o sistema noradrenérgico modula a liberação da dopamina no sistema mesolímbico foi o de SCHANK *et al.* (2006). Trabalhando com camundongos-nocaute para a enzima dopamina- β -hidroxilase, a enzima responsável pela síntese da noradrenalina, os autores constataram que estes animais tinham níveis basais da dopamina significativamente menores no núcleo acumbens e no estriado dorsal, mas não no córtex pré-frontal, quando comparados com animais heterozigotos para a dopamina- β -hidroxilase. A liberação da dopamina, induzida por uma dose desafio aguda de anfetamina (2,5 mg/kg), foi drasticamente reduzida nos animais-nocaute para esta enzima no núcleo acumbens, e atenuada no estriado dorsal e no córtex pré-frontal. Esta diminuição da transmissão dopaminérgica nos camundongos-nocaute estava associada a uma hipersensibilidade dos receptores dopaminérgicos D1/D2 no acumbens e no estriado dorsal. Esta hipersensibilidade dos receptores dopaminérgicos estava diretamente ligada, por sua vez, ao aumento da sensibilidade dos animais-nocaute aos efeitos psicomotores, recompensadores e aversivos da cocaína, quando medidos pela atividade locomotora e pela preferência condicionada pelo lugar. Antagonistas dopaminérgicos (SCH 23390 e eticlopride) atenuaram a hipersensibilidade locomotora induzida pela cocaína nestes animais-nocaute.

Dois recentes estudos sugeriram que a via noradrenérgica do núcleo do trato solitário desempenha um importante papel na mediação das propriedades hedônicas das drogas aditivas (OLSON *et al.*, 2006). Utilizando camundongos-nocaute para a enzima dopamina- β -hidroxilase, estes autores verificaram que tais animais não eram capazes de expressar uma preferência condicionada pelo lugar induzida pela morfina. Contudo, esses mesmos animais foram capazes de expressar uma preferência condicionada pelo

lugar a um alimento, descartando a possibilidade de que a não expressão da preferência condicionada pelo lugar induzida morfina nestes animais-nocaute pudesse ser atribuída a um prejuízo do aprendizado. O estudo constatou que a administração sistêmica da DOPS (L,3,4, dihidroxifenilserina), que é um composto que pode ser convertido em noradrenalina na ausência da dopamina- β -hidroxilase, restabeleceu a expressão da preferência condicionada pelo lugar induzida pela morfina. Finalmente, foi constatado que a restituição viral da atividade da dopamina- β -hidroxilase no núcleo do trato solitário, mas não no locus coeruleus (outro importante agrupamento de neurônios noradrenérgicos), também restabeleceu a preferência condicionada pelo lugar induzida pela morfina.

Um resultado bastante semelhante foi encontrado por JASMIN, NARASIAH & TIEN (2006). Trabalhando também com camundongos-nocaute para a enzima dopamina β -hidroxilase, os autores constataram que os animais-nocaute para esta enzima não expressavam uma preferência condicionada pelo lugar induzida pela morfina, pela cocaína ou pelo inibidor da recaptação da dopamina bupropiona. Contudo, os camundongos-nocaute permaneceram expressando uma preferência condicionada pelo lugar induzida pelo alimento. A DOPS, quando administrado conjuntamente com a carbodopa, pode ser convertida em noradrenalina. Estes pesquisadores também verificam que a preferência condicionada pelo lugar a estas drogas foi restabelecida quando estes camundongos-nocaute foram tratados com DOPS associado com a carbodopa.

1.7) O papel da amígdala no aprendizado aversivo e apetitivo

A amígdala é a estrutura cerebral responsável pelo processamento e pelo armazenamento de informações com conteúdo emocional, sejam elas apetitivas (CARDINAL *et al.*, 2002) ou aversivas (LEDOUX, 2000). Os núcleos amigdalares,

que mediam a associação entre o estímulo condicionado e o incondicionado em tarefas com conteúdo emocional, são os núcleos basal, o lateral, o acessório basal e o central. Em outros esquemas de classificações, o núcleo basal da amígdala é denominado de basolateral, enquanto que o basal acessório é denominado de basomedial. O termo complexo basolateral engloba os núcleos lateral e basal e, às vezes, acessório basal, em conjunto (LEDOUX, 2000).

Desde o trabalho publicado por PHILIPS & LEDOUX (1992), que constatou que a lesão da amígdala prejudica a aquisição tanto do condicionamento do medo ao som quanto ao contexto, um grande número de trabalhos procurou identificar os núcleos da amígdala que estão envolvidos no aprendizado do condicionamento clássico do medo. MAREN (1999) constatou que a lesão neurotóxica da amígdala basolateral, antes do treino do condicionamento de medo ao contexto, prejudicou a aquisição do condicionamento dos animais, quando estes foram submetidos a um ou 25 pareamentos entre o contexto e o choque. No entanto, quando foram realizados 50 ou 75 pareamentos entre o contexto e o choque, os animais com a lesão da amígdala basolateral apresentaram um desempenho normal, semelhante ao dos animais-controle. Ao contrário do que foi observado com a lesão pré-treino, a lesão da amígdala basolateral, um dia após o treino, prejudicou a expressão deste condicionamento tanto nos animais submetidos a um ou a 75 pareamentos no condicionamento contextual do medo. Já em relação ao condicionamento do medo ao som, este estudo verificou que, tanto a lesão antes do treino quanto a lesão após o treino prejudicaram a expressão em um teste de retenção subsequente. Este estudo mostrou que a lesão da amígdala basolateral só interfere com a aquisição do condicionamento contextual do medo quando o animal não é submetido a um treinamento intenso. O treinamento excessivo

faz com que seja ativada uma outra via, independente da amígdala, que mediará a aquisição do aprendizado para esta tarefa.

As interações entre a amígdala basolateral e o núcleo acumbens são parte de um sistema neural que está intimamente relacionado com o processamento das recompensas. EVERITT *et al.* (1991), utilizando a tarefa de preferência condicionada pelo lugar, forneceram evidências de que as interações entre a amígdala basolateral e o núcleo acumbens medeiam os processos relacionados à recompensa. Neste experimento, os ratos privados de comida foram condicionados a associar um ambiente a uma solução de 20% de sacarose. Após o treinamento, eles foram submetidos a lesões bilaterais na amígdala basolateral, no acumbens, e a uma lesão unilateral na amígdala basolateral associada a uma lesão contra-lateral no acumbens. Os resultados mostraram que, tanto a lesão bilateral da amígdala basolateral quanto a lesão bilateral do acumbens, prejudicaram a expressão de uma preferência condicionada pelo lugar induzida pela sacarose. A lesão unilateral da amígdala basolateral, associada a uma lesão contra-lateral do acumbens, também prejudicou a expressão da preferência condicionada pelo lugar induzida pela sacarose, mostrando que a via amígdala basolateral-acumbens é importante para o aprendizado relacionado à recompensa. No que diz respeito às drogas de abuso, vários estudos mostram que a amígdala basolateral também está envolvida com o efeito recompensador das mesmas. DI CIANO & EVERITT (2004), utilizando um procedimento de desconexão farmacológica, no qual a injeção unilateral de um antagonista dopaminérgico (α -flupentixol) na amígdala basolateral associada com uma injeção unilateral contra-lateral de um antagonista do receptor AMPA-cainato (LY 293558) no núcleo acumbens, reduziu significativamente o comportamento de busca pela cocaína.

A expressão da proteína fos, um marcador da atividade neuronal, tem sido utilizada para identificar os substratos neurais que mediam os efeitos recompensadores das drogas de abuso. MILLER & MARSHALL (2005) verificaram que o teste de uma preferência condicionada pelo lugar induzida pela cocaína aumentou a expressão de fos na amígdala basolateral, no córtex pré-límbico e no “core” do acumbens. Já em relação à anfetamina, RADEMACHER *et al.* (2006) verificaram que a expressão de uma preferência condicionada pelo lugar induzida por este psicoestimulante estava associada a um aumento da densidade das células imunorreativas para c-fos na amígdala basolateral e no hipocampo. Assim, ambos os estudos comprovaram que a amígdala basolateral é necessária para a expressão de uma preferência condicionada pelo lugar induzida pela cocaína e pela anfetamina. Neste mesmo sentido, HARRIS & ASTON-JONES (2003) verificaram que o aumento da preferência condicionada pelo lugar induzida pela morfina após uma abstinência prolongada estava associada a um aumento da expressão de c-fos na amígdala basolateral.

O sistema colinérgico da amígdala basolateral também desempenha um importante papel na aquisição, na consolidação e na extinção da tarefa de preferência condicionada pelo lugar associada ao alimento e à anfetamina (SCHROEDER & PACKARD, 2002 e SCHROEDER & PACKARD, 2004)

Os estudos com inativação indicaram que a amígdala basolateral desempenha um importante papel na aquisição, na consolidação, na expressão de uma preferência condicionada pelo lugar (HSU, SCHROEDER & PACKARD, 2002). Este estudo constatou que a inativação da amígdala basolateral com bupivacaína antes do treino, imediatamente depois do treino e antes do teste de retenção prejudicou, respectivamente, a aquisição, a consolidação e a expressão de uma preferência condicionada pelo lugar induzida pela anfetamina. Já RIZOS, OVARI & LERI (2006)

verificaram que a inativação da amígdala basolateral com uma combinação dos agonistas GABA-érgicos muscimol e baclofen, 15 minutos após a sessão de condicionamento, bloqueou completamente a reaquisição de uma preferência condicionada pelo lugar induzida pela heroína anteriormente extinta. MCLAUGHLIN & SEE (2003) e FUCHS *et al.* (2005) verificaram que, a inativação da amígdala basolateral com tetrodotoxina (um bloqueador de canal de cálcio) impedia o restabelecimento de um comportamento de busca tanto pela cocaína quanto para a heroína já extintos, induzida tanto por um estímulo discreto (som e luz) quanto por um complexo (contexto). Um outro estudo realizado por KANTAK *et al.* (2002) sugeriu que nos ratos, as porções rostral e caudal da amígdala basolateral desempenham diferentes papéis na manutenção e no restabelecimento de um comportamento de busca pela cocaína. Neste estudo, utilizando o modelo da auto-administração, os autores mostraram que a inativação, tanto da porção caudal quanto da rostral da amígdala basolateral com lidocaína, atenuaram o restabelecimento de um comportamento de busca pela cocaína induzido por pistas ambientais (som mais luz) associados a uma dose desafio desta droga. No entanto, apenas a inativação da porção rostral da amígdala basolateral bloqueou o restabelecimento induzida apenas por uma pista ambiental associada à cocaína. As diferenças adicionais foram constatadas durante o teste de manutenção, em que apenas a inativação da região caudal da amígdala basolateral atenuou o comportamento da busca por esta droga.

Estudos eletrofisiológicos também indicam que os neurônios da amígdala basolateral são ativados ou inibidos durante a auto-administração da cocaína. CARELLI, WILLIAMS & HOLLANDER (2003) verificaram que um agrupamento neuronal da amígdala basolateral estava ativado até 2,5 segundos antes de o animal pressionar a alavanca. Um outro grupo de neurônios foi ativado 2,5 segundos depois da

emissão da resposta (pressionar a alavanca para receber uma dose endovenosa de cocaína). Finalmente, um terceiro grupo neuronal estava inibido dentro de 2,5 segundos antes e depois do animal pressionar a alavanca. Contudo, o achado mais interessante deste estudo foi o de que, o agrupamento de neurônios que foi ativado logo após o animal pressionar a alavanca para receber a cocaína, também foi ativado por um estímulo audiovisual associado com a disponibilidade da droga.

Embora a maioria dos trabalhos da literatura indique que a amígdala basolateral desempenha um importante papel no aprendizado da associação entre pistas do ambiente e o efeito reforçador das drogas de abuso, HIROI & WHITE (1991) obtiveram resultados opostos, pois, segundo eles, a amígdala basolateral não é necessária para a aquisição de uma preferência condicionada pelo lugar. O estudo verificou que lesões eletrolíticas da amígdala basolateral, realizadas antes do condicionamento, não prejudicaram a aquisição de uma preferência condicionada pelo lugar induzida pela anfetamina. O mesmo trabalho mostrou que as lesões da amígdala lateral, antes ou depois do condicionamento, prejudicaram, respectivamente, a aquisição e a expressão daquela tarefa. Para os autores, a estrutura responsável pela evocação e pelo armazenamento das associações estímulo-recompensa é o núcleo lateral da amígdala, e não o basolateral. Um outro estudo, realizado por FUCHS *et al.* (2001), mostrou que a lesão da amígdala basolateral antes do treino prejudica a aquisição de uma preferência condicionada pelo lugar induzida pela cocaína. Contudo, as lesões feitas após o condicionamento neste núcleo não prejudicaram a expressão da referida tarefa, sugerindo que as memórias relacionadas às recompensas não ficam armazenadas na amígdala basolateral. ALDERSON, ROBBINS & EVERITT (2000) sugeriram que a lesão da amígdala basolateral não prejudica a aquisição de um comportamento de busca pela heroína, nem sob um esquema de reforço contínuo, nem sob um esquema de

segunda ordem, no qual o animal aprende a associar um estímulo discreto (luminoso) com a infusão endovenosa da droga. Este estudo concluiu que a amígdala basolateral não medeia os efeitos recompensadores dos opióides e que as pistas discretas associadas à heroína não são críticas para o comportamento de busca por esta droga, sendo que outros sistemas de aprendizado estariam envolvidos no controle de tal comportamento.

1.8) A reconsolidação dependente da síntese protéica e da noradrenalina na tarefa de preferência condicionada pelo lugar

A reconsolidação é um fenômeno muito estudado em tarefas aversivas. No entanto, um estudo anterior, realizado por PRZBYSLAWSKI, ROULLET & SARA (1999) constatou que é possível bloquear a reconsolidação de uma tarefa do labirinto radial utilizando como recompensa alimento através da administração sistêmica do propranolol. Da mesma forma, DIERGAARDE, SCHOFFELMEER & DE VRIES (2006) verificaram que o propranolol também bloqueia a reconsolidação de uma memória instrumental relacionada à recompensa. O fato de o fenômeno da reconsolidação ocorrer não apenas em tarefas aversivas, mas também nas apetitivas, abre a possibilidade de se estudar este fenômeno em modelos animais utilizados para a investigação das propriedades recompensadoras/ reforçadoras das drogas de abuso no processo de condicionamento provocado pelo pareamento destas com estímulos ambientais associados a elas. De fato, alguns estudos recentes, utilizando inibidores de síntese protéica, mostraram que é possível interferir com memórias relacionadas às drogas de abuso. Assim, LEE *et al.* (2005) verificaram que a injeção da anisomicina na amígdala basolateral, imediatamente depois da reativação, prejudicou a associação entre um estímulo condicionado (luz) e a cocaína. Além disso, a injeção 90 minutos antes da reativação de um anti-sense para *zif 268* (gene de expressão imediata importante para o aprendizado e memória) também prejudicou a reconsolidação da tarefa instrumental de

busca pela cocaína. Estudos recentes sugerem que a tarefa da preferência condicionada pelo lugar também pode sofrer reconsolidação dependente da síntese protéica. MILLER & MARSHALL (2005) verificaram que, a expressão da preferência condicionada pelo lugar induzida pela cocaína ativa a ERK (quinase regulada por sinais extracelulares) e dois fatores de transcrição, o CREB e a Erk-1 no ‘core’ do acumbens, mas não no ‘shell’. A injeção do inibidor da ERK quinase MEK U0126 no “core” do acumbens, 30 minutos antes do teste de preferência condicionada pelo lugar induzida pela cocaína, impediu a ativação da ERK, do CREB e da Erk-1 e também a evocação desta preferência. Portanto, estes sinalizadores intracelulares medeiam a expressão da preferência condicionada pelo lugar induzida pela cocaína. Um outro achado muito importante foi o de que a injeção dos inibidores da ERK U0126 e PD 98059 no ‘core’ do acumbens, 30 minutos antes da reativação da memória, prejudicou a expressão da preferência condicionada pelo lugar em um teste posterior. Um outro trabalho, publicado por VALJENT *et al.* (2006), revelou que a administração sistêmica do inibidor da ativação da ERK, o SL 327, imediatamente após a reativação, aboliu a expressão de uma preferência condicionada ao lugar induzida pela morfina e pela cocaína em um teste subsequente. Contudo, ao contrário de MILLER & MARSHALL (2005), que verificaram que a desestabilização da memória de preferência pelo lugar após a reativação desta ocorreu na ausência da droga (estímulo incondicionado), VALJENT *et al.* (2006) constataram que a sua desestabilização só ocorreu quando a droga foi apresentada em conjunto com o ambiente pareado com esta. Em outras palavras, a desestabilização da memória só ocorreu quando o animal estava sob o efeito da droga no momento da reativação. A re-exposição ao compartimento pareado com a cocaína na presença do inibidor da ERK, também inibiu a fosforilação da ERK e do receptor de glutamato-1 no acumbens, no estriado dorsal e no córtex pré-frontal durante

o reteste de uma preferência condicionada ao lugar, realizada 24 horas após a sessão de reativação.

O principal objetivo deste trabalho foi verificar a possibilidade de bloquear a reconsolidação de uma tarefa de preferência condicionada pelo lugar através de duas metodologias diferentes: a) inibição da síntese protéica na amígdala basolateral; b) administração sistêmica do propranolol. Estes dois tratamentos sabidamente prejudicam a reconsolidação em outras tarefas de aprendizagem e memória.

Primeiramente, procurou-se responder à questão de se seria possível que a injeção da anisomicina na amígdala basolateral (uma estrutura que medeia os diferentes estágios do aprendizado apetitivo) imediatamente após a reativação da memória de preferência condicionada pelo lugar induzida pela morfina, causaria um prejuízo do desempenho nestes animais num teste subsequente por bloquear a reconsolidação dependente da síntese protéica. Na segunda parte deste trabalho procurou-se verificar se o propranolol, quando administrado sistemicamente, bloquearia a reconsolidação de uma preferência condicionada pelo lugar induzida pela morfina.

2. OBJETIVOS

3.1) Objetivos gerais

a) verificar os efeitos da injeção do inibidor da síntese protéica anisomicina na amígdala basolateral, imediatamente após a reativação da memória da preferência condicionada pelo lugar induzida pela morfina, em teste posterior realizado 24 horas depois;

b) avaliar os efeitos da administração sistêmica do propranolol logo após a reativação da memória da preferência condicionada ao lugar induzida pela morfina em animais submetidos a diferentes regimes de condicionamento e de reativação.

3. EXPERIMENTOS REALIZADOS

Experimento 1- Efeitos da infusão do inibidor de síntese protéica anisomicina na amígdala basolateral após a reativação sobre a expressão de uma preferência condicionada ao lugar induzida pela morfina.

3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.1 Animais

Os animais utilizados foram ratos Wistar, pesando entre 250-350 gramas, e com aproximadamente 90 dias de idade no início dos experimentos. Eles foram alojados em grupos de dois, em gaiolas de polipropileno opacas (41x34x16), contendo serragem e mantidos numa sala com temperatura (22° C) e ciclo claro-escuro (claro das 7:00 - 19:00 hs) controlados. A comida e a água estavam disponíveis *ad libitum*. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP 0188/03) da instituição.

3.1.2 Drogas

O cloridrato de morfina (cedida pela Polícia Federal) foi dissolvido em solução salina a 0,9% e administrado na dose de 7,5 mg/kg (ip). A anisomicina (Sigma, St. Louis, MO) foi primeiramente dissolvida em 3 N HCl, diluída em tampão fosfato-salina (TFS) e ajustada para o pH 7,2 com 3 N NaOH. Os animais-controle foram ministrados com tampão fosfato-salina. A anisomicina foi administrada na amígdala basolateral na concentração de 62,5 µg/µl e volume de 1 µl/lado. Os animais-controle receberam um volume equivalente do tampão fosfato-salina (pH=7,2). A dose de anisomicina escolhida foi baseada no trabalho de NADER *et al.* (2000), o qual constatou que esta dose bloqueia a reconsolidação do condicionamento do medo ao som.

3.1.3 Aparato de preferência condicionada pelo lugar

Foram utilizadas 6 caixas de preferência condicionada ao lugar (figura 1) Cada uma delas consistiu em uma caixa acrílica dividida em dois compartimentos de tamanhos iguais (23 cm x 22,5 cm x 22 cm de altura), tendo um deles paredes cinzas com círculos brancos e um piso áspero, enquanto o outro tinha as paredes listradas de cinza e branco e um piso liso. Os compartimentos eram separados entre si por uma porta-guilhotina.



