

**Rafael Karan Vianna de Sá**

**ATUALIZAÇÃO DA MEMÓRIA CONTEXTUAL APETITIVA INDUZIDA  
POR COCAÍNA ENVOLVE MECANISMOS DE CONSOLIDAÇÃO E  
NÃO DE RECONSOLIDAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo – Escola Paulista  
de Medicina, para obtenção do título de  
Mestre em Ciências.

São Paulo  
2015

**Rafael Karan Vianna de Sá**

**ATUALIZAÇÃO DA MEMÓRIA CONTEXTUAL APETITIVA INDUZIDA  
POR COCAÍNA ENVOLVE MECANISMOS DE CONSOLIDAÇÃO E  
NÃO DE RECONSOLIDAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Jair Guilherme dos Santos Junior

São Paulo  
2015

De Sá, Rafael Karan Vianna

**Atualização da memória contextual apetitiva induzida por cocaína envolve mecanismos de consolidação e não de reconsolidação.**

Rafael Karan Vianna de Sá. – São Paulo, 2015.

x, 53f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo.  
Programa de Pós-graduação em Neurologia/Neurociências.

Update of contextual appetitive memory induced by cocaine involves consolidation and not reconsolidation mechanisms.

1. Condicionamento clássico. 2. Reforço positivo. 3. Drogadição.  
4. Camundongos.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
**ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROLOGIA E**  
**NEUROCIÊNCIAS**

Chefe do Departamento de Neurologia e Neurocirurgia:

Prof. Dr. Paulo Henrique Ferreira Bertolucci

Coordenadora do curso de Pós-Graduação em Neurologia e Neurociências:

Prof<sup>a</sup> Dra. Célia Harumi Tengan

RAFAEL KARAN VIANNA DE SÁ

ATUALIZAÇÃO DA MEMÓRIA CONTEXTUAL APETITIVA  
INDUZIDA POR COCAÍNA ENVOLVE MECANISMOS DE  
CONSOLIDAÇÃO E NÃO DE RECONSOLIDAÇÃO

Presidente da banca:

Prof. Dr. Jair Guilherme dos Santos Junior

Banca examinadora:

Prof<sup>a</sup>. Dra. Alessandra Linardi

Prof<sup>a</sup>. Dra. Carolina Tesone Coelho de Lespinay

Prof. Dr. Dartiu Xavier da Silveira

Prof<sup>a</sup>. Dra. Beatriz Monteiro Longo

*Para os meus pais, Patrícia e Luiz; meus avós, Ieda e Carlos (in memoriam); minha tia-avó Eli, com todo o meu amor e gratidão.*

## **Agradecimentos**

Ao Professor Guilherme, responsável pela minha trajetória profissional desde a iniciação científica. Sinto enorme admiração e respeito pelas qualidades de professor e amigo.

À todos os meus familiares, pelo suporte emocional e ensinamentos que definem o ser humano Rafael Karan.

À minha esposa Érica, por unir sua vida à minha, compartilhando os momentos felizes e as dificuldades de um relacionamento em constante evolução.

Aos meus melhores amigos, tecnologicamente denominados “grupo do meeh”, que