FIGURA 1: Aparato de preferência condicionada pelo lugar

3.1.4 Aparato do condicionamento do medo ao contexto

O aparato do condicionamento do medo ao contexto (figura 2) consistiu em uma caixa acrílica medindo 30 cm x 21 cm x 30 cm. As paredes da caixa eram pretas com padrões visuais brancos (dois quadrados medindo 5,5 cm x 5,5 cm e três quadrados 4,0 cm x 4,0 cm feitos com cartolina branca). A parte superior da caixa era coberta com

uma tampa de acrílico transparente. O chão consistia em uma grade de metal (barras de 0,4 cm de diâmetro separadas umas das outras por 1,2 cm) conectada a um gerador de choque e a um módulo de controle (modelo Ugo Basile CAT7551), para a aplicação de choques nas patas dos animais.



FIGURA 2: Aparato de condicionamento do medo ao contexto

3.1.5 Cirurgia estereotáxica e microinfusão

Os ratos foram anestesiados com uma combinação de quetamina (90 mg/kg,i.p) e xilazina (5 mg/kg,i.p) e posicionados no aparelho estereotáxico (David Kopf Instruments, Tuyunga, CA) para o implante bilateral de cânulas-guia de aço (23 medidas), que foram inseridas até ficarem 1 milímetro acima da amígdala basolateral.

As coordenadas para o implante das cânulas-guia foram A-P= 2,8; M-L= \pm 4,7 e D-V= -7,5 milímetros em relação ao bregma (PAXINOS, 1997). As cânulas foram fixadas com cimento poliacrílico e presas ao crânio com parafusos de aço. Um mandril foi colocado na cânula-guia para impedir o seu entupimento. Os animais permaneceram em recuperação pós-cirúrgica durante pelo menos uma semana antes de serem utilizados nos procedimentos experimentais. Para as microinfusões, o mandril foi retirado da cânula-guia, tendo os animais sido gentilmente seguros para que uma agulha injetora removível fosse inserida nas cânulas-guia, estendendo-se 1 milímetro além da ponta das mesmas. A injetora, via tubo de polietileno PE 10, estava conectada a uma seringa Hamilton de 10 μ l que era controlada por uma bomba de microinfusão (Insight, Ribeirão Preto, Brasil). O volume de 1 μ l foi injetado por um período de 4 minutos (0,25 μ l/min) tendo a injetora sido mantida no local por um período adicional de dois minutos após a infusão, a fim de se minimizar o refluxo do volume injetado.

3.1.6 Histologia

Após o término dos procedimentos comportamentais, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (1,0 ml), sacrificados e seus cérebros foram retirados, congelados, e posteriormente, cortados em um criostato (cortes de 40 μ m). Estes cortes foram montados em lâminas, secados e corados com cresil-violeta para a verificação da trajetória das cânulas-guia. Apenas animais cujas cânulas-guia estavam situadas bilateralmente na amígdala basolateral foram incluídos na análise estatística.

3.1.7 Procedimentos comportamentais gerais

3.1.7.1 Preferência condicionada pelo lugar

Para que fosse induzida uma preferência condicionada pelo lugar associada à morfina, os animais foram submetidos às fases de habituação, de condicionamento e de teste. Os procedimentos utilizados nas fases da habituação, do condicionamento e do teste foram idênticos em todos os experimentos, sendo cada um deles descritos a seguir.

Habituação

No dia primeiro dia, os animais foram colocados, de forma alternada, em um dos dois compartimentos. Metade dos animais foi colocada no compartimento listrado de branco e cinza, enquanto que a outra metade foi colocada no compartimento cinza com bolas brancas. A porta guilhotina foi então removida, e permitiu-se que os animais explorassem o aparato por 15 minutos e mediu-se o tempo em que eles permaneceram em cada um dos compartimentos.

Condicionamento

A fase do condicionamento foi conduzida em seis sessões, sendo que os animais foram submetidos a duas por dia. Uma vez que os animais apresentaram na fase de habituação uma preferência natural por um dos compartimentos do aparato, foi utilizado um procedimento ‘biased’ de condicionamento. Desta forma, o condicionamento com a morfina foi sempre feito no compartimento menos preferido, sendo este definido como o compartimento onde os ratos, durante a fase de habituação, passaram menos de 50% do tempo total da sessão (tempo total de 900 segundos). Por outro lado, o condicionamento com salina foi sempre feito no compartimento preferido, definido

como o compartimento onde os animais passaram mais do que 50% durante a fase de habituação.

No primeiro dia, houve uma sessão durante a manhã (8:00-11:00 hs), na qual os animais receberam uma injeção intraperitoneal de cloridrato de morfina (7,5 mg/kg), tendo sido, imediatamente depois, confinados, por 50 minutos, nos compartimentos menos preferidos durante a habituação. Após um intervalo de 6 horas, na sessão da tarde, (14:00-17:00 hs) os animais receberam uma injeção intraperitoneal de um volume equivalente de salina, tendo sido, logo depois, confinados nos compartimentos mais preferidos durante a habituação por 50 minutos. No segundo dia, os animais foram pareados com salina durante a sessão da manhã, enquanto que o pareamento com morfina ocorreu na sessão da tarde. Já no terceiro dia, o pareamento foi idêntico ao realizado no primeiro dia. Assim, no total, cada animal foi submetido a três pareamentos com morfina e três com salina.

Teste de reativação sem confinamento

Este teste serviu para que o animal reativasse a sua memória em relação aos compartimentos associados com a morfina e com a salina. A porta guilhotina foi levantada e os animais, em um estado livre da droga, foram colocados, de forma alternada, no compartimento cinza com bolas brancas ou no listrado, com livre acesso, por 15 minutos, aos 2 compartimentos. O tempo passado em cada compartimento foi registrado por um observador que não sabia a qual grupo o animal pertencia. O tempo gasto no compartimento listrado de cinza e branco foi registrado para cada animal e comparou-se o tempo gasto no compartimento pareado com a morfina durante a fase da

habituação (antes do condicionamento) e do teste de reativação (após o condicionamento).

Teste

O procedimento do teste foi idêntico ao utilizado no teste de reativação sem confinamento, ou seja, os animais tiveram livre acesso aos dois compartimentos da caixa de condicionamento durante 15 minutos e registrou-se o tempo em que os animais permaneceram no compartimento pareado com a morfina e com a salina.

3.1.7.2 Condicionamento de medo ao contexto

A tarefa foi realizada por dois dias consecutivos. No primeiro dia (treino), os animais foram colocados individualmente na caixa de condicionamento, onde eles permaneceram por 5 minutos. O tempo que cada animal permaneceu em postura de congelamento, definido como uma completa imobilidade e ausência de movimentos nas vibrissas e farejamento, foi registrado, continuamente, minuto a minuto, por 5 minutos. Após este período, os ratos receberam dois choques nas patas (1 mA, 1 s de duração), com um intervalo de 30 segundos entre os mesmos. Logo após o segundo choque, os animais foram retirados do aparato e receberam uma infusão de anisomicina (62,5 µg em um volume de 1µl/lado) ou de fosfato-salina na amígdala basolateral. Após esta injeção, os ratos foram novamente colocados em suas gaiolas-moradia. O teste de condicionamento foi feito no segundo dia, 24 horas após o treino. Os ratos foram colocados no mesmo contexto de treino, mas nenhum choque na pata foi aplicado. O tempo gasto em postura de congelamento foi registrado, continuamente, minuto a minuto, por 5 minutos.

3.1.7.3 Atividade Locomotora

A atividade locomotora foi medida durante as fases da habituação, do teste e do reteste. Um observador mediu o número de vezes em que os animais passavam de um compartimento para o outro durante 15 minutos na caixa de condicionamento de preferência pelo lugar.

3.1.8 Análise estatística

Em todos os experimentos, a medida de condicionamento utilizada foi o tempo total gasto no compartimento pareado com a morfina durante as fases da habituação, do teste de reativação e do teste. A atividade locomotora foi avaliada pelo número de vezes em que os animais passavam de um compartimento para o outro durante as fases de habituação, teste de reativação e de teste. As informações foram expressas como a média \pm erro padrão da média (EPM). A análise das informações foi feita usando uma ANOVA de duas vias com um dos fatores repetido, com as fases (habituação, teste de reativação e de teste) e tratamento (anisomicina ou tampão fosfato-salina) como fatores. Quando necessário, uma análise post-hoc (Newman-Keuls) foi feita para avaliar as comparações grupo-específicas, considerando $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. As informações do condicionamento contextual do medo foram avaliadas utilizando uma ANOVA de duas vias com um dos fatores repetidos, com grupos (anisomicina e fosfato-salina) e minutos como fatores principais. Quando necessário, a análise foi seguida pelo teste post-hoc de Newman-Keuls.

3.2) DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS COMPORTAMENTAIS

3.2.1) Experimento 1A - Efeitos da infusão da anisomicina na amígdala basolateral imediatamente após a reativação da memória da preferência condicionada pelo lugar num teste subsequente.

3.2.1.1 Delineamento experimental

Foram utilizados 17 animais neste experimento, o qual consistiu nas fases de habituação, de condicionamento, de teste de reativação e de teste. Este protocolo foi o mesmo utilizado por REZAYOF *et al.* (2003), no qual os animais são submetidos a uma sessão de reativação que ocorre somente na presença do estímulo condicionado (ambiente pareado com a morfina), em um procedimento que se assemelha àquele usado em experimentos do medo condicionado (DEBIEC *et al.*, 2002; NADER *et al.*, 2000). Assim, a reativação consistiu em um teste, no qual os animais tiveram livre acesso aos dois compartimentos do aparato, em um estado livre da droga. Imediatamente após este teste de reativação, os animais receberam uma infusão bilateral de anisomicina (62,5 µg/1 µl/lado, n=9) ou um volume equivalente de tampão fosfato-salina (n=8) na amígdala basolateral, após o que retornaram para suas gaiolas-moradia. No dia seguinte, os animais foram testados para as suas preferências em relação aos compartimentos pareados com a morfina ou com a salina. Neste experimento, a reativação não ocorreu com os animais confinados em um dos compartimentos. O desenho experimental pode ser esquematizado da seguinte forma:

habituação. Contudo, nenhuma diferença estatística foi encontrada entre os grupos $F_{(1,15)} = 0,17$; $p=0,68$) e nenhuma interação foi encontrada entre as fases e os grupos ($F_{(2,30)} = 2,16$; $p=0,13$).

Este resultado indicou que os animais aprenderam a associar o ambiente com a droga, uma vez que eles passaram significativamente mais tempo no compartimento pareado com morfina no teste de reativação e no teste quando comparados em relação à habituação. Contudo, este experimento também revelou que não houve reconsolidação dependente da síntese protéica na amígdala basolateral, uma vez que a injeção da anisomicina, após a reativação (teste), não prejudicou, em um teste realizado 24 horas depois, o desempenho dos animais em relação ao grupo tampão fosfato-salina num reteste. Caso houvesse o fenômeno da reconsolidação dependente da síntese protéica, os animais que receberam a infusão intra-amigdalar da anisomicina logo após o teste de reativação apresentariam um prejuízo de desempenho no teste, quando comparados aos animais tampão fosfato-salina.

Atividade locomotora

Devido a um erro no registro da atividade locomotora, um animal do grupo fosfato-salina foi retirado do experimento da atividade locomotora. Assim, o grupo fosfato-salina ficou com um n de 7 animais, enquanto que o grupo anisomicina ficou com um n de 9. A média \pm EPM do número de vezes em que os animais do grupo tampão fosfato-salina passaram de um compartimento para o outro foram, respectivamente, de $17,75 \pm 2,6$; $16,29 \pm 3,0$ e $13,0 \pm 3,48$ durante as fases de habituação, de teste de reativação e de teste. Já para os animais que receberam uma infusão intra-amigdalar de anisomicina, o número médio de cruzamentos de um

compartimento para o outro foram de $16,89 \pm 1,5$; $16,89 \pm 1,19$ e $15,11 \pm 1,60$ durante estas mesmas fases. A ANOVA de duas vias, com grupos (fosfato-salina e anisomicina) e fases (habituação, teste de reativação e de teste) como fatores, revelou uma diferença significativa entre as fases ($F_{(2,28)}= 4,50$, $p < 0,05$). O teste post-hoc de Newman-Keuls revelou que os animais apresentaram na fase de habituação uma atividade locomotora significativamente maior em relação ao teste ($p=0,02$). Contudo, nenhuma diferença significativa foi encontrada entre grupos ($F_{(1,14)}= 0,39$; $p=0,54$) e nenhuma interação foi encontrada entre os grupos e as fases ($F_{(2,28)}= 0,51$; $p=0,23$).

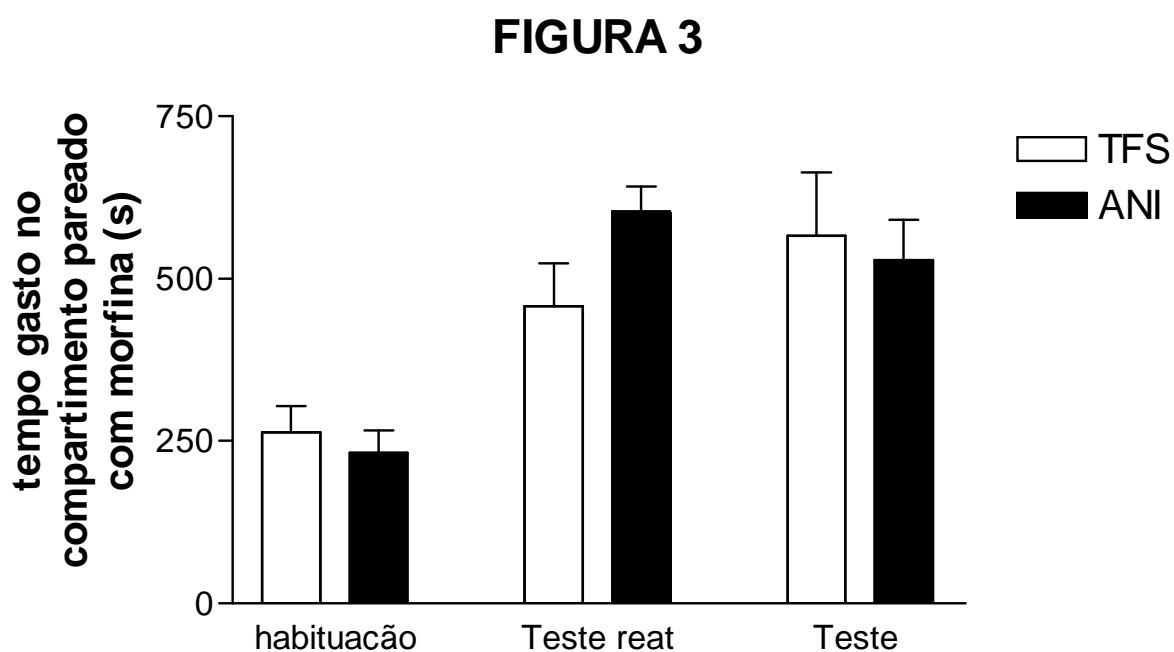


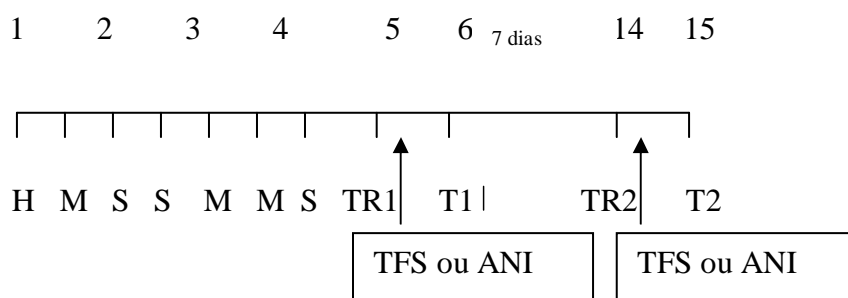
FIGURA 3: Tempo médio \pm EPM gasto no compartimento pareado com morfina durante as fases de habituação, teste de reativação e teste de animais que receberam uma infusão intra-amigdalar de $62,5 \mu\text{g}/1 \mu\text{l}$ de anisomicina (ANI, $n=9$) ou tampão fosfato-salina (TFS, $n=8$) imediatamente após o teste de reativação ($62,5 \mu\text{g}/1 \mu\text{l}/\text{lado}$) e retestados 24 horas depois. Os grupos não diferiram em qualquer fase do experimento (ANOVA de duas vias).

3.2.2) Experimento 1B- Efeitos da infusão da anisomicina na amígdala basolateral imediatamente após o teste de reativação, com o animal sob o efeito da morfina, sobre um teste subsequente

3.2.2.1) *Delineamento experimental*

Na tarefa de reconhecimento de objetos, BOZON *et al.* (2003) constataram que, os camundongos-nocaute para o gene de expressão imediata *zif 268*, mostraram prejuízo do desempenho nesta tarefa, após a reativação, somente quando o objeto foi apresentado num contexto previamente associado com o mesmo. Assim, é possível que a reconsolidação somente ocorra na tarefa da preferência condicionada pelo lugar quando, durante a reativação, o estímulo condicionado (contexto) é apresentado conjuntamente com o estímulo incondicionado (morfina). Para testar esta hipótese, os mesmos animais do experimento 1A foram usados neste experimento, tendo-se, 7 dias após o término deste, testado novamente os animais para a tarefa da preferência condicionada pelo lugar. Contudo, imediatamente antes do teste de reativação, eles receberam uma injeção intraperitoneal de cloridrato de morfina (7,5 mg/kg) e imediatamente depois, foram testados, respectivamente, para as suas preferências em relação aos compartimentos pareados com a morfina e a salina. Após este teste de reativação, metade dos animais que recebeu uma infusão intra-amigdalar do veículo no experimento 1A, recebeu uma infusão intra-amigdalar da anisomicina (62,5 µg/µl/lado, n=7), enquanto que a outra metade recebeu uma infusão intra-amigdalar de tampão fosfato-salina (n=8). O mesmo procedimento foi utilizado com os animais que receberam uma infusão intra-amigdalar de anisomicina no experimento 1A. Assim, metade dos animais que recebeu uma infusão intra-amigdalar de anisomicina no experimento 1A recebeu uma infusão intra-amigdalar de tampão fosfato-salina neste

experimento, enquanto que a outra metade restante recebeu uma infusão intra-amigdalar de anisomicina. No dia seguinte, os animais foram testados novamente para as suas preferências em relação aos compartimentos pareados com morfina ou salina. O delineamento experimental do experimento 1B é esquematizado abaixo:



H: habituação, com livre acesso aos dois compartimentos do aparato, por 15 minutos.

M: condicionamento no compartimento pareado com a morfina, 50 minutos de duração.

S: condicionamento no compartimento pareado com salina, 50 minutos de duração.

TR1: teste de reativação, livre acesso aos dois compartimentos durante 15 minutos.

T1: teste, livre acesso aos dois compartimentos por 15 minutos.

TFS ou ANI: infusão intra-amigdalar da tampão fosfato-salina ou anisomicina.

TR2: teste de reativação 2, livre acesso aos dois compartimentos por 15 minutos.

T2: teste 2, livre acesso aos dois compartimentos por 15 minutos.

3.2.2.2 Resultados

Preferência condicionada pelo lugar

A figura 4 mostra o tempo médio \pm EPM gasto no compartimento pareado com a morfina durante as fases de habituação, de teste de reativação 2 e de teste 2 dos animais que receberam uma injeção intraperitoneal de morfina (7,5 mg/kg) antes do teste de reativação 2, e que imediatamente depois deste, receberam uma infusão intra-amigdalar de anisomicina (ANI, 62,5 μ g/1 μ l/lado, n=7) ou de tampão fosfato-salina (TFS, n=8),

tendo sido testados 24 horas depois. A ANOVA de duas vias com um dos fatores repetidos revelou uma diferença significativa entre as fases ($F_{(2,26)} = 14,53$; $p < 0,001$). O teste post-hoc de Newman-Keuls revelou que o condicionamento com morfina induziu uma preferência condicionada pelo lugar por esta droga, uma vez que os animais passaram significativamente mais tempo no compartimento pareado com a morfina durante a fase de teste de reativação 2 quando comparados com a habituação ($p < 0,001$) e o teste 2 ($p < 0,01$). Entretanto, nenhuma diferença estatística significativa foi encontrada entre os grupos ($F_{(1,16)} < 0,001$; $p = 0,98$) e nenhuma interação foi encontrada entre os grupos e as fases ($F_{(2,26)} = 2,69$; $p = 0,08$).

Este resultado mostrou que a morfina induziu uma preferência condicionada pelo lugar, uma vez que os animais passaram, na fase de teste de reativação 2, significativamente mais tempo no compartimento pareado com a morfina quando comparado com as fases da habituação e do teste 2. No entanto, este experimento mostrou que, mesmo com os animais sob o efeito da morfina durante o teste de reativação, não houve reconsolidação dependente de síntese protéica na amígdala basolateral, uma vez que os animais do grupo anisomicina e do grupo fosfato-salina não diferiram no teste.

FIGURA 4

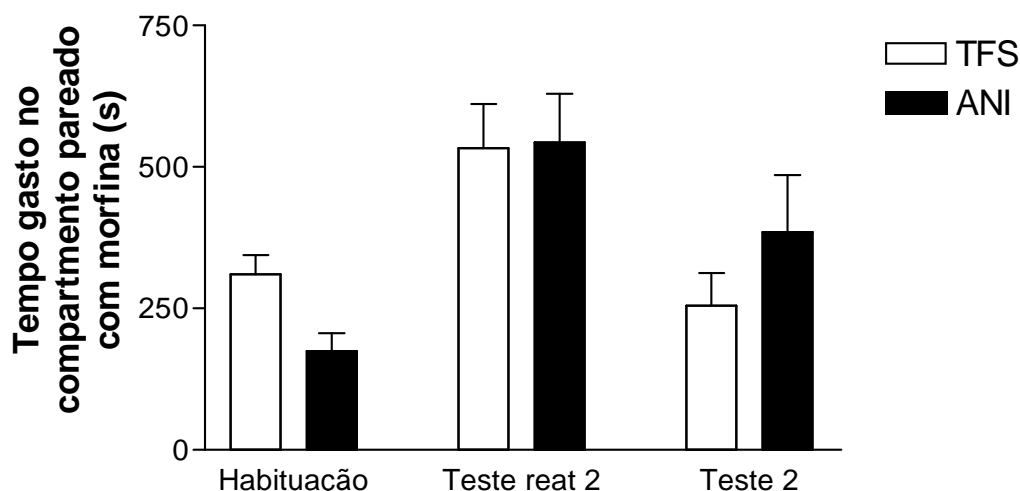


FIGURA 4: Tempo médio \pm EPM gasto no compartimento pareado com morfina durante as fases de habituação, de teste de reativação 2 e de teste 2, dos animais que receberam uma injeção intraperitoneal de morfina (7,5 mg/kg) antes do teste da reativação. Imediatamente após este teste, estes animais receberam uma infusão intramigdalilar de anisomicina (ANI, 62,5 μ g/1 μ l/lado n=7) ou de fosfato-salina (TFS, n=8), tendo sido testados 24 horas depois.

3.2.3 Experimento 1C- Efeitos da infusão de anisomicina na amígdala basolateral, imediatamente após uma sessão de reativação, que consistiu em confinar os animais no compartimento pareado com a morfina, com os animais sob o efeito desta droga, sobre um teste subsequente.

3.2.3.1) Delineamento experimental

Como o resultado do experimento 1B pode ter sido influenciado pelo fato dos animais utilizados neste experimento já não serem mais *naive*, foi utilizada uma maneira alternativa para apresentar conjuntamente, durante a sessão de reativação, o estímulo condicionado (ambiente) e o estímulo incondicionado (morfina). Assim, os animais

3.2.3.2) Resultados

Preferência condicionada pelo lugar

A figura 5 mostra o tempo médio \pm EPM gasto no compartimento pareado com morfina durante as fases de habituação e de teste para os ratos tratados com morfina (7,5 mg/kg; ip), e que receberam uma injeção intra-amigdalár de anisomicina (n=9) ou de tampão fosfato-salina (n=9) imediatamente após a sessão de reativação.

A ANOVA de duas vias com um dos fatores repetidos revelou diferenças estatísticas significativas entre as fases de habituação e de teste, ($F_{(1,16)}= 33,01$; $p < 0,001$). O teste post-hoc de Newman-Keuls revelou que o condicionamento com morfina induziu à preferência pelo lugar, uma vez que os animais passaram significativamente mais tempo no compartimento pareado com a morfina no teste, quando comparado com a habituação ($p=0,001$). Contudo, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre os grupos ($F_{(1,16)}= 0,02$; $p=0,87$) e nenhuma interação foi encontrada entre os grupos e as fases ($F_{(1,16)}=0,96$).

Este resultado mostrou que, novamente, a morfina induziu à uma preferência condicionada pelo lugar, uma vez que os animais, em relação à fase de habituação, passaram significativamente mais tempo no compartimento pareado com esta droga na fase de teste. Contudo, a infusão da anisomicina na amígdala basolateral imediatamente após o confinamento no compartimento pareado com a morfina, com o animal sob o efeito desta droga, não prejudicou o desempenho dos animais no teste quando comparado com o grupo tampão fosfato-salina. Este resultado novamente aponta no

sentido de não haver reconsolidação dependente da síntese protéica na amígdala basolateral, na tarefa de preferência condicionada pelo lugar.

Atividade locomotora

No que diz respeito à atividade locomotora, a média \pm EPM do número de vezes em que os animais passaram de um compartimento para o outro do grupo fosfato-salina foi de, respectivamente, $15,56 \pm 2,1$ e $22,44 \pm 1,37$ durante as fases de habituação e teste. Já em relação ao grupo anisomicina, a média \pm EPM do número de vezes em que os animais passaram de um compartimento para o outro, durante as fases de habituação e teste, foi de, respectivamente, $14,33 \pm 2,3$ e $18,00 \pm 2,5$. A ANOVA de duas vias revelou uma diferença estatisticamente significativa entre as fases ($F_{(1,16)}=4,58$; $p=0,04$). O teste post-hoc de Newman-Keuls mostrou uma diferença significativa entre as fases de habituação e de teste ($p=0,048$), mas não houve diferença estatística entre os grupos ($F_{(1,16)}=2,54$; $p=0,13$) e não houve interação entre os grupos e as fases ($F_{(1,16)}=0,42$; $p=0,52$).

FIGURA 5

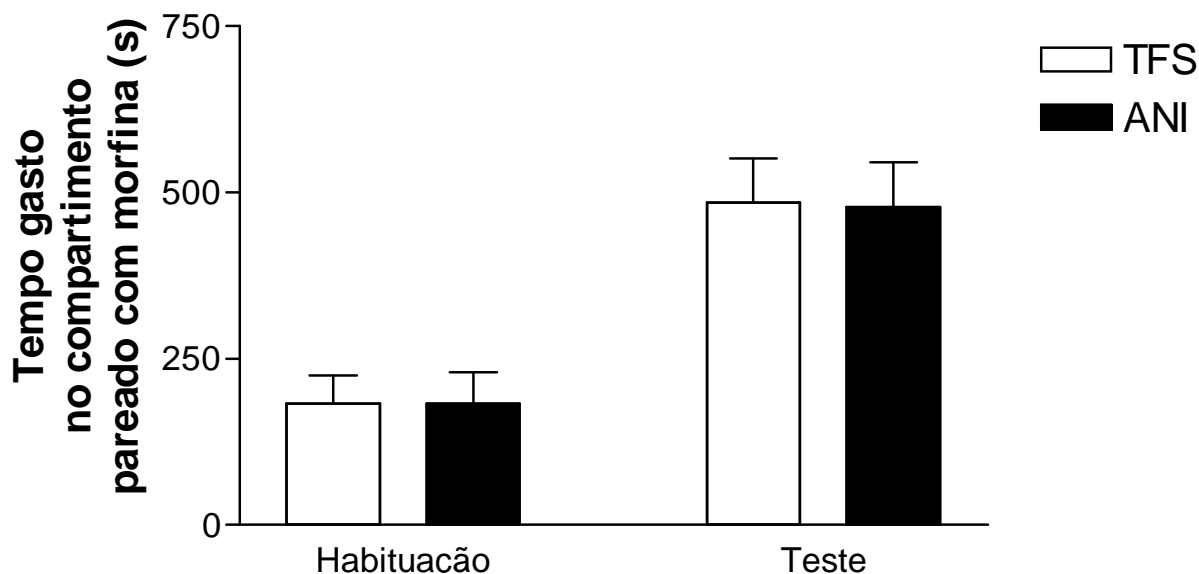


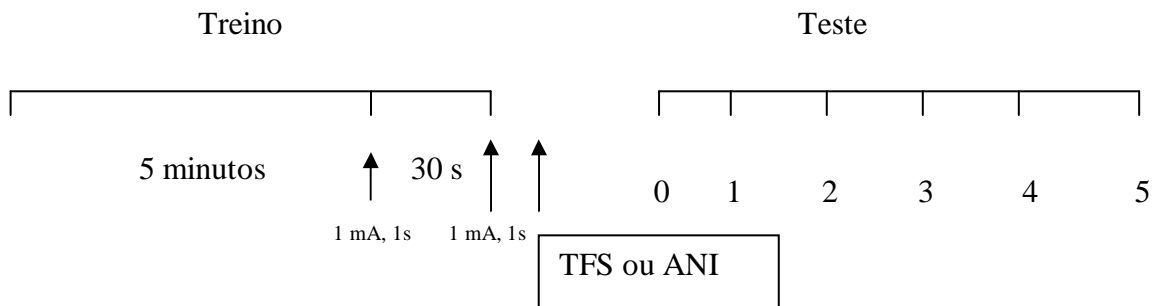
FIGURA 5: Tempo médio \pm EPM gasto no compartimento pareado com a morfina, durante as fases de habituação e de teste dos animais que receberam uma injeção intraperitoneal de morfina (7,5 mg/kg) antes de, por 10 minutos, serem confinados no compartimento pareado com esta droga. Imediatamente após o confinamento, eles receberam uma infusão intra-amigdalar de anisomicina (ANI, 62,5 μ g/1 μ l, n=9) ou de tampão fosfato-salina (TFS, n=9) tendo sido testados 24 horas depois. Os grupos não diferiram em qualquer fase do experimento (ANOVA de duas vias).

3.2.4) Experimento 1D- Efeitos da infusão de anisomicina na amígdala basolateral imediatamente após o treino sobre a consolidação do condicionamento de medo ao contexto.

3.2.4.1) Delineamento experimental

Após o término dos experimentos envolvendo a tarefa da preferência condicionada pelo lugar, foi realizado, em um novo grupo de animais, um experimento de condicionamento do medo ao contexto, para confirmar a ação da anisomicina sobre

a síntese protéica na amígdala basolateral. Assim, o condicionamento do medo ao contexto foi escolhido, como controle positivo, com base em um estudo de MAREN *et al.* (2003), no qual a infusão de anisomicina na amígdala basolateral, imediatamente após o treino, prejudica a consolidação da memória para esta tarefa. O desenho experimental está esquematizado abaixo:



3.2.4.2 Resultados

A infusão da anisomicina na amígdala basolateral induziu a um prejuízo na consolidação do condicionamento do medo ao contexto (figura 6), tendo havido um efeito grupo significativo ($F_{(1,12)} = 22,80$; $p < 0,001$). O teste post-hoc de Newman-Keuls mostrou que, os animais que receberam a infusão de anisomicina na amígdala basolateral, apresentaram significativamente menos tempo de congelamento do que os animais que receberam tampão fosfato-salina no dia do teste ($p < 0,01$). Os efeitos principais minuto ($F_{(4,48)} = 0,71$; $p > 0,1$) e interação (grupo x minuto) ($F_{(4,48)} = 0,63$; $p > 0,1$) não foram significativos.

O efeito prejudicial da infusão da anisomicina na amígdala basolateral sobre a consolidação da memória na tarefa de condicionamento do medo ao contexto mostra que a droga apresentava ação farmacológica. Portanto, os resultados negativos obtidos nos experimentos da preferência condicionada pelo lugar não se devem à ausência de ação farmacológica da anisomicina utilizada.

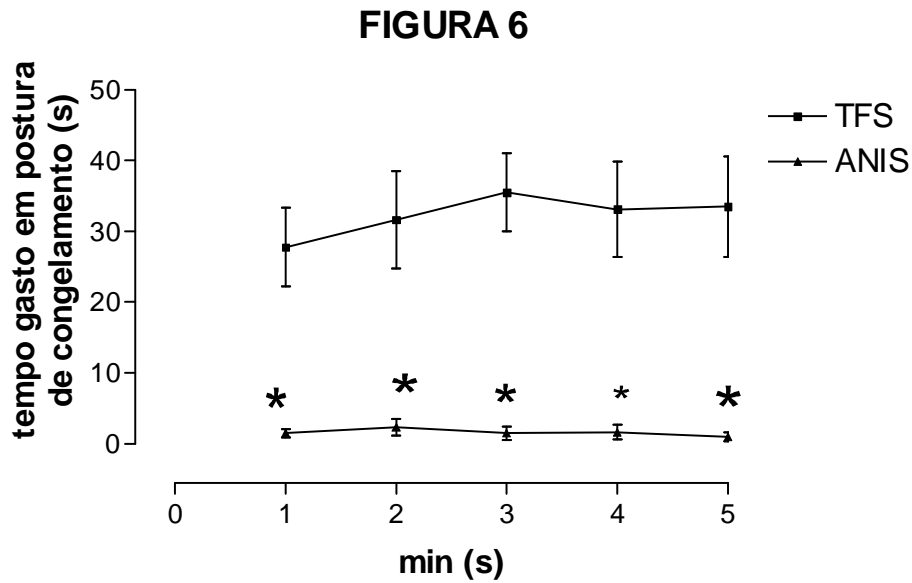


FIGURA 6: Efeitos da infusão pós-treino da anisomicina na amígdala basolateral sobre a resposta do congelamento de ratos no condicionamento do medo ao contexto. Tempo médio em congelamento \pm EPM dos grupos anisomicina (ANI, n=6) e tampão fosfato-salina, (TFS, n=8) no dia do teste, medido durante 5 minutos, minuto a minuto.

3.2.4) Resultados histológicos

A figura 7A mostra a localização bilateral das pontas das agulhas injetoras na amígdala basolateral. Já a figura 7B mostra uma a posição da agulha injetora dos animais que receberam uma infusão de tampão fosfato-salina na amígdala basolateral

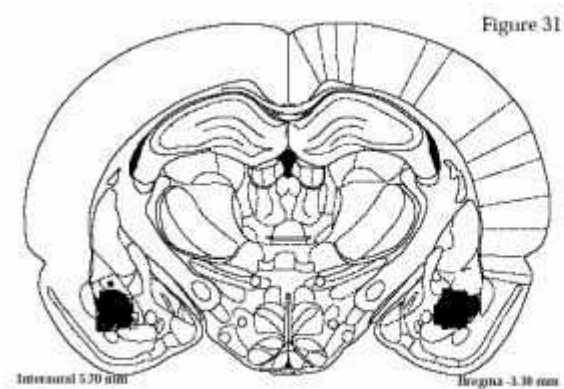
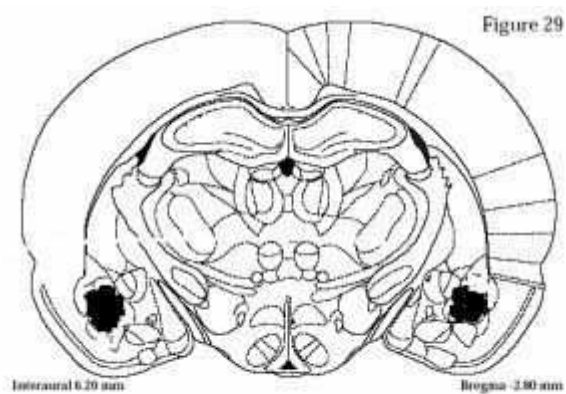
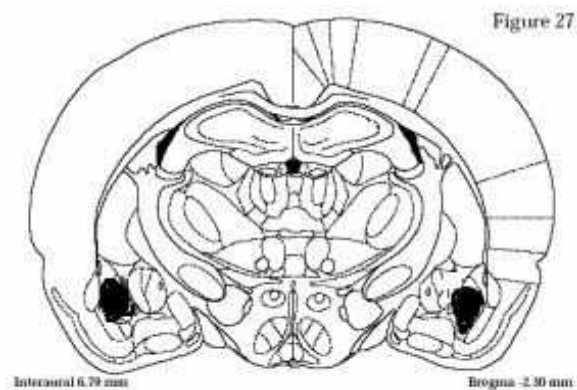


FIGURA 7A: Análise histológica: Cortes do cérebro mostrando a localização das pontas das agulhas injetoras dos animais que receberam uma infusão de anisomicina na amígdala basolateral, em três planos rostro-caudais diferentes (-2,30, -2,80 e -3,30 mm A-P ao bregma). As posições das cânulas nos outros experimentos mostraram distribuição semelhante e, portanto, não foram mostrados.

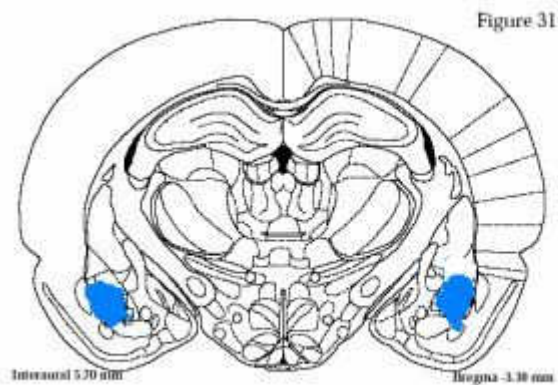
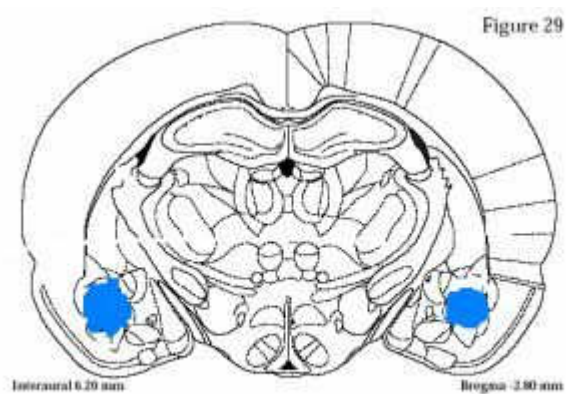
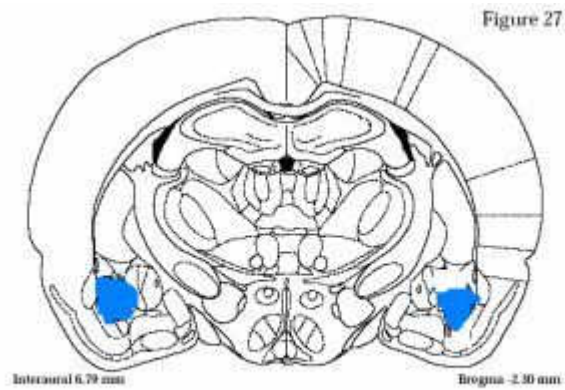


FIGURA 7B: Análise histológica: Cortes do cérebro mostrando a localização das pontas das agulhas injetoras dos animais que receberam uma infusão de fosfato-salina na amígdala basolateral, em três planos rostro-caudais diferentes (-2,30, -2,80 e -3,30 mm A-P ao bregma). As posições das cânulas nos outros experimentos mostraram distribuição semelhante e, portanto, não foram mostrados.

Experimento 2- Efeitos da administração sistêmica do propranolol, em diferentes regimes de condicionamento e reativação, sobre a expressão de uma preferência condicionada pelo lugar induzida pela morfina

3.3) MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1) Animais

Os animais utilizados foram ratos Wistar, pesando entre 250-350 gramas, e com aproximadamente 90 dias de idade no início dos experimentos, adquiridos na BIREME. Eles foram alojados em grupos de seis, em gaiolas de polipropileno opacas (41x34x16), contendo serragem e mantidos numa sala com temperatura (22° C) e ciclo claro-escuro (claro das 7:00 -19:00 hs) controlados. A comida e a água estavam disponíveis *ad libitum*.

3.3.2) Droga

DL-propranolol (Sigma-Aldrich, USA) foi dissolvido em solução salina e injetada intraperitonealmente nas doses de 10 ou 20 mg/kg. O mesmo volume de salina serviu como veículo para os animais-controle.

3.3.3 Aparato de preferência condicionada pelo lugar

O aparato de preferência condicionado pelo lugar utilizado neste experimento foi o mesmo do experimento 1.

3.3.4 Procedimentos comportamentais gerais

3.3.4.1 Preferência condicionada pelo lugar

Os procedimentos utilizados nas fases da habituação e do teste foram idênticos em todos os experimentos, sendo cada um deles descritos a seguir.

Habituação

Os procedimentos da habituação utilizados no experimento 2 foram idênticos aos do experimento 1.

Condicionamento

A fase de condicionamento nos experimentos 2A, 2D e 2 E foi conduzida em 6 sessões, sendo aplicada uma única sessão diária, com a morfina ou com a salina. Assim, na manhã do primeiro dia de condicionamento (8:00- 12:00 hs), os animais receberam um injeção intraperitoneal de morfina (7,5 mg/kg, ip) e, imediatamente depois, foram confinados, durante 30 minutos, nos compartimentos menos preferidos durante a habituação. No dia seguinte, os mesmos animais receberam um volume equivalente de salina (ip) e, logo depois, foram colocados, durante 30 minutos, nos compartimentos mais preferidos durante a habituação. Desta forma, foram realizados pareamentos alternados com a morfina e com a salina, sendo que cada animal foi submetido a três pareamentos com a morfina e três pareamentos com a salina.

O condicionamento nos experimentos 2B e 2C foi conduzida em 4 sessões, que foi iniciada 24 horas após a habituação. Nestas sessões, os animais receberam uma injeção de morfina (7,5 mg/kg, i.p) e, imediatamente depois, foram colocados nos compartimentos menos preferidos por 30 minutos. O condicionamento foi realizado na parte da manhã (8:00-12:00 horas), de modo todas as 4 sessões de condicionamento foram realizadas apenas no compartimento pareado com a morfina. Não houve pareamentos alternados com salina neste experimento.

Teste de reativação

O procedimento de teste de reativação utilizado no experimento 2 foi idêntico ao do experimento 1.

Teste

O procedimento de teste utilizado no experimento 2 foi idêntico ao do experimento 1.

3.3.4.2) Atividade locomotora

A atividade locomotora foi medida durante as fases da habituação, do teste e do reteste. Um observador mediu o número de vezes em que os animais passavam de um compartimento para o outro durante 15 minutos.

3.3.5) Análise estatística

A análise estatística empregada no experimento 2 para a preferência condicionada pelo lugar e para a atividade locomotora foi a mesma utilizada no experimento 1.

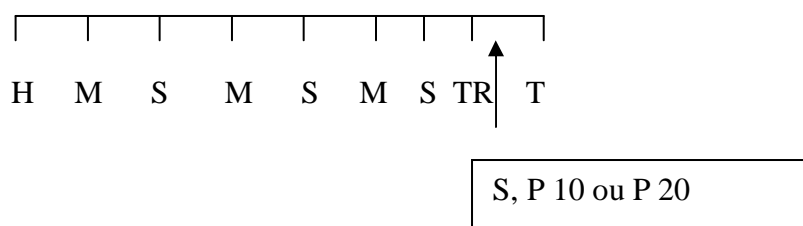
3.4) DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS COMPORTAMENTAIS

3.4.1) Experimento 2A-Efeitos da administração sistêmica do propranolol, imediatamente após a reativação da memória da preferência condicionada pelo lugar induzida pela morfina, em um regime de condicionamento tradicional e reativação consistindo em um teste com os animais tendo livre acesso aos compartimentos, em um estado livre da morfina, em um teste subsequente.

3.4.1.1) *Delineamento experimental*

Este experimento consistiu nas fases de habituação, de condicionamento, de teste de reativação e de teste. O procedimento da habituação e do condicionamento foi realizado conforme descrito em procedimentos comportamentais gerais. Um dia após a última sessão de condicionamento (dia 8), os animais foram testados para as suas preferências em relação aos compartimentos pareados com a salina e com a morfina. A porta guilhotina foi levantada e os animais, em um estado livre da droga, foram colocados no aparato com livre acesso a ambos os compartimentos por 15 minutos, tendo sido registrado o tempo em que os animais permaneceram em cada um deles.

Imediatamente após este teste de reativação, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de propranolol 10 mg/kg (n=10), 20 mg/kg (n=9) e salina (n=8) e retornaram para suas gaiolas-moradia. No dia seguinte (dia 9), estes animais foram novamente testados, em um procedimento idêntico à fase do teste de reativação. O procedimento experimental está esquematizado abaixo:



H: habituação, com livre acesso aos dois compartimentos do aparato, por 15 minutos.

M: condicionamento no compartimento pareado com a morfina, 30 minutos de duração.

S: condicionamento no compartimento pareado com salina, 30 minutos de duração.

TR: teste de reativação, livre acesso a ambos os compartimentos por 15 minutos.

S ou P 10 ou P 20: administração intraperitoneal de salina, 10,0 mg/kg ou 20,0 mg/kg de propranolol.

T: teste, livre acesso aos dois compartimentos, durante 15 minutos.

3.4.1.2 Resultados

Preferência condicionada pelo lugar

A figura 8 mostra o tempo médio \pm EPM gasto no compartimento pareado com a morfina durante as fases de habituação, de teste de reativação e de teste para os ratos que receberam uma injeção intra-peritoneal de propranolol (10,0 e 20,0 mg/kg) e salina imediatamente após o teste de reativação. A ANOVA de duas vias, com um dos fatores repetidos, tendo tratamentos (propranolol 10, propranolol 20 e salina) e fases

(habituação, teste e reteste) como fatores, revelou uma diferença estatisticamente significativa entre as fases ($F_{(2,48)}=14,84$; $p<0,001$). O teste post-hoc de Newman-Keuls revelou que os animais permaneceram significativamente mais tempo no compartimento pareado com a morfina durante as fases do teste de reativação ($p<0,001$) e do teste ($p<0,001$) quando comparada com a fase da habituação. Contudo, nenhuma diferença estatística foi encontrada entre os grupos ($F_{(2,24)}=0,37$; $p=0,69$) e nenhuma interação foi encontrada entre as fases e os grupos ($F_{(4,48)}=0,47$; $p=0,75$).

Este resultado mostrou que, num regime de condicionamento tradicional e sessão de reativação consistindo em permitir que os animais explorem livremente os dois compartimentos em um estado livre da droga, a administração sistêmica de propranolol (10,0 e 20,0 mg/kg) imediatamente após a reativação, não prejudicou o desempenho dos animais, num teste subsequente. Este resultado sugere que não houve reconsolidação dependente de receptores β -adrenérgicos na tarefa de preferência condicionada pelo lugar associada à morfina.

Atividade locomotora

Em relação à atividade locomotora, a média \pm EPM do número de vezes em que os animais passaram de um compartimento para o outro para o grupo salina foram, respectivamente, de $16,50 \pm 1,84$; $12,13 \pm 0,93$ e $11,25 \pm 1,13$ durante as fases de habituação, teste de reativação e de teste. Já para os animais que receberam uma dose de 10,0 mg/kg de propranolol, o número médio de cruzamentos de um compartimento para o outro foram durante estas mesmas fases, de $15,50 \pm 1,6$; $14,4 \pm 1,68$ e $7,80 \pm 1,04$. Finalmente, para o grupo que recebeu uma dose de 20 mg/kg de propranolol, as médias \pm EPM do número de vezes que os animais passaram de um compartimento para

o outro foram, respectivamente, de $18,0 \pm 2,26$; $18,56 \pm 2,60$ e $14,11 \pm 1,27$ para as fases de habituação, teste e reteste. A ANOVA de duas vias com grupos (salina, propranolol 10 e propranolol 20) e fases (habituação, teste de reativação e teste) como fatores revelou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos $F_{(2,26)}= 3,65$; $p=0,05$) e também uma diferença estatisticamente significativa entre as fases $F_{(2,,52)}= 14,18$; $p < 0,001$). Contudo, não foi encontrada interação entre grupos e fases $F_{(4,52)}= 1,44$; $p=0,18$). O teste post-hoc de Newman-Keuls revelou uma tendência de diferença estatisticamente significativa entre as os grupos salina e P 20 ($p=0,06$) e também entre os grupos P10 e P 20 ($p= 0,06$). Já com relação às fases, o teste post-hoc de Newman-Keuls mostrou uma diferença estatisticamente significativa entre a habituação e o teste ($p < 0,001$) e entre a habituação e o teste de reativação ($p < 0,001$).

FIGURA 8

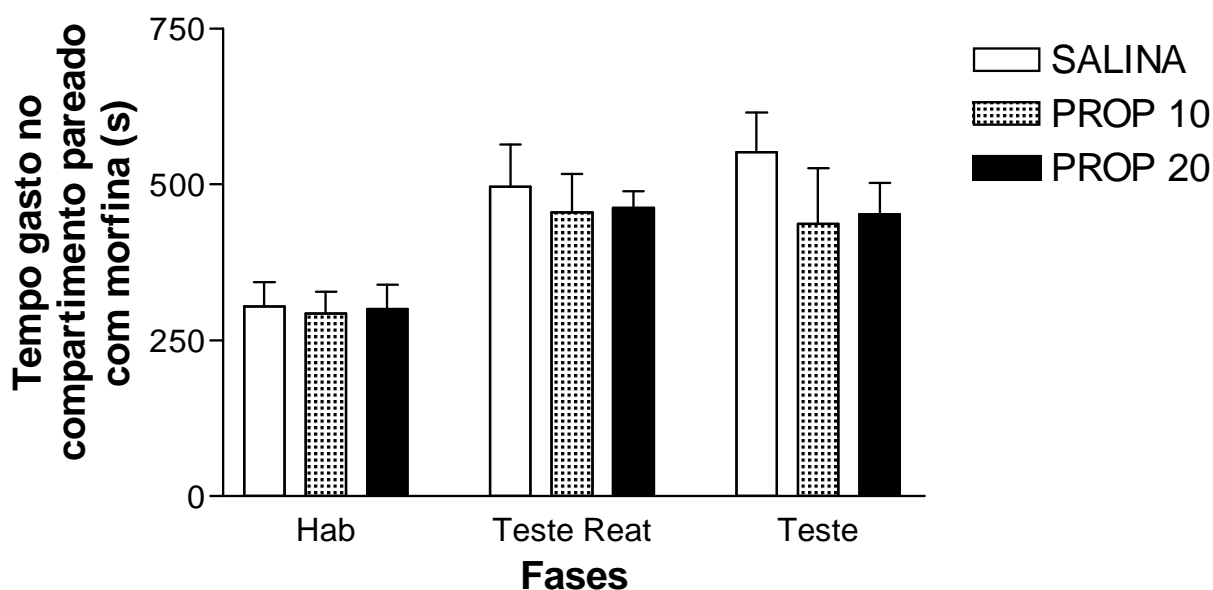


FIGURA 8: Tempo médio \pm EPM gasto no compartimento pareado com a morfina durante as condições de habituação, de teste de reativação e de teste, dos animais que receberam uma injeção intraperitoneal de salina (n=8), 10 mg/ kg de propranolol (n=10) e 20 mg/kg de propranolol (n=9), imediatamente após o teste de reativação. No dia seguinte ao teste, os animais foram retestados.

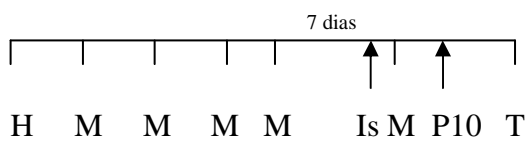
3.4.2) Experimento 2B-Efeitos da administração sistêmica de propranolol, após a reativação, em um regime de condicionamento feito apenas no compartimento pareado com a morfina e reativação consistindo no confinamento no compartimento pareado com a mesma, em um estado livre da droga, em um teste posterior.

3.4.2.1) *Delineamento experimental*

Recentemente, MILEKIC *et al.* (2006) mostraram que a apresentação da droga (morfina) conjuntamente com o ambiente é necessária para a desestabilização desta memória durante a reativação. No entanto, o procedimento de condicionamento utilizado neste estudo foi bastante incomum, uma vez que este foi realizado apenas no compartimento pareado com morfina, sem pareamentos com salina no compartimento alternativo. Portanto, os experimentos 2B e 2C tiveram por objetivo avaliar a importância do animal estar ou não sob o efeito da droga (morfina), durante a reativação, para que ocorra a desestabilização da memória para essa tarefa em um regime de condicionamento apenas com pareamentos no compartimento associado com a morfina.

O experimento 2B consistiu nas fases da habituação, do condicionamento, da reativação no compartimento pareado com a morfina, estando o animal livre do efeito

da droga e do teste. Os procedimentos da habituação, do condicionamento e do teste foram realizados de acordo com o que foi descrito em procedimentos comportamentais gerais. Sete dias após a última sessão de condicionamento, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de salina, imediatamente antes de serem submetidos a uma sessão de reativação, que consistiu no confinamento por 30 minutos no compartimento pareado com a morfina. Logo após esta reativação, os animais receberam uma dose de salina (grupo SS; n=10) ou uma dose de 10 mg/kg de propranolol (grupo SP; n=10). Após 24 horas, os animais foram testados por 15 minutos para suas preferências em relação aos compartimentos pareados com a morfina, tendo estes livre acesso aos dois compartimentos do aparato, em um estado livre da droga. O esquema de condicionamento e teste pode ser esquematizado conforme descrito abaixo:



H: habituação, com livre acesso aos dois compartimentos do aparato por 15 minutos.

M: condicionamento no compartimento pareado com a morfina, com 30 minutos de duração.

Is: injeção intraperitoneal de salina

M: confinamento no compartimento pareado com morfina, mas com o animal livre do efeito da mesma, por 30 minutos

P 10: administração intraperitoneal de 10,0 mg/kg de propranolol.

T: teste, livre acesso aos dois compartimentos por 15 minutos.

3.4.2.1) Resultados

Preferência condicionada pelo lugar

A figura 9 mostra o tempo médio \pm EPM gasto no compartimento pareado com a morfina durante as fases de habituação e de teste para os ratos que receberam uma injeção intraperitoneal de salina antes do confinamento no compartimento pareado com morfina e que, logo depois deste, receberam uma dose de salina (n=10) ou de propranolol (10,0 mg/kg,.ip, n=10). A ANOVA de duas vias (um dos fatores repetido) com grupos (SS e SP) e fases (habituação e teste) como fatores, não revelou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($F_{(1,18)}=0,0097$ p= 0,92) e as fases ($F_{(1,18)}= 2,3094$, p=0,14) ou interação entre grupos e fases ($F_{(1,18)}=0,02$, p=0,86) .

O resultado deste experimento indica que pareamentos apenas com a morfina, sem pareamentos com a salina no compartimento alternativo, e com sessão de reativação consistindo no confinamento dos animais no compartimento pareado com esta droga, mas livres dos efeitos da mesma, não induziram uma preferência condicionada pelo lugar.

Atividade locomotora

No que diz respeito à atividade locomotora, a média \pm EPM do número de vezes que os animais passaram de um compartimento para o outro para o grupo SS foi, respectivamente, de $17,10 \pm 2,30$ e $15,00 \pm 1,94$ durante as fases de habituação e teste. Já para o grupo SP, o número médio de cruzamentos de um compartimento para o outro foi, respectivamente, de $14,10 \pm 1,28$ e $12,80 \pm 1,35$ durante estas mesmas fases. A ANOVA de duas vias (com um dos fatores repetidos) com os grupos (SS e SP) e as fases (habituação e teste) como fatores, não revelou diferenças estatisticamente

significativas entre os grupos ($F_{(1,18)} = 1,61, p=0,24$), as fases ($F_{(1,18)} = 3,67, p=0,19$) ou interação entre grupos e fases ($F_{(1,18)} = 0,05, p=0,75$).

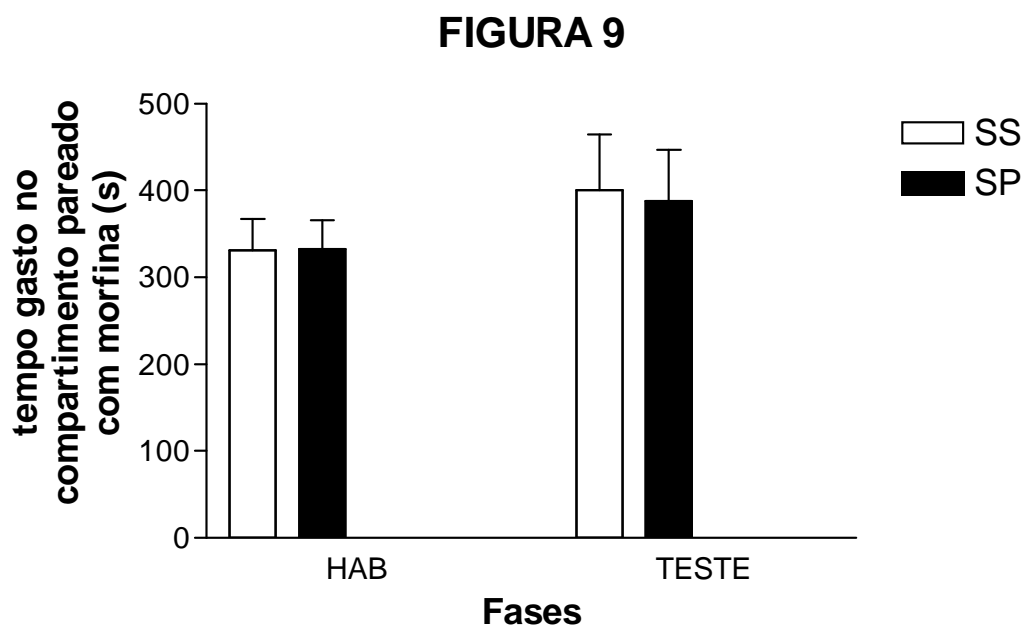
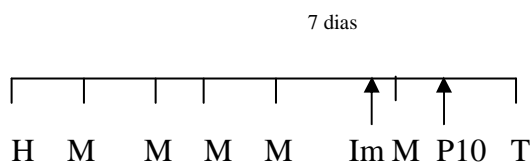


FIGURA 9: Tempo médio \pm EPM gasto no compartimento pareado com a morfina durante as condições de habituação e teste para os grupos SS ($n=10$) e SP ($n=10$). A ANOVA de duas vias não revelou diferença significativa entre grupos e fases.

3.4.3) Experimento 2C-Efeitos da administração sistêmica do propranolol, após a reativação, em um regime de condicionamento feito apenas no compartimento pareado com morfina, e reativação consistindo em um confinamento no compartimento pareado com esta droga, com o animal sob o efeito da mesma, em um teste posterior.

3.4.3.1) *Delineamento experimental*

Este experimento teve por objetivo verificar se a apresentação da morfina (estímulo incondicionado) no momento da reativação desestabilizaria a memória da preferência condicionada ao lugar. Este experimento consistiu nas fases da habituação, do condicionamento, da reativação no compartimento pareado com a morfina, com o animal sob o efeito desta droga, e teste. O procedimento da habituação, do condicionamento e do teste foram realizados de acordo com o que foi descrito em procedimentos comportamentais gerais. Sete dias após a última sessão de condicionamento, os animais foram submetidos a uma sessão de reativação, que consistiu na injeção de uma dose de morfina (7,5 mg/kg, ip), imediatamente antes de serem confinados, por 30 minutos, no compartimento pareado com esta droga. Logo após esta reativação, os animais receberam uma injeção intra-peritoneal de salina (grupo MS, n=20) ou uma dose de 10,0 mg/kg de propranolol (grupo MP; n=20). No dia seguinte, os animais foram testados por 15 minutos para suas preferências em relação aos compartimentos pareados com a morfina, com os animais tendo livre acesso aos dois compartimentos do aparato, em um estado livre da droga. O desenho experimental pode ser esquematizado da seguinte maneira:



H: habituação, com livre acesso aos dois compartimentos do aparato por 15 minutos.

M: condicionamento no compartimento pareado com a morfina, com 30 minutos de duração.

Im: injeção intraperitoneal de 7,5 mg/kg de morfina

M: confinamento no compartimento pareado com morfina, com o animal sob o efeito da mesma, por 30 minutos

P 10: administração intraperitoneal de 10,0 mg/kg de propranolol.

T: teste, livre acesso aos dois compartimentos por 15 minutos

3.4.3.2) Resultados

Preferência condicionada pelo lugar

A figura 10 mostra o tempo médio \pm EPM gasto no compartimento pareado com a morfina durante as fases de habituação e de teste para os ratos que receberam uma injeção intraperitoneal de morfina (7,5 mg/kg, i.p) antes do confinamento no compartimento pareado com esta droga, e que logo depois deste receberam uma injeção intra-peritoneal de salina (grupo MS, n=20) ou 10,0 mg/kg propranolol (grupo MP, n=20). A ANOVA de duas vias (com um dos fatores repetidos) com os grupos (MS e MP) e as fases (habituação e teste) como fatores, revelou uma diferença estatisticamente significativa entre as fases ($F_{(1,38)} = 25,01$, $p < 0,001$). O teste post-hoc de Newman-Keuls revelou que o condicionamento com morfina induziu uma preferência condicionada pelo lugar, uma vez que foi constatada uma diferença significativa entre as fases de habituação e de teste ($p < 0,001$). Contudo, nenhuma diferença estatística significativa foi encontrada entre os grupos ($F_{(1,38)}=1,03$, $p= 0,31$) ou interação entre os grupos e as fases ($F_{(1,38)}=1,76$, $p=0,19$).

O resultado deste experimento sugeriu que o confinamento dos animais no compartimento pareado com morfina, e com os mesmos sob os efeitos desta droga serviu como uma sessão extra de condicionamento. Desta forma, esta reativação eliciu uma preferência condicionada pelo lugar. Contudo, o grupo de animais que recebeu

uma dose sistêmica de propranolol (grupo MP), logo após o confinamento, não apresentou prejuízo de desempenho no teste, quando comparado com o grupo que recebeu salina (MS), como se poderia esperar caso o propranolol bloqueasse a reconsolidação. Portanto, este resultado sugere novamente que não houve reconsolidação dependente de receptores β -noradrenérgicos.

Atividade locomotora

Em relação à atividade locomotora, a média \pm EPM do número de vezes em que os animais passaram de um compartimento para o outro para o grupo MS foi, respectivamente, de $14,35 \pm 1,34$ e $14,10 \pm 1,10$ durante as fases de habituação e teste. Já para os animais do grupo MP, o número médio de cruzamentos de um compartimento para o outro foi, respectivamente, de $15,89 \pm 1,47$ e $15,63 \pm 1,36$ durante estas mesmas fases. Uma ANOVA de duas vias (um dos fatores repetidos) com os grupos (MS e MP) e as fases (habituação e teste) como fatores não revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($F_{(1,37)}=0,92$, $p=0,34$), as fases ($F_{(1,37)}=0,05$, $p=0,81$) ou interação entre os grupos e as fases ($F_{(1,37)}=0,001$, $p=0,99$).

FIGURA 10

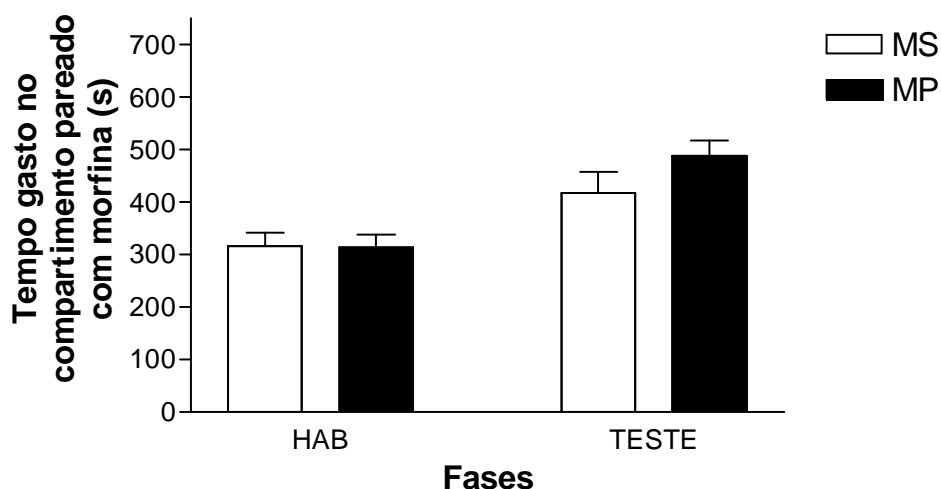


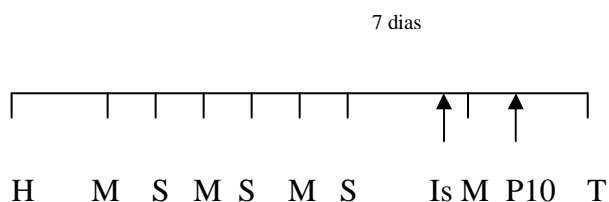
FIGURA 10: Tempo médio \pm EPM gasto no compartimento pareado com a morfina durante as fases de habituação e de teste dos animais MS (n=20) e MP (n=20). A ANOVA de duas vias não revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

3.4.4 Experimento 2D- Efeitos da administração sistêmica de propranolol, após a reativação, em um regime de condicionamento feito com pareamentos alternados com morfina e salina, e reativação consistindo no confinamento no compartimento pareado com esta droga, com o animal livre do efeito da mesma, em um teste posterior.

3.4.4.1) Delineamento experimental

VALJENT *et al.* (2006) constataram que, a memória de uma preferência condicionada pelo lugar induzida tanto pela cocaína quanto pela morfina, somente foi desestabilizada, após a reativação, em um regime de condicionamento com pareamentos alternados com morfina e salina e confinamento (reativação) com os animais sob o

efeito desta droga. Os experimentos 2D e 2E tiveram por objetivo investigar a importância da presença da morfina (estímulo incondicionado) durante a reativação para a desestabilização da memória de preferência pelo lugar em um regime de condicionamento com pareamentos alternados com morfina e salina. Desta forma, o experimento 2D consistiu nas fases da habituação, do condicionamento com pareamentos alternados com salina e morfina, da reativação no compartimento pareado com a morfina, com o animal livre do efeito desta droga, e do teste. O procedimento da habituação, do condicionamento e do teste foi o mesmo descrito em procedimentos comportamentais gerais. Sete dias após a última sessão de condicionamento, os animais receberam uma injeção de salina (ip) e, imediatamente depois, foram submetidos a uma sessão de reativação, que consistiu no confinamento, por 30 minutos, no compartimento pareado com a morfina. Logo após esta reativação os animais receberam uma outra injeção intra-peritoneal de salina (grupo SS, n=20) ou uma dose de 10,0 mg/kg de propranolol (grupo SP; n=20). No dia seguinte, os animais foram testados, por 15 minutos, para suas preferências em relação aos compartimentos pareados com morfina e salina, com os animais tendo livre acesso aos dois compartimentos do aparato. O delineamento experimental pode ser esquematizado conforme se segue:



H: habituação, com livre acesso aos dois compartimentos do aparato, por 15 minutos.

M: condicionamento no compartimento pareado com a morfina, 30 minutos de duração.

S: condicionamento no compartimento pareado com salina, 30 minutos de duração.

Is: injeção intraperitoneal de salina

M: confinamento no compartimento pareado com morfina, com o animal livre do efeito da mesma, por 30 minutos.

P10: administração intraperitoneal de 10,0 mg/kg de propranolol

T: teste, livre acesso aos dois compartimentos, durante 15 minutos.

3.4.4.2) Resultados

Preferência condicionada pelo lugar

A figura 11 mostra o tempo médio \pm EPM gasto no compartimento pareado com a morfina durante as fases de habituação e de teste para os ratos que receberam uma injeção intraperitoneal de salina, antes do confinamento no compartimento pareado com morfina, e que, logo depois deste receberam uma injeção intra-peritoneal de salina (grupo SS, n=20) ou 10,0 mg/kg propranolol (grupo SP, n=20). A ANOVA de duas vias (um dos fatores repetidos) com os grupos (SS e SP) e as fases (habituação e teste) como fatores, revelou uma diferença estatisticamente significativa entre fases ($F_{(1,36)} = 43,61$, $p < 0,001$). O teste post-hoc de Newman-Keuls revelou que o condicionamento com morfina eliciu uma preferência condicionada pelo lugar, uma vez que foi verificada uma diferença significativa entre as fases de habituação e teste ($p < 0,001$). Contudo, nenhuma diferença estatística significativa foi encontrada entre os grupos ($F_{(1,36)} = 1,17$, $p = 0,28$) ou interação entre os grupos e as fases ($F_{(1,36)} = 2,47$, $p = 0,12$).

O resultado deste experimento mostrou que pareamentos alternados com salina e com morfina, e sessão de reativação consistindo no confinamento no compartimento pareado com morfina, mas com o animal em um estado livre do efeito da mesma, elicia uma preferência condicionada pelo lugar a esta droga. Este resultado difere do que foi verificado no experimento 2B, cujo condicionamento feito apenas com morfina e sessão de reativação com o animal livre da droga não induziu preferência pelo lugar. No

entanto, o grupo que recebeu uma injeção sistêmica de propranolol, imediatamente após o confinamento, não apresentou prejuízo de desempenho, quando comparado com o grupo que recebeu salina na fase de teste. Este resultado sugere novamente que o propranolol não bloqueou a reconsolidação quando injetado imediatamente após a reativação.

Atividade locomotora

No que diz respeito à atividade locomotora, a média \pm EPM do número de vezes que os animais passaram de um compartimento para o outro para o grupo SS foi, respectivamente, de $15,37 \pm 1,05$ e $12,63 \pm 1,49$ durante as fases de habituação e teste. Já para o grupo SP, o número médio de cruzamentos de um compartimento para o outro foi, respectivamente, de $19,65 \pm 1,00$ e $13,65 \pm 1,53$ durante estas mesmas fases. A ANOVA de duas vias com os grupos (SS e SP) e as fases (habituação e teste) como fatores revelou diferenças estatisticamente significativas entre as fases ($F_{(1,37)}=17,27$, $p<0,001$). O teste post-hoc de Newman-Keuls revelou uma diferença significativas entre as fases de habituação e de teste ($p= 0,002$). Contudo, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre grupos ($F_{(1,37)}=2,84$, $p=0,10$) ou interação entre os grupos e as fases ($F_{(1,37)}=2,99$, $p=0,09$).

FIGURA 11

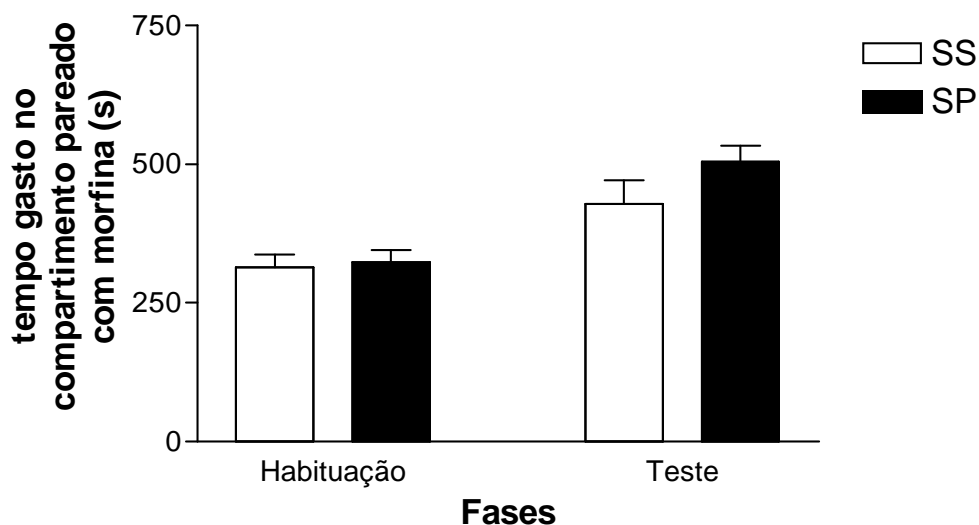


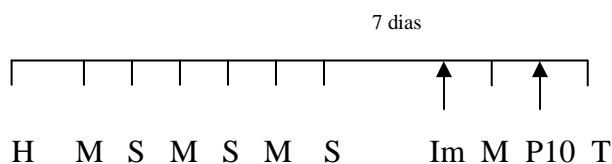
FIGURA 11: Tempo médio \pm EPM gasto no compartimento pareado com a morfina durante as fases de habituação e de teste dos animais dos grupos SS (n=19) ou SP (n=20). A ANOVA de duas vias não revelou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos nas fases de habituação e teste.

3.4.5) Experimento 2E - Efeitos da administração sistêmica do propranolol, após a reativação, em um regime de condicionamento feito com pareamentos alternados com morfina e salina, e reativação consistindo no confinamento no compartimento pareado com esta droga, com o animal sob o efeito da mesma, em um teste posterior.

3.4.5.1) Delineamento experimental

Este experimento teve por objetivo verificar se apresentação simultânea da morfina e do ambiente pareado com a mesma durante a reativação é capaz de desestabilizar a memória da preferência condicionada pelo lugar em um regime de condicionamento com pareamentos alternados com morfina e com salina. O experimento 2E consistiu nas fases de habituação, do condicionamento com

pareamentos alternados com salina e com morfina, da reativação no compartimento pareado com esta droga, com o animal sob do efeito da mesma e do teste. O procedimento da habituação, do condicionamento e do teste foi realizado conforme descrito em procedimentos comportamentais gerais. Sete dias depois da última sessão de condicionamento, os animais receberam uma injeção de morfina (7,5 mg/kg) e, imediatamente depois, foram submetidos a uma sessão de reativação, que consistiu no confinamento, por 30 minutos, no compartimento pareado com esta droga. Logo após esta reativação os animais receberam uma injeção intra-peritoneal de salina (grupo MS, n=20) ou uma dose de 10,0 mg/kg de propranolol (grupo MP; n=20). No dia seguinte, os animais foram testados por 15 minutos para as suas preferências em relação aos compartimentos pareados com a morfina e com a salina, com os animais tendo livre acesso aos dois compartimentos do aparato. O desenho experimental pode ser esquematizado conforme abaixo:



H: habituação, com livre acesso aos dois compartimentos do aparato, por 15 minutos.

M: condicionamento no compartimento pareado com a morfina, 30 minutos de duração.

S: condicionamento no compartimento pareado com salina, 30 minutos de duração.

Im: injeção intraperitoneal de 7,5 mg/kg de morfina.

M: confinamento no compartimento pareado com morfina, com o animal sob o efeito da mesma, por 30 minutos.

P10: administração intraperitoneal de 10,0 mg/kg de propranolol

T: teste, livre acesso aos dois compartimentos, durante 15 minutos.

● *Resultados*

Preferência condicionada pelo lugar

A figura 12 mostra o tempo médio \pm EPM gasto no compartimento pareado com morfina durante as fases de habituação e de teste para os ratos que receberam uma injeção intraperitoneal de morfina (7,5 mg/kg), antes do confinamento no compartimento pareado com esta droga, e que, logo depois deste, receberam uma injeção intra-peritoneal de salina (grupo MS, n=20) ou 10,0 mg/kg de propranolol (grupo MP, n=20). A ANOVA de duas vias com os grupos (MS e MP) e as fases (habituação e teste) como fatores, revelou uma diferença estatisticamente significativa entre as fases ($F_{(1,38)} = 25,73$, $p < 0,001$). O teste post-hoc de Newman-Keuls revelou que o condicionamento com morfina induziu uma preferência pelo lugar a esta droga, uma vez que foi constatada uma diferença significativa entre as fases de habituação e de teste ($p < 0,001$). Contudo, nenhuma diferença estatística significativa foi encontrada entre os grupos ($F_{(1,38)} = 0,26$, $p = 0,61$) ou interação entre os grupos e as fases ($F_{(1,38)} = 0,17$, $p = 0,68$).

Este resultado mostrou que o condicionamento com morfina induziu uma preferência condicionada pelo lugar, uma vez que os animais passaram significativamente mais tempo no compartimento pareado com esta droga na fase de teste em relação à fase de habituação. Contudo, a injeção sistêmica do propranolol, imediatamente após a sessão de confinamento, com os animais sob o efeito da droga, não prejudicou o desempenho dos animais em um teste posterior, quando comparados com os animais que receberam salina, o que indica novamente que não houve reconsolidação dependente de receptores β -noradrenérgicos após a reativação.

Atividade locomotora

Com relação à atividade locomotora, a média \pm EPM do número de vezes em que os animais passaram de um compartimento para o outro para o grupo MS foi, respectivamente, de $16,85 \pm 1,06$ e $12,75 \pm 1,34$ durante as fases de habituação e teste. Já para o grupo MP, o número médio de cruzamentos de um compartimento para o outro foi de $19,15 \pm 1,41$ e $12,75 \pm 1,25$ durante estas mesmas fases. Uma ANOVA de duas vias com os grupos (MS e MP) e as fases (habituação e teste) como fatores revelou diferenças estatisticamente significativas entre as fases ($F_{(1,38)}=21,37$, $p<0,001$). O teste post-hoc de Newman-Keuls revelou uma diferença significativa entre as fases de habituação e de teste ($p= 0,001$). Contudo, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($F_{(1,38)}=0,67$, $p=0,41$) ou interação entre os grupos e as fases ($F_{(1,38)}=1,03$, $p=0,31$).

FIGURA 12

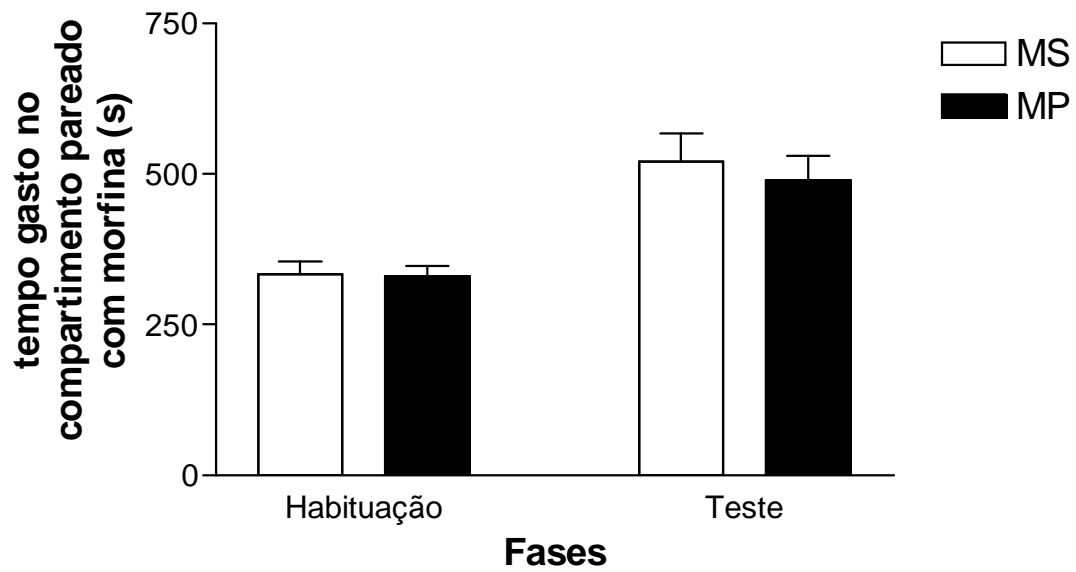


FIGURA 12: Tempo médio \pm EPM gasto no compartimento pareado com morfina durante as fases de habituação e teste de animais do grupo MS (n=20) e MP (n=20). A ANOVA de duas vias não revelou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos nas fases de habituação e teste.

4. DISCUSSÃO

4.1) A infusão de um inibidor da síntese protéica na amígdala basolateral, após a reativação, não induz à reconsolidação na tarefa de preferência condicionada pelo lugar induzida pela morfina.

Os presentes resultados sugeriram que a tarefa de preferência condicionada pelo lugar não sofre reconsolidação, dependente de síntese protéica, na amígdala basolateral após a evocação. Deve também ser considerado que a infusão intra-amigdalar da anisomicina não interferiu com a atividade locomotora, o que poderia influenciar a resposta de preferência condicionada pelo lugar. O protocolo do experimento 1A foi o mesmo usado por REZAYOF *et al.* (2003). Neste experimento, os animais foram submetidos ao teste sem a droga, tendo livre acesso aos dois compartimentos. Além disso, este procedimento é o mais frequentemente usado nos estudos que utilizam a tarefa de preferência condicionada pelo lugar. A importância da apresentação da droga (estímulo incondicionado), simultaneamente com o ambiente pareado com a mesma (estímulo condicionado), foi também testada, uma vez que BOZON *et al.* (2003) mostraram que, durante a evocação de uma memória de reconhecimento de objetos, nem a informação contextual sozinha, nem a exposição aos objetos apresentados previamente em um contexto diferente, são suficientes, por si só, para desestabilizar a memória. Assim, usando camundongos-nocaute para *zif 268*, um gene importante para o aprendizado e para a memória, estes autores observaram que a memória se torna instável durante a evocação, somente quando os objetos são evocados no contexto previamente associado. No experimento 1B, usando os mesmos animais testados para a tarefa da preferência condicionada pelo lugar do primeiro experimento, realizou-se mais um teste na presença da morfina (estímulo incondicionado). Imediatamente após o teste, os animais receberam uma infusão de anisomicina na amígdala basolateral e foram retestados 24 horas depois. Novamente, não se verificou o fenômeno da

reconsolidação, uma vez que os animais do grupo tampão fosfato-salina e anisomicina não diferiram entre si no teste. A ausência do efeito da anisomicina no experimento 1B pode ter sido devido à história complexa dos animais, ou seja, os animais já não eram mais *naives* quando foram submetidos a este experimento. Por exemplo, o primeiro teste com os animais livres do efeito da morfina poderia interferir com o seu desempenho nos testes seguintes. Para verificar novamente a hipótese de que a apresentação simultânea da morfina e do ambiente pareado com esta droga é importante para revelar o fenômeno da reconsolidação na tarefa de preferência condicionada pelo lugar, foi realizado o experimento 1C em animais *naives*. Neste experimento, antes de serem confinados previamente no compartimento pareado com morfina por 10 minutos, os animais receberam uma injeção desta droga (estímulo incondicionado), para estarem sob o efeito da mesma. Após os 10 minutos da reativação, os animais receberam uma infusão intra-amigdalár da anisomicina. Novamente, a anisomicina não interferiu com o desempenho dos animais num teste subsequente, sugerindo que esta tarefa não sofre processos dependentes de síntese protéica na amígdala basolateral, após a evocação da memória, não importando se esta ocorreu na ausência ou na presença da morfina.

O resultado apresentado na primeira parte desta tese não foi o primeiro que não conseguiu revelar o fenômeno da reconsolidação dependente da síntese protéica. Estudos anteriores também não verificaram a reconsolidação em diferentes tarefas, incluindo a esQUIVA INIBITÓRIA (CAMMAROTA *et al.*, 2004) e o condicionamento do medo ao contexto (BIENDENKAPP & RUDY, 2004; LATTAL & ABEL, 2004). Na tarefa da preferência condicionada pelo lugar, ao contrário das tarefas aversivas, são necessárias várias sessões de condicionamento para que a tarefa esteja bem consolidada, pois o aprendizado ocorre de forma gradual. Desta forma, talvez seja possível que o número de pareamentos ou a intensidade do treino sejam fatores críticos

relacionados com os resultados conflitantes. SUZUKI *et al.* (2004) mostraram que a anisomicina bloqueou a reconsolidação para o condicionamento do medo ao contexto, somente quando um choque foi pareado com o ambiente, mas ela não bloqueou a reconsolidação quando três choques foram pareados com o ambiente. Este estudo também mostrou que um tempo de re-exposição maior ao contexto do treinamento eliciava a reconsolidação das memórias cuja intensidade de treinamento foi maior (no caso deste trabalho, um maior número de pareamentos entre o contexto e o choque). Em conjunto, estes resultados sugeriram que a reconsolidação da memória é dependente da força da mesma e do número de pareamentos entre o estímulo condicionado e o incondicionado. Uma vez que a preferência condicionada pelo lugar requer vários pareamentos entre a droga (estímulo incondicionado) e o ambiente associado com a mesma (estímulo condicionado), é possível que esta tarefa seja mais resistente aos efeitos da inibição da síntese protéica durante a reativação da memória. Porém, deve ser mencionado que, no mesmo trabalho, SUZUKI *et al.* (2004) observaram que, no labirinto aquático de Morris, uma tarefa que requer várias sessões de treino para que o animal aprenda a tarefa, a anisomicina bloqueou a reconsolidação. Na tarefa de esquiva inibitória, MILEKIC & ALBERINI (2002) mostraram que a necessidade da síntese protéica é evidente para uma memória reativada somente quando esta é recente. Assim, estes autores verificaram que o prejuízo induzido pela anisomicina administrada sistemicamente é dependente do intervalo entre a sessão do treino e do teste. Quando os intervalos entre as sessões do treino e do teste foram menores (2 e 7 dias), os animais que, imediatamente após o teste de reativação, receberam sistemicamente anisomicina apresentaram prejuízo nos seus desempenhos em um reteste subsequente. Contudo, quando o intervalo entre as sessões de treino e de teste foram maiores (14 e 28 dias), os animais que, imediatamente após a evocação, receberam anisomicina não mostraram

uma amnésia retrógrada para esta tarefa num reteste posterior. Uma possível explicação, de acordo com KANDEL (2001), é a de que a consolidação de novas memórias depende da síntese protéica para formar novas sinapses. Inicialmente estas memórias estão mais fracas e susceptíveis à inibição da síntese protéica. Consequentemente, a reativação de novas memórias poderiam potencialmente desestabilizar uma grande quantidade destas novas sinapses, causando prejuízo na memória. No entanto, com o passar do tempo, as conexões sinápticas tornam-se mais estáveis e menos vulneráveis aos efeitos da inibição da síntese protéica após a reativação. Uma vez que a preferência condicionada pelo lugar requer vários pareamentos entre a droga e o ambiente pareado com a mesma durante o treino, é possível que a memória para esta tarefa possa sofrer várias rodadas de consolidação, seguida por reconsolidação, durante os primeiros pareamentos. Todavia, na fase de teste, é possível que esta memória já esteja mais consolidada e, desta forma, menos sensível aos efeitos da inibição da síntese protéica após a reativação.

Em relação às tarefas apetitivas, os poucos resultados existentes são também contraditórios. HERNANDEZ, SADEGHIAN & KELLEY (2002) demonstraram que uma tarefa instrumental apetitiva, na qual ratos submetidos a uma restrição alimentar necessitam aprender a apertar uma alavanca para receber um alimento, requer a síntese protéica no 'core' do núcleo acumbens, somente durante a fase inicial do aprendizado. Estes autores verificaram que os animais que receberam uma infusão da anisomicina neste núcleo, imediatamente após as primeiras sessões de treino, não aprenderam a tarefa. Contudo, a anisomicina não tem efeito sobre o desempenho quando o aprendizado para esta tarefa já está bem consolidado. Além disso, HERNANDEZ & KELLEY (2004) também verificaram que, a administração sistêmica da anisomicina, após a evocação do aprendizado instrumental apetitivo, prejudicou o desempenho. No

entanto, um teste subsequente mostrou que este prejuízo é decorrente de uma aversão condicionada ao sabor induzida pela anisomicina, e não propriamente de um efeito na reconsolidação. Assim, estes autores sugeriram que uma tarefa instrumental bem aprendida não sofre reconsolidação dependente da síntese protéica. Contudo, LEE *et al.* (2005) mostraram que as memórias relacionadas ao comportamento da busca pela cocaína sofrem reconsolidação dependente da síntese protéica. Assim, quando os animais treinados para associar a auto-administração de cocaína com um estímulo condicionado luminoso (20 segundos) reativam esta memória, ela se torna lábil e sensível à infusão de anisomicina na amígdala basolateral, de tal forma que o estímulo condicionado perde as suas propriedades reforçadoras. Os autores também sugeriram que o *zif 268* amigdalar é necessário para a reconsolidação desta tarefa, uma vez que a infusão 90 minutos antes da sessão de reativação do oligodeoxinucleotídeo “antisense” para o *zif 268* na amígdala basolateral interrompe uma memória luz-cocaína bem aprendida. HERNANDEZ & KELLEY (2004) e LEE *et al.* (2005) interpretaram de forma oposta a habilidade de uma resposta bem aprendida sofrer reconsolidação dependente da síntese protéica. O principal problema em comparar tarefas muito diferentes está na dificuldade em estabelecer uma base justa para a comparação. Dito de outro modo, o termo ‘bem aprendido’ pode não refletir uma quantidade semelhante de aprendizado em uma tarefa e em outra. Talvez seja melhor concentrar-se mais sobre os diferentes tipos de tarefas aprendidas usadas por estes autores, pois enquanto HERNANDEZ & KELLEY (2004) utilizam uma tarefa instrumental, LEE *et al.* (2005) basearam as suas interpretações num procedimento de reforço secundário.

Uma outra linha de raciocínio assume que outras regiões, além da amígdala basolateral, possam estar envolvidas na reconsolidação de uma tarefa de preferência condicionada pelo lugar, tais como o núcleo acumbens, o hipocampo ou o

córtex pré-frontal medial. Estas estruturas também estão envolvidas com os processos de aprendizado associativo, os quais contribuem para o comportamento de busca pela droga (ROBBINS & EVERITT, 2002). Um provável candidato que poderia mediar a reconsolidação da preferência condicionada pelo lugar é o núcleo acumbens. Esta estrutura cerebral processa informações relacionadas às recompensas por meio da co-ativação dos receptores dopaminérgicos D1 e glutamatérgicos NMDA (SMITH-ROE & KELLEY, 2000; DAS *et al.*, 1997). Além disso, um estudo realizado por GERMAN & FIELDS (2006) verificou que, na tarefa de preferência condicionada pelo lugar induzida pela morfina, os neurônios do núcleo acumbens dos ratos codificam de forma persistente o ambiente pareado com esta droga. Assim, MILLER & MARSHALL (2005), VALJENT *et al.* (2006) e MILEKIC *et al.* (2006) relataram que a reconsolidação ocorre no núcleo acumbens, após a reativação de uma memória de preferência condicionada pelo lugar induzida tanto pela cocaína (MILLER & MARSHALL, 2005; VALJENT *et al.*, 2006) quanto pela morfina (VALJENT *et al.*, 2006; MILEKIC *et al.*, 2006). No trabalho de MILLER & MARSHALL (2005), a infusão bilateral do inibidor da ERK U0126 no ‘core’ do acumbens, 30 minutos antes do teste de reativação, prejudicou a expressão da preferência pelo lugar induzida pela cocaína num teste subsequente. Neste mesmo sentido, VALJENT *et al.* (2006) verificaram que a injeção sistêmica do inibidor da ERK SL327 ou da anisomicina imediatamente após a reativação da memória, com o animal sob o efeito tanto da cocaína quanto da morfina, prejudicou o desempenho dos animais em um teste posterior. Além disso, este estudo mostrou que, a fosforilação da ERK no ‘core’ do acumbens e no estriado dorsal, estava significativamente diminuída durante o teste nos animais tratados com SL327 e re-expostos ao ambiente pareado com a cocaína e sob o efeito da mesma. A grande diferença encontrada entre os resultados apresentados por

MILLER & MARSHALL (2005) e VALJENT *et al.* (2006), diz respeito à importância do animal estar sob o efeito da droga (estímulo incondicionado) no momento da reativação para que ocorra o bloqueio da reconsolidação. Enquanto que MILLER & MARSHALL (2005) constataram que o bloqueio da reconsolidação ocorria com os animais livres dos efeitos da droga durante a reativação, VALJENT *et al.* (2006) observaram que o bloqueio da reconsolidação somente ocorria quando o animal estava sob o efeito da droga no momento da reativação. Estas informações sugerem que a reconsolidação pode ocorrer no núcleo acumbens, na tarefa de preferência condicionada pelo lugar, dependendo de como é feita a sessão de reativação. Nos procedimentos experimentais utilizados neste trabalho, utilizamos os dois esquemas de condicionamento, sendo que em nenhum deles a anisomicina teve qualquer efeito quando administrada após a evocação. Logo, pode-se concluir que, embora a amígdala esteja envolvida com a consolidação da preferência condicionada pelo lugar (HSU, SCHROEDER & PACKARD, 2002), a reconsolidação parece estar mais relacionada com o acumbens. O fato de a consolidação e da reconsolidação poderem ser mediadas por estruturas diferentes foi observado em uma outra tarefa (BAHAR, DORFMAN & DUDAI 2004). Neste trabalho, a infusão da anisomicina na amígdala basolateral bloqueou a consolidação da aversão condicionada ao sabor. EISENBERG *et al.* (2003), por sua vez, mostraram que a reconsolidação desta tarefa foi bloqueada pela anisomicina no córtex insular.

No estudo empreendido por MILLER & MARSHALL (2005), foi constatado que a expressão de uma preferência condicionada pelo lugar associada à cocaína, ativa o CREB (elemento responsivo ao AMP-c) no acumbens. O CREB é um fator de transcrição que regula a síntese protéica, necessária para que ocorra a formação da memória associada aos efeitos recompensadores das drogas de abuso. Neste sentido,

KUO *et al.* (2007) constataram que a expressão do CREB no acumbens é necessária para a aquisição de uma preferência condicionada pelo lugar induzida pela cocaína. Para que ocorra a expressão do CREB no acumbens, é necessário que haja a co-ativação dos receptores dopaminérgicos D1 e glutamatérgicos NMDA nesta estrutura (SMITH-ROE & KELLEY, 2000; DAS *et al.*, 1997). O CREB medeia também a consolidação e a reconsolidação do condicionamento do medo ao som e ao contexto (KIDA *et al.*, 2002). Assim, os camundongos cuja expressão do CREB é inibida 6 horas antes da sessão de reativação, apresentaram prejuízo de desempenho em ambas as tarefas em um teste realizado 24 horas depois, o que indica que o CREB é necessário para a reconsolidação. Como as drogas de abuso ativam a via do CREB no acumbens pela co-ativação dos receptores dopaminérgicos D1 e dos glutamatérgicos NMDA, é possível que os antagonistas D1 ou NMDA bloqueiem a reconsolidação da preferência condicionada pelo lugar. Futuros estudos são necessários para verificar se, pela fosforilação do CREB, os sistemas dopaminérgicos e glutamatérgicos no acumbens poderiam mediar o fenômeno da reconsolidação da memória da preferência pelo lugar induzida pelas drogas de abuso no acumbens.

Contrário á idéia de que não ocorre reconsolidação dependente de síntese protéica na amígdala, recentemente MILEKIC *et al.* (2006) verificou que a administração sistêmica dos inibidores de síntese protéica anisomicina e cicloheximida, imediatamente após a reativação, bloqueia a reconsolidação de uma memória de preferência condicionada ao lugar associada à morfina. Este efeito só foi verificado quando os animais estiveram sob o efeito da morfina na sessão de reativação. Quando esta ocorreu com o animal livre do efeito da morfina, não houve o bloqueio da reconsolidação. Nesse mesmo estudo, os autores observaram que, imediatamente após a sessão de reativação, a infusão da anisomicina no núcleo acumbens, no hipocampo e na

amígdala basolateral bloqueou a reconsolidação. Novamente, este bloqueio só ocorreu quando os animais estavam sob o efeito da morfina na reativação. No entanto, foi utilizado, neste estudo, um procedimento incomum de condicionamento, pois este foi feito apenas com morfina, não havendo pareamentos com salina no compartimento alternativo. A diferença principal do Experimento 1 do presente trabalho para o de MILEKIC *et al.* (2006) reside no fato de que o condicionamento foi realizado com pareamentos com morfina e salina de forma alternada. É possível que este regime de condicionamento desfavoreça a observação do fenômeno da reconsolidação, pois os animais não só aprendem a associar um ambiente com os efeitos da morfina, mas também aprender a associar um outro ambiente com uma injeção de salina. Entretanto, todos os outros trabalhos que observaram bloqueio de reconsolidação com manipulações no acumbens (MILLER & MARSHALL, 2005; VALJENT *et al.*, 2006) utilizaram procedimento semelhante ao utilizado no presente estudo. Além disso, em 2007, um outro estudo, que não constatou o fenômeno da reconsolidação dependente de síntese protéica na tarefa de preferência condicionada pelo lugar induzida pela morfina, foi o de ROBINSON & FRANKLIN (2007). Os autores verificaram que a infusão intracerebroventricular (icv) da anisomicina, imediatamente após cada sessão de condicionamento, prejudicou a consolidação da preferência pelo lugar induzida pela morfina. Em relação à reconsolidação, foram utilizados dois métodos de reativação diferentes. No primeiro método, após o estabelecimento de uma preferência pelo lugar induzida pela morfina, os animais foram submetidos a sessões de reativação, que consistiram em mais dois ciclos de condicionamento com morfina e salina, com uma sessão de teste entre um ciclo e outro. Imediatamente após cada sessão de condicionamento com a morfina ou com a salina, os animais recebiam uma infusão icv de anisomicina ou de veículo. Em um novo teste, realizado 48 horas após a última

sessão de reativação, os animais não apresentaram prejuízo de desempenho, o que sugeriu que não houve o fenômeno da reconsolidação. Já no segundo método de reativação, um grupo de animais recebeu uma dose sistêmica de morfina e foi confinado no compartimento pareado com esta droga, enquanto que um outro grupo recebeu a salina e foi confinado no compartimento pareado com a mesma. Ambos os grupos receberam uma infusão icv de anisomicina logo após a reativação. Na sessão de teste, os animais submetidos a uma sessão de reativação no compartimento pareado com morfina, e que logo depois receberam uma infusão icv da anisomicina, não apresentaram um prejuízo no desempenho. Já os animais submetidos a uma sessão de reativação no compartimento pareado com a salina, e que logo depois receberam uma infusão icv de anisomicina, apresentaram uma melhora no desempenho, uma vez que eles passaram mais tempo no compartimento pareado com a morfina. Os resultados deste experimento, em conjunto com o do presente estudo, sugerem que não houve reconsolidação dependente da síntese protéica na tarefa da preferência condicionada pelo lugar induzida pela morfina.

Como em nenhum experimento foi observado o efeito da anisomicina sobre a reconsolidação, pode-se levantar a possibilidade de que esta não esteja de fato inibindo a síntese protéica na amígdala basolateral. Para assegurar que a ausência de um resultado positivo na tarefa da preferência condicionada pelo lugar não foi devida a um problema metodológico, foi feito um experimento controle com o condicionamento do medo ao contexto. Vários relatos indicam que a inibição da síntese protéica, na amígdala basolateral, com a anisomicina prejudica tanto a consolidação do condicionamento do medo ao som quanto o do medo ao contexto (SCHAFE & LEDOUX, 2000; MAREN *et al.*, 2003). O Experimento 1D teve por objetivo replicar os achados de MAREN *et al.* (2003). Estes autores mostraram que, o inibidor da síntese

protéica anisomicina, foi capaz de interromper a consolidação do condicionamento do medo ao contexto, quando infundido na amígdala basolateral, após o treino. Assim, adotando os mesmos procedimentos utilizados por MAREN *et al.* (2003), foi constatado no experimento 1D que a infusão na amígdala basolateral da mesma dose de anisomicina usada na tarefa de preferência condicionada pelo lugar (62,5 µg/1 µl/lado), imediatamente após o treino, prejudicou a consolidação da memória do condicionamento do medo ao contexto. Portanto, os resultados negativos obtidos nos experimentos da preferência condicionada pelo lugar não se devem à ausência de ação farmacológica da anisomicina infundida na amígdala basolateral. O controle positivo mostrou que foi atingido o sítio correto para o medo condicionado. Contudo, ainda não está claro se a mesma região, que é importante tanto para a consolidação (MAREN *et al.* 2003) quanto para a reconsolidação (NADER, SCHAFFE & LEDOUX, 2000) do medo condicionado, também seja importante para a reconsolidação da preferência condicionada pelo lugar. Apesar de trabalhos eletrofisiológicos (CARELLI, WILLIAMS & HOLLANDER, 2003), farmacológicos (SCHROEDER & PACKARD, 2002; SCHROEDER & PACKARD, 2003), imunohistoquímicos (MILLER & MARSHALL, 2005), com lesão (FUCHS & SEE, 2002) e inativação (HSU, SCROEDER & PACKARD, 2002, KANTAK *et al.*, 2002) indicarem que amígdala basolateral está envolvida nas diversas etapas do aprendizado apetitivo, não se pode descartar a hipótese de que, além do accumbens, outros núcleos da amígdala possam também estar envolvidos com este aprendizado. O' DELL *et al.* (1999) constataram que a infusão de anfetamina na amígdala central, mas não na basolateral, eliciu uma preferência condicionada pelo lugar induzida por esta droga. KNAPSKA *et al.* (2006) verificaram que a amígdala central está ativada (medida pelo aumento da expressão de c-Fos) tanto em uma tarefa instrumental apetitiva como na tarefa de preferência

condicionada pelo lugar. Em uma tarefa aversiva, como o condicionamento do medo ao som, WILENSKY *et al.* (2006) verificaram que o núcleo central da amígdala é necessário para a aquisição, a consolidação e a expressão desta tarefa. Utilizando o método da inativação desta estrutura com um agonista gabaérgico (muscimol), estes autores verificaram que a inativação deste núcleo da amígdala prejudica a aquisição e a expressão dessa tarefa. Além disso, este mesmo estudo mostrou que a infusão da anisomicina imediatamente após o treino prejudicou a expressão dessa tarefa. Assim, a amígdala central é um outro núcleo amigdalár que pode mediar os eventos relacionados à síntese protéica. Futuros estudos são necessários para investigar se a reconsolidação ocorre na amígdala central nas tarefas aversivas e apetitivas.

Em resumo, os resultados aqui apresentados sugerem que a memória para a preferência condicionada pelo lugar associada à morfina não sofre reconsolidação dependente da síntese protéica na amígdala basolateral, diferentemente do que ocorre com o medo condicionado (NADER, SCHAFE & LEDOUX, 2000). Os resultados aqui relatados não dão suporte à idéia de que o bloqueio da reconsolidação poderia ser usado como uma nova abordagem terapêutica para o tratamento do comportamento de busca pelas drogas de abuso eliciadas por pistas ambientais. Contudo, os efeitos da administração da anisomicina sobre a reativação da memória são pouco compreendidos no contexto das propriedades recompensadoras das drogas de abuso. Mais estudos são necessários para estabelecer as tarefas e os procedimentos específicos que podem sustentar a reconsolidação nas diferentes formas do aprendizado apetitivo.

4.2) A administração sistêmica do propranolol não prejudica a expressão de uma preferência condicionada pelo lugar associada à morfina em ratos submetidos a diferentes regimes de condicionamento e de reativação.

A neurotransmissão noradrenérgica do sistema nervoso central está envolvida na consolidação das memórias com conteúdo emocional (ROOZENDAAL *et al.*, 2006, MCGAUGH, 2004). Diversos estudos têm mostrado que as interações entre a noradrenalina e os glicocorticóides na amígdala basolateral aumentam a consolidação da memória emocional de cunho aversivo (ROOZENDAAL *et al.*, 2006; LALUMIERE, BUEN & MCGAUGH, 2003). Está também bem estabelecido que os receptores β -adrenérgicos presentes na amígdala basolateral medeiam os efeitos facilitatórios induzidos pela noradrenalina na consolidação da memória emocional (LIANG, JULER & MCGAUGH, 1986). Desta forma, alguns estudos têm sugerido que os antagonistas β -adrenérgicos, como o propranolol, poderiam ser utilizados como uma ferramenta terapêutica para o tratamento do estresse pós-traumático (REIST *et al.*, 2001; O' DONNEL, HAGADOREN & COUPLAND, 2004). Os trabalhos de PRZBYSLAWSKI, ROULLET & SARA (1999), DEBIEC & LEDOUX (2004) e DIEERGADE, SCHOFFELMEER & DE VRIES (2006), mostraram que o propranolol bloqueia a reconsolidação não só nas tarefas aversivas, como também nas apetitivas. O fato de não só as tarefas aversivas serem sensíveis ao efeito do propranolol abrem a possibilidade de se estudar o possível efeito desta droga no contexto da dependência às drogas de abuso. Portanto, a segunda parte deste trabalho verificou se o propranolol poderia bloquear a reconsolidação de uma preferência pelo lugar associada à morfina.

Parte deste estudo foi baseado em um trabalho realizado por MILEKIC *et al.* (2006), o qual constatou que a desestabilização da memória da preferência condicionada pelo lugar induzida pela morfina só ocorreu quando o animal, durante a sessão de

reativação, esteve confinado no compartimento pareado com esta droga e sob efeito da mesma. Além disso, os animais foram condicionados apenas no compartimento pareado com morfina, e não experimentaram pareamentos contrabalançados de salina no compartimento alternativo. Este estudo constatou que a injeção daqueles inibidores da síntese protéica na amígdala basolateral, no hipocampo e no núcleo acumbens, imediatamente após a reativação, com o animal sob o efeito da droga, também prejudicaram o desempenho dos animais em um teste posterior.

No experimento 2A, utilizou-se um procedimento convencional de condicionamento e de reativação, o mesmo que foi utilizado por REZAYOF *et al.* (2003). Assim, os animais foram condicionados, de forma alternada, com morfina em um compartimento e salina no outro. Um dia após o condicionamento, foram testadas as preferências dos animais em relação aos compartimentos pareados com a salina e com a morfina e, imediatamente após este, eles receberam sistemicamente duas doses de propranolol (10,0 e 20 mg/kg) ou de salina. Esses mesmos animais foram retestados no dia seguinte. As duas doses de propranolol não interferiram no desempenho dos animais no reteste, o que indica que este não bloqueou a reconsolidação neste procedimento.

Nos experimentos 2B e 2C foram testados a importância do animal ser condicionado apenas no compartimento pareado com a morfina, sem os pareamentos alternativos com a salina, e o estar ou não sob o efeito desta droga durante a sessão de reativação. Nestes experimentos, foram utilizados os mesmos procedimentos de condicionamento e de reativação utilizados por MILEKIC *et al.* (2006). No caso deste trabalho, o condicionamento foi realizado apenas no compartimento pareado com a morfina, sem pareamentos com salina no compartimento alternativo. A sessão de reativação foi realizada com o animal confinado no compartimento pareado com a

morfina e sob o efeito desta droga. No experimento 2B, após pareamentos apenas com a morfina, a reativação consistiu em confinar os animais, sob um estado livre da droga, no compartimento pareado com a morfina. Logo após este confinamento, os animais receberam uma injeção sistêmica do propranolol ou da salina. Os resultados mostraram que, neste regime de condicionamento e de reativação, os animais não aprenderam a tarefa, uma vez que não houve uma diferença estatisticamente significativa entre as fases de habituação e de teste. Uma possível explicação para este fato é a de que este regime de condicionamento, com pareamentos apenas no compartimento pareado com a morfina, elicia um condicionamento mais fraco. Desta forma, o confinamento no compartimento pareado com a morfina, mas com o animal livre do efeito desta droga, equivaleria a uma sessão de extinção. Como o condicionamento já é fraco, este confinamento já extinguiria a memória no teste. Uma outra explicação alternativa é a de que, o compartimento não pareado com a salina, represente uma novidade para o animal, aumentando assim a atividade exploratória neste compartimento novo e diminuindo o tempo gasto no compartimento pareado com a morfina no teste. BARDO, NEISEWANDER & PIERCE (1989) mostraram que os ratos preferem passar mais tempo num compartimento novo quando eles possuem a oportunidade de escolher entre um compartimento familiar e um nunca visitando antes. Já PARKER (1992) mostrou que, na tarefa de preferência condicionada pelo lugar induzida por várias drogas recompensadoras (anfetamina, morfina, nicotina e apomorfina), a introdução de um compartimento novo no teste interfere com o condicionamento, uma vez que os animais passam um tempo maior explorando o compartimento novo e diminuindo o tempo gasto no compartimento pareado com a droga. No experimento 2C, o condicionamento foi realizado apenas no compartimento pareado com a morfina, sem pareamentos alternados com a salina. No entanto, a reativação consistiu em confinar o animal no

compartimento pareado com a morfina, mas com ele sob o efeito desta droga durante a reativação. O teste foi realizado 24 horas depois. Os resultados indicam que os animais aprenderam a tarefa, uma vez que os mesmos passaram significativamente mais tempo no compartimento pareado com a morfina no teste, quando comparado com o da habituação. A injeção da morfina, antes do confinamento no compartimento pareado com esta droga, pode ter funcionado como uma pista que permitiu que o animal associasse novamente o ambiente com a droga. Estudo realizado por LU *et al.* (2002) verificou que o confinamento dos animais no compartimento pareado com a morfina, com o animal sob o efeito desta droga, restabeleceu uma preferência pelo compartimento pareado com a morfina anteriormente extinta. Todavia, a injeção do propranolol, imediatamente após a reativação, não prejudicou o desempenho dos animais em um teste posterior, o que indica que ele não bloqueou a reconsolidação neste regime de condicionamento e de reativação.

Os experimentos 2D e 2E também tiveram como objetivo verificar também a importância da apresentação simultânea do estímulo incondicionado (morfina) e do condicionado (ambiente pareado com a morfina), no momento da reativação, em um regime de condicionamento tradicional, com os pareamentos alternados com a morfina em um compartimento e a salina no outro. Este estudo utilizou um procedimento semelhante ao adotado por VALJENT *et al.* (2006), que verificaram o bloqueio da reconsolidação com o inibidor da ERK e com a anisomicina, na tarefa de preferência pelo lugar induzida pela cocaína, num regime de condicionamento com pareamentos alternados com a morfina e com a salina, e reativação consistindo no confinamento no compartimento pareado com morfina, mas com o animal sob o efeito desta droga. No experimento 2D, após um regime de condicionamento com os pareamentos com salina e com a morfina, os animais foram confinados no compartimento pareado com a

morfina, mas livres do efeito da droga, antes de receberem uma injeção sistêmica de propranolol. Ao contrário do experimento 2B, cujos resultados indicaram que os animais não aprenderam a tarefa, neste experimento os animais aprenderam a associar o ambiente com a droga, mostrando que o condicionamento com os pareamentos alternados com a morfina e a salina elicia um condicionamento mais forte do que os pareamentos apenas no compartimento pareado com a morfina. Uma possível explicação para este fato é de que os pareamentos alternados com a morfina e com a salina podem ajudar o animal a discriminar um ambiente do outro e, assim, facilitar o condicionamento. Contudo, a administração sistêmica do propranolol, imediatamente após a reativação, não prejudicou o desempenho dos animais no teste, indicando novamente que não houve reconsolidação dependente dos receptores β -noradrenérgicos neste procedimento. No experimento 2E, os animais foram submetidos a um regime de condicionamento tradicional, com os pareamentos alternados com morfina e com a salina. Já a sessão de reativação consistiu no confinamento dos animais no compartimento pareado com a morfina, com eles sob o efeito da droga. Logo após este confinamento, os animais receberam uma injeção sistêmica de propranolol ou de salina. Novamente, a administração de propranolol não prejudicou o desempenho dos animais no teste, sugerindo novamente que não houve reconsolidação dependente de receptores β -noredrenérgicos nesta tarefa.

Recentemente, um trabalho publicado por BERNARDI, LATTAL & BERGER (2006) mostrou que o propranolol bloqueou a expressão de uma preferência condicionada pelo lugar associada à cocaína, em uma sessão de reativação com os animais livres do efeito da droga. Apesar de, aparentemente, este resultado parecer ser conflitante com o resultado deste estudo, algumas diferenças nos procedimentos devem ser ressaltadas. Em primeiro lugar, o condicionamento utilizado por BERNARDI,

LATTAL & BERGER (2006) se baseou em pistas ambientais táteis, enquanto que o condicionamento utilizado neste estudo se baseou principalmente em pistas visuais. Um estudo realizado por CUNNINGHAM, PATEL & MILNER (2006) sugeriu que a preferência pelo lugar, induzida por pistas táteis, é mediada por estruturas cerebrais diferentes daquelas que medeiam a preferência pelo lugar eliciado pelas pistas ambientais. Além disso, o estudo realizado por BERNARDI, LATTAL & BERGER (2006) utilizou a cocaína para induzir à preferência pelo lugar, enquanto que este estudo utilizou a morfina. Apesar de ambas as drogas serem recompensadoras, elas podem induzir à preferência pelo lugar por meio de mecanismos de ação diferentes. KUO *et al.* (2007) constataram que enquanto a síntese protéica é necessária para que ocorra a aquisição de uma preferência condicionada pelo lugar induzida pela cocaína, ela não é necessária para que ocorra a aquisição de uma preferência condicionada pelo lugar induzida pela metanfetamina. Apesar de tanto a cocaína quanto a metanfetamina serem psicoestimulantes e possuírem mecanismos de ação semelhantes, a aquisição desta tarefa é mediada por mecanismos de ação diferentes, um dependente de síntese protéica (cocaína), e o outro, não (metanfetamina).

Um outro fator que deve ser considerado são as linhagens de ratos utilizados nos estudos da reconsolidação e preferência condicionada pelo lugar. Enquanto que os outros estudos que envolveram a reconsolidação e a preferência condicionada pelo lugar utilizaram as linhagens Long-Evans e Sprague-Dawley, a utilizada neste estudos foi a Wistar. Desta forma, BLAISS & JANAK (2006) constataram que animais da mesma linhagem (Sprague-Dawley), mas provenientes de criadores diferentes (Harlan e Charles River) apresentaram diferenças no aprendizado da tarefa de preferência condicionada pelo lugar induzida pela morfina. Estes autores constataram que, enquanto que os animais do fornecedor Harlan aprendiam esta tarefa com seis sessões de

condicionamento, os animais do Charles River aprendiam com apenas quatro. Assim, não se pode descartar a hipótese de que os ratos da linhagem Wistar sejam mais resistentes ao efeito da anisomicina ou do propranolol e, por isso, seja mais difícil de revelar o fenômeno da reconsolidação. Desta forma, seria interessante um estudo comparando os efeitos dos bloqueadores da síntese protéica e do propranolol em diferentes linhagens de ratos nas diferentes tarefas.

A reconsolidação é um fenômeno que causa polêmica na literatura, pois, se por um lado vários estudos sugerem que é possível apagar ou melhorar as memórias já consolidadas por meio de inibidores de síntese protéica ou outros fármacos logo após o teste, outros não observaram o prejuízo na memória, o que coloca em xeque o próprio fenômeno da reconsolidação. Desta forma, é importante que se estudem as condições em que o fenômeno é ou não observado. A segunda parte deste trabalho procurou verificar o efeito do propranolol na pós-reativação utilizando para tal diferentes regimes de condicionamento e de reativação, não tendo sido, uma vez mais, observado este fenômeno em nenhum dos regimes de condicionamento e de reativação que foram utilizados.

Em resumo, estes resultados sugerem que o propranolol não bloqueia a reconsolidação nos diferentes regimes de condicionamento e de reativação, descartando a hipótese de que os antagonistas β -adrenérgicos possam ser utilizados como uma nova ferramenta terapêutica para o tratamento do vício às drogas.

5. CONCLUSÕES

- a) A tarefa da preferência condicionada pelo lugar não sofre reconsolidação dependente da síntese protéica na amígdala basolateral, uma vez que a infusão da anisomicina nesta estrutura, imediatamente após a reativação, não prejudicou o desempenho dos animais num teste subsequente.
- b) Os receptores β -noradrenérgicos não sofrem reconsolidação na tarefa de preferência condicionada pelo lugar induzida pela morfina, uma vez que a administração sistêmica do propranolol pós-reativação não prejudicou o desempenho dos animais em um teste posterior.

***6. REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

ABEL, T. & LATTAL, K.M. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 11, n. 2, p. 180-187, 2001.

ALDERSON, H.L.; ROBBINS, T.W.; EVERITT, B.J. The effects of excitotoxic lesions of the basolateral amygdala on the acquisition of heroin-seeking behavior in rats. **Psychopharmacology**, v. 153, n.1, p. 111-119, 2000.

BAHAR, A.; DORFMAN, N.; DUDAI, Y. Amygdalar circuits required for either consolidation or extinction of taste aversion memory are nor required for reconsolidation. **European Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 4, p. 1115-1118, 2004.

BARDO, M.T.; NEISEWANDER, J.L.; PIERCE, R.C. Novelty-induced place preference behavior in rats: Effects of opiate and dopaminergic drugs. **Pharmacology, Biochemistry & Behavior**, v. 32, n. 3, p. 683-689, 1989.

BARDO, M.T. & BEVINS, R.A. Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? **Psychopharmacology**, v. 153, n. 1, p. 31-43, 2000.

BARONDES, S.H. & COHEN, H.D. Memory impairment after subcutaneous injection of acetoxycycloheximide. **Science**, v. 160, n. 827, p. 556-557, 1968.

BERNARDI, R.E.; LATTAL, K.M.; BERGER, S. Postretrieval propranolol disrupts a cocaine conditioned place preference. **Neuroreport**, v. 17, n. 13, p. 1443-1447, 2006.

BIEDENKAPP, J.C. & RUDY, J.W. Context memories and reactivation: Constrains on the reconsolidation hypothesis. **Behavioral Neuroscience**, v. 118, n. 5, p. 956-964, 2004.

BLAISS, C.A.; JANAK, P.H. Post-training and post-reactivation administration of amphetamine enhances morphine conditioned place preference. **Behavioural Brain Research**, v. 171, n. 2, p. 329-337, 2006.

BOSSERT, J.M.; GHITZA, U.E.; LU, L.; EPSTEIN, D.H.; SHAHAM, Y. Neurobiology of relapse to heroin and cocaine seeking: An update and clinical implications. **European Journal of Pharmacology**, v. 526, n. 1-3, p. 36-50, 2005.

O' KEEFE, J.; NADEL, L. The hippocampus as a cognitive map. **The Behavioral and Brain Sciences**, v. 2, p. 487-533, 1979

BOZON, B.; DAVIS, S.; LAROCHE, S. A requirement for the immediate early gene zif 268 in reconsolidation of recognition memory after retrieval. **Neuron**, v. 40, n. 4, p. 695-701, 2003.

CAMMAROTA, M.; BEVILAQUA, L.R.M.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I. Retrieval does not induce reconsolidation of inhibitory avoidance memory. **Learning & Memory**, v. 11, n. 5, p. 572-578, 2004.

CAMMAROTA, M.; BEVILAQUA, L.R.M.; BARROS, D. M.; VIANNA, M.R.; IZQUIERDO, L.A; MEDINA, T.H.; IZQUIERDO, I. Retrieval and the extinction of memory. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 25, n. 3-4, p. 465-474, 2005.

CARDINAL, R.N.; PARKINSON, J.A.; HALL, J.; EVERITT, B.J. Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum and prefrontal cortex. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, v. 26, n. 3, p. 321-352, 2002.

CARELLI, R.M.; WILLIAMS, J.G.; HOLLANDER, J.A. Basolateral amygdala neurons encode cocaine self-administration and cocaine-associated cues. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 23, p. 8204-8211, 2003.

CHEN, F.J. & SARA, S.J. Locus coeruleus activation by foot shock or electrical stimulation inhibits amygdala neurons. **Neuroscience**, v. 144, n. 2, p. 472-481, 2007.

CUNNINGHAM, C.L.; PATEL, P.; MILNER, L. Spatial location is critical for conditioning place preference with visual but not tactile stimuli. **Behavioral Neuroscience**, v. 120, n. 5, p. 1115-1132, 2006.

DA CUNHA, C.; ROOZENDAL, B.; VAZDARJANOVA, A.; MCGAUGH, J.L. Microinfusions of flumazenil into the basolateral but not the central nucleus of the amygdala enhance memory consolidation in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 72, n. 1, p. 1-7, 1999.

DANIELS, D. Effects of actinomycin D on memory and brain RNA synthesis in an appetitive learning task. **Nature**, v. 231, n. 5302, p. 395-397, 1971.

DAS, S.; GRUNERT, M.; WILLIAMS, L.; VINCENT, S. NMDA and D1 receptors regulate the phosphorylation of CREB and the induction of *c-fos* in striatal neurons in primary culture. **Synapse**, v. 25, n. 3, p. 227-233, 1997.

DAWSON, R.G. & MCGAUGH, J. L. Electroconvulsive shock effects on a reactivated memory trace: further examination. **Science**, v. 166, n. 904, p. 525-527, 1969.

DEBIEC, J.; LEDOUX, J. E.; NADER, K. Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. **Neuron**, v. 36, n. 3, p. 527-538, 2002.

DEBIEC, J. & LEDOUX, J. E. Disruption of reconsolidation but not consolidation of auditory fear conditioning by noradrenergic blockade in the amygdala. **Neuroscience**, v. 129, n. 2, p. 267-272, 2004.

DI CHIARA, G. & IMPERATO, A. Opposite effects of *mu* and *kappa* opiate agonists on dopamine release in the nucleus accumbens and in the dorsal caudate of freely moving rats. **Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 244, n.3, p. 1067-1080, 1988.

DI CIANO, P. & EVERITT, B. J. Direct interactions between the basolateral amygdala and nucleus accumbens core underlie cocaine-seeking behavior by rats. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 32, p. 7167-7173, 2004.

DIERGAARDE, L.; SCHOFFELMEER, A.N.; DE VRIES, T.J. Beta-adrenoceptor mediated inhibition of long-term reward-related memory reconsolidation. **Behavioural Brain Research**, v. 170, n. 2, p. 333-336, 2006.

DROUIN, C.; DARRACQ, L.; TROVERO, F.; BLANC, G. ; GLOWINSKI, J. ; COTECCHIA, S. ; TASSIN, J-P. α 1-adrenergic receptors control locomotor and rewarding effects of psychostimulants and opiates. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 7, p. 2873-2884, 2002.

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

EISENBERG, M.; KOBILO, T.; BERMAN, D.E.; DUDAI, Y. Stability of retrieved memory: inverse correlation with trace dominance. **Science**, v. 301, n. 5636, p. 1102-1104, 2003.

EVERITT, B.J.; MORRIS, K.A.; O' BRIEN, A.; ROBBINS, T.W. The basolateral amygdala-ventral striatal system and conditioned place preference: further evidence of limbic-striatal interactions underlying reward-related processes. **Neuroscience**, v. 42, n. 1, p. 1-18, 1991.

FALLON, J.H. & CIOFI, P. Distribution of monoamines within the amygdala. In: AGGLETON, J.P. (Ed.). **The amygdala: neurobiological aspects of emotion, memory, and mental dysfunction**, New York, Wiley-Liss, 1992, p. 84-104.

FISCHER, A.; SANANBENESI, F.; SCHRICK, C.; SPIESS, J.; RADULOVIC, J. Distinct roles of hippocampal de novo protein synthesis and actin rearrangement in extinction of contextual fear. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 8, p. 1962-1966, 2004.

FLEXNER, J.B.; FLEXNER, L.B.; STELLAR, E. Memory in mice as affected by intracerebral puromycin. **Science**, v. 141, p. 57-59, 1963.

FLOOD, J.F, ROSENZWEIG, M.R, BENNET, E.L.; ORME, A.E. The influence of duration of protein synthesis inhibition on memory.. **Physiology and Behavior**, v. 10, p. 555-562, 1973.

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

FUCHS, R.A.; WEBER, S.M.; RICE, H.J.; NEISEWANDER, J.L. Effects of excitotoxic lesions of the basolateral amygdala on cocaine-seeking behavior and cocaine conditioned place preference in rats. **Brain Research**, v. 929, n.1, p.15-25, 2001.

FUCHS, R.A.; SEE, R.E. Basolateral amygdala inactivation abolishes conditioned stimulus- and heroin-induced reinstatement of extinguished heroin-seeking behavior in rats. **Psychopharmacology**, v. 160, n. 4, p. 425-433, 2002.

FUCHS, R.A.; EVANS, K.A.; LEDFORD, C.C.; PARKER, M.P.; CASE, J.M.; MEHTA, R.H.; SEE, R.E. The role of the dorsomedial prefrontal cortex, basolateral amygdala, and dorsal hippocampus in contextual reinstatement of cocaine seeking in rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, n. 2, p. 296-309, 2005.

GERMAN, P.W.; FIELDS, H.L. Rat nucleus accumbens neurons persistently encode locations associated with morphine reward. **Journal of Neurophysiology**, v. 97, n. 3, 2094-2106, 2007.

GOLD, P.E; KING, R.A. Tests of the effect of delayed footshock-electroconvulsive shock pairings. **Physiology and Behavior**, v. 8, p. 797-800, 1972.

GRECKSCH, G. & MATTHIES, H. Two sensitive periods for the amnesic effect of anisomycin. **Pharmacology, Biochemistry & Behavior**, v. 12, n. 5, p. 663-665, 1980.

HARRIS, G.C.; ASTON-JONES, G. Enhanced morphine preference following prolonged abstinence: Association with increased Fos expression in the extended amygdala. **Neuropsychopharmacology**, v. 28, n. 2, p. 292-299, 2003.

HERNANDEZ, P.J.; SADEGHIAN, K.; KELLEY, A.E. Early consolidation of instrumental learning requires protein synthesis in the nucleus accumbens. **Nature Neuroscience**, v. 5, n. 12, p. 1327-1331, 2002.

HERNANDEZ, P.J.; KELLEY, A.E. Long-term memory for instrumental responses does not undergo protein synthesis-dependent reconsolidation upon retrieval. **Learning & Memory**, v. 11, n. 6, p. 748-754, 2004.

HIROI, N.; WHITE, N.M. The lateral nucleus of the amygdala mediates expression of the amphetamine-produced conditioned place preference. **The Journal of Neuroscience**, v. 11, n. 7, p. 2107-2116, 1991.

HSU, E. H.; SCHROEDER, J.P; PACKARD, M. G. The amygdala mediates memory consolidation for an amphetamine conditioned place preference. **Behavioural Brain Research**, v. 129, n. 1-2, p. 93-100, 2002.

JASMIN, L.; NARASIAH, M.; TIEN, D. Noradrenaline is necessary for the hedonic properties of addictive drugs. **Vascular Pharmacology**, v. 45, n. 4, p. 243-250, 2006.

KANDEL, E.R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. **Science**, v. 294, n. 5544, p. 1030-1038, 2001.

KANTAK, K.M.; BLACK, Y.; VALENCIA, E.; GREEN-JORDAN, K.; EINCENBAUM, H.B. Dissociable effects of lidocaine inactivation of the rostral and caudal basolateral amygdala on maintenance and reinstatement of cocaine-seeking behavior in rats. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 3, p. 1126-1136, 2002.

KATZ, R.J. & GORMEZANO, G. A rapid and inexpensive technique for assessing the reinforcing effects of opiate drugs. **Pharmacology, Biochemistry & Behavior**, v. 11, n. 2, p. 231-233, 1978.

KELLEY, A.E.; STINUS, L.; IVERSEN, S. D. Interactions between d-ala-met-enkephalin, A10 dopaminergic neurons, and spontaneous behaviour in the rat. **Behavioural Brain Research**, v. 1, n. 1, p. 3-24, 1980.

KIDA, S.; JOSSELYN, S.A.; de ORTIZ, S.P.; KOGAN, J.H.; CHEVERE, I.; MASUSHIGE, S.; SILVA, A.J. CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. **Nature Neuroscience**, v. 5, n. 4, p. 348-355, 2002.

KNAPSKA, E.; WALASEK, G.; NIKOLAEV, E.; NEUHAUSSER-WESPY, F.; LIPP, H-P; KACZMAREK, L.; WERKA, T. Differential involvement of the central amygdala in appetitive versus aversive learning. **Learning & Memory**, v. 13, n. 2, p.192-200, 2006.

KUO, Y-M.; LIANG, K.C.; CHEN, H-H; CHERNG, C.G.; LEE, H-T. ; LIN, Y.; HUANG, A.M.; LIAO, R-M.; YU, L. Cocaine-but not metamphetamine – associated memory requires de novo protein synthesis. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 87, n. 1, p. 93-100, 2007.

LALUMIERE, R.T.; BUEN, T-V.; MCGAUGH, J.L. Post-training intra-basolateral amygdala infusions of norepinephrine enhance consolidation of memory for contextual fear conditioning. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n.17, p. 6754-6758, 2003.

LATTAL, K.M. & ABEL, T. Behavioral impairments caused by injections of the protein synthesis inhibitor anisomycin after contextual retrieval reverse with time. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 101, n.13, p. 4667-4672, 2004.

LEDOUX, J. E. Emotion circuits in the brain. **Annual Reviews of Neuroscience**, v. 23, p. 155-184, 2000.

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

LIANG, K.C.; JULER, R.G.; MCGAUGH, J.L. Modulating effects of posttraining epinephrine on memory: involvement of the amygdala noradrenergic system. **Brain Res.**, v. 368, n. 1, 125-133, 1986.

LU, L.; XU, N-J.; GE, X.; YUE, W.; SU, W-J; PEI, G.; MA, L. Reactivation of morphine conditioned place preference by drug priming: role of environmental cues and sensitization. **Psychopharmacology**, v. 159, n. 2, p. 125-132, 2002.

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

MCGAUGH, J. L. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. **Annual Reviews of Neuroscience**, v. 27, p. 1-28, 2004.

MCLAUGHLIN, J.; SEE, R.E. Selective inactivation of the dorsomedial prefrontal cortex and basolateral amygdala attenuates conditioned-cued

reinstatement of extinguished cocaine-seeking behavior in rats. **Psychopharmacology**, v.168, n. 1-2, p. 57-65, 2003.

MAREN, S. Neurotoxic basolateral amygdala lesions impair learning and memory but not the performance of conditioned fear in rats. **The Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 19, p. 8696-8703, 1999.

MAREN, S; FERRARIO, C.R.; CORCORAN, K.A.; DESMOND, T.J.; FREY, K.A. Protein synthesis in the amygdala, but not the auditory thalamus, is required for consolidation of Pavlovian fear conditioning in rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 11, p. 3080-3088, 2003.

MILEKIC, M.H. & ALBERINI, C. Temporally graded requirement for protein synthesis following memory reactivation. **Neuron**, v. 36, n. 3, p. 521-525, 2002.

MILEKIC, M.H.; BROWN, S.D.; CASTELLINI, C.; ALBERINI, C. Persistent disruption of an established morphine conditioned place preference. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 11, p. 3010-3020, 2006.

MILLER, C. & MARSHALL, J. Altered Fos expression in neural pathways underlying cue-elicited drug seeking in the rat. **European Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 5, p. 1385-1393, 2005.

MILLER, C. & MARSHALL, J. Molecular substrates for retrieval and reconsolidation of cocaine-associated contextual memory. **Neuron**, v. 47, n. 6, p. 873-884, 2005.

MISANIN, J.R.; MILLER, R.R.; LEWIS, D.J. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. **Science**, v. 160, n. 827, p. 554-555, 1968.

MOGENSON, G.J.; TAKIGAWA, M.; ROBERTSON, A.; WU, M. Self-stimulation of the nucleus accumbens and tegmental area of Tsai attenuated by microinjections of spiroperidol into the nucleus accumbens. **Brain Research**, v. 171, n. 2, p. 247-259, 1979.

MUCHA, R.F.; van der KOOY, D.; O' SHAUGHNESSY, M.; BUCENIEKS, P. Drug reinforcement studied by use of conditioned place preferences. **Brain Research**, v. 243, n.1, p. 91-105, 1982.

MUCHA, R.F.; IVERSEN, S.D. Reinforcing properties of morphine and naloxone revealed by conditioned place preferences: a procedural examination. **Psychopharmacology**, v. 82, n. 3, p. 241-247, 1984.

NADER, K.; SCHAFE, G. E.; LEDOUX, J. E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 722-726, 2000.

O' DELL, L.E.; SUSSMAN, A.N.; MEYER, K.L.; NEISEWANDER, J.L.
Behavioral effects of psychomotor stimulant infusions into amygdaloid nuclei.
Neuropsychopharmacology, v. 20, n. 6, p. 591-602, 1999.

O' DONNEL, T.O.; HEGADOREN, K.M.; COUPLAND, N.C. Noradrenergic
mechanisms in the pathophysiology of post-traumatic stress disorder.
Neuropsychobiology, v. 50, n. 4, p. 273-283, 2004.

OLDS, J. & MILNER, P. Positive reinforcement produced by electrical
stimulation of septal area and other regions of the rat brain. **Journal of
Comparative and Physiological Psychology**, v. 47, n. 6, p. 419-427, 1954.

OLDS, J. & OLDS, M.E. Positive reinforcement produced by stimulating
hypothalamus with iproniazid and other compounds. **Science**, v. 127, n. 3307, p.
1175-1176, 1958.

OLSON, V.G.; HEUSNER, C.L.; BLAND, R.J.; DURING, M.J.;
WEINSHENKER, D.; PALMITER, R.D. Role of noradrenergic signaling by the
nucleus tractus solitarius in mediating opiate reward. **Science**, v. 311, n. 5763, p.
1017-1020, 2006.

OVERTEN, D.A. State-dependent learning produced by addicting drugs. In: FISHER, S.; FREEDMAN, A.M. (Ed.) **Opiate addiction: Origins and treatment**. Winston, Washington, 1964, p. 61-75.

PARENT, M.B.; MCGAUGH, J.L. Posttraining infusion of lidocaine into the amygdala basolateral complex impairs retention of inhibitory avoidance training. **Brain Research**, v. 661, n. 1-2, p. 97-103, 1994.

PARKER, L.A. Place conditioning in a three- or four choice apparatus: Role of stimulus novelty in drug-induced place conditioning. **Behavioral Neuroscience**, v. 106, n. 2, p. 294-306, 1992.

PAXINOS, G., WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. New York: Academic Press; 1997.

PHILLIPS, R.G. & LEDOUX, J.E. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. **Behavioral Neuroscience**, v. 106, n. 2, p. 274-285, 1992.

POWER, A.E.; BERLAU, D.J.; MCGAUGH, J.L.; STEWARD, O. Anisomycin infused into the hippocampus fails to block 'reconsolidation' but impairs

extinction: The role of re-exposure duration. **Learning & Memory**, v. 13, n.1, p. 27-34, 2006.

PRZYBYSLAWSKI, J.; ROULLET, P.; SARA, S.J. Attenuation of emotional and nonemotional memories after their recall: role of β adrenergic receptors. **The Journal of Neuroscience**, v. 19, n.15, p. 6623-6628, 1999.

QUEVEDO, J.; VIANNA, M.R.M.; ROESLER, R., de-PARIS, F.; IZQUIERDO, I.; ROSE, S.P.R. Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: protection from amnesia by pretraining but not pre-exposure to the task apparatus. **Learning & Memory**, v. 6, n. 6, p. 600-607, 1999.

QUEVEDO, J.; VIANNA, M.R.M.; MARTINS, M.R.; BARICHELO, T.; MEDINA, J.H.; ROESLER, R.; IZQUIERDO, I. Protein synthesis, PKA and MAP kinase are differentially involved in short-and long term memory in rats. **Behavioural Brain Research**, v.154, n. 2, p. 339-343, 2004.

QUIRARTE, G.L.; ROOZENDAAL, B.; MCGAUGH, J.L. Glucocorticoid enhancement of memory storage involves noradrenergic activation in the basolateral amygdala. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 94, n. 25, p. 14048-14053, 1997.

RADEMACHER, D.J.; KOVACS, B.; SHEN, F.; NAPIER, T.C.; MEREDITH, G.E. The neural substrates of amphetamine conditioned place preference: implications for the formation of conditioned stimulus-reward associations. **European Journal of Neuroscience**, v. 24, n.7, p. 2089-2097, 2006.

REIST, C.; DUFFY, J.G.; FUJIMOTO, K.; CAHIL, L. β -adrenergic blockade and emotional memory in PTSD. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 4, n. 4, p. 377-383, 2001.

REZAYOF, A.; ZARRINDAST, M-R.; SAHRAEI, H.; HAERI-ROHANI, A. Involvement of dopamine receptors of the dorsal hippocampus on the acquisition and expression of morphine-induced place preference in rats. **Journal of Psychopharmacology**, v. 17, n. 4, p. 415-423, 2003.

RICCIO, D.C.; MILLIN, P.M.; BOGART, A.R. Reconsolidation: a brief history, a retrieval view, and some recent issues. **Learning & Memory**, v. 13, n. 5, p. 536-544, 2006.

RIZOS, Z.; OVARI, J.; LERI, F. Reconditioning of heroin place preference requires the basolateral amygdala. **Pharmacology, Biochemistry & Behavior**, v. 82, n. 2, p. 300-305, 2005.

ROBINS, T.W.; EVERITT, B.J. Limbic-striatal memory systems and drug addiction. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 78, n. 3, p. 625-636, 2002.

ROBINSON, M.J.F.; FRANKLIN, K.B.J. Effects of anisomycin on consolidation and reconsolidation of a morphine-conditioned place preference. **Behavioural Brain Research**, v. 178, n. 1, p.146-153, 2007.

ROOZENDAAL, B.; HUI, G.K.; HUI, I.R. ; BERLAU, D.J. ; MCGAUGH, J.L.; WEINBERGER, N. M. Basolateral amygdala noradrenergic activity mediates corticosterone-induced enhancement of auditory fear conditioning. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 86, n. 3, p. 249-255, 2006.

ROSSI, N. A. & REID, L.D. Affective states associated with morphine injections. **Physiological Psychology**, v. 4, p. 269-274, 1976.

SANCHIS-SEGURA, C. & SPANAGEL, R. Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. **Addiction Biology**, v. 11, n.1, p. 2-38, 2006.

SARA, S.J. Retrieval and reconsolidation: Toward a neurobiology of remembering. **Learning & Memory**, v. 7,n. 2, p. 73-84, 2000.

SCHAFE, G.E.; NADEL, N.V.; SULLIVAN, G.M.; HARRIS, A.; LEDOUX, J.E. Memory consolidation for contextual and auditory fear conditioning is dependent on protein synthesis, PKA, and MAP kinase. **Learning & Memory**, v. 6, n. 2, p. 97-110, 1999.

SCHAFE, G.E. & LEDOUX, J.E. Memory consolidation of auditory pavlovian fear conditioning requires protein synthesis and protein kinase A in the amygdala. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 18, p. 1-5, 2000.

SCHANK, J.R.; VENTURA, R.; PUGLISI-ALLEGRA, S.; ALCARO, A.; COLE, C. D.; LILES, L. C.; SEEMAN, P.; WEINSHENKER, D. Dopamine β -hydroxylase knockout mice have alterations in dopamine signaling and are hypersensitive to cocaine. **Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 10, p. 2221-2230, 2006.

SCHROEDER, J. & PACKARD, M. Posttraining intra-basolateral amygdala scopolamine impairs food- and amphetamine-induced conditioned place preferences. **Behavioral Neuroscience**, v. 116, n. 5, p. 922-927, 2002.

SCHROEDER, J. & PACKARD, M. Facilitation of memory for extinction of drug-induced conditioned reward: role of amygdala and acetylcholine. **Learning & Memory**, v. 11, n. 5, p. 641-647, 2004.

SKINNER, B. F. **The behavior of organisms**. New York: D. Appleton-Century Co., 1938.

SMITH-ROE, S.L.; KELLEY, A.E. Coincident activation of NMDA and dopamine D1 receptors within the nucleus accumbens core is required for appetitive instrumental learning. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 20, p. 7737-7742, 2000.

SQUIRE, L.R.; SLATER, P.C.; CHACE, P.M. Reactivation of recent or remote memory before electroconvulsive therapy does not produce retrograde amnesia.

Behavioral Biology, v.18, n. 3, p. 335-343, 1976.

STERNBERG, D.B.; ISAACS, K.R.; GOLD, P.E.; MCGAUGH, J.L. Epinephrine facilitation of appetitive learning: Attenuation with adrenergic receptors antagonists. **Behavioral and Neural Biology**, v. 44, n.3 p. 447-453, 1985.

STINUS, L; KOOB, G. F.; LING, N.; BLOOM, F.; LE MOAL, M. Locomotor activation induced by infusion of endorphins into ventral tegmental area: Evidence for opiate-dopamine interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 77, n. 4, p. 2323-2327, 1980.

SUZUKI, A.; JOSSELYN, S.A.; FRANKLAND, P.W.; MASUSHIGE, S.; SILVA, A.J.; KIDA, S. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 20, p. 4787-4795, 2004.

THORNDIKE, E. L. **The animal intelligence**. New York: Mcmillan, 1913.

VALJENT, E.; CORBILLÉ, A-G.; BERTRAN-GONZALES, J.; HERVÉ, D.; GIRAULT, J-A. Inhibition of ERK pathway or protein synthesis during

reexposure to drugs of abuse erases previously learned place preference.

Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America, v. 103, n. 8, p. 2932-2937, 2006.

VENTURA, R.; CABIB, S.; ALCARO, A.; ORSINI, C.; PUGLISI-ALLEGRA, S. Norepinephrine in the prefrontal cortex is critical for amphetamine-induced reward and mesoaccumbens dopamine release. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 5, p. 1879-1885, 2003.

VENTURA, R.; ALCARO, A.; PUGLISI-ALLEGRA, S. Prefrontal cortical norepinephrine release is critical for morphine-induced reward, reinstatement and dopamine release in the nucleus accumbens. **Cerebral Cortex**, v. 15, n. 12, p. 1877-1886, 2005.

WANG, H.; HU, Y.; TSIEN, J.Z. Molecular and systems mechanisms of memory consolidation and storage. **Progress in Neurobiology**, v. 79, n. 3, p. 123-135, 2006.

WEEKS, J. R. Experimental morphine addiction: Method for automatic intravenous injections in unrestrained rats. **Science**, v. 138, p. 143-144, 1962.

WILENSKY, A.E.; SCHAFE, G. E.; KRISTENSEN, M.P; LEDOUX, J.E. Rethinking the fear circuit: the central nucleus of the amygdala is required for the acquisition, consolidation and expression of pavlovian fear conditioning. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 48, p. 12387-12396, 2006.

TABELA DE PROCEDIMENTOS COMPORTAMENTAIS

EXPERIMENTO	CONDICIONAMENTO	REATIVAÇÃO	TEMPO REATIVAÇÃO (min)
1A (infusão de anisomicina na ABL* após reativação)	Pareamentos alternados com morfina e salina	Teste com livre acesso aos dois ambientes, livre do efeito da morfina	15
1B (infusão de anisomicina na ABL após reativação)	Pareamentos alternados com morfina e salina	Teste com livre acesso aos dois ambientes, sob o efeito da morfina	15
1C (infusão de anisomicina na ABL após confinamento)	Pareamentos alternados com morfina e salina	Confinamento no compartimento pareado com a morfina, sob o efeito desta droga	10
2 A (injeção de sistêmica de propranolol)	Pareamentos alternados com morfina e salina	Teste com livre acesso aos dois ambientes, livre do efeito da morfina	15
2B (injeção de sistêmica de propranolol)	Pareamentos apenas no compartimento associado com a morfina	Confinamento no compartimento pareado com a morfina, livre do efeito desta droga	30
2C (injeção de sistêmica de propranolol)	Pareamentos apenas no compartimento associado com a morfina	Confinamento no compartimento pareado com a morfina, sob o efeito desta droga	30
2D (injeção de sistêmica de propranolol)	Pareamentos alternados com morfina e salina	Confinamento no compartimento pareado com a morfina, livre do efeito desta droga	30
2E (injeção de sistêmica de propranolol)	Pareamentos alternados com morfina e salina	Confinamento no compartimento pareado com a morfina, sob o efeito desta droga	30

* BLA- amígdala basolateral

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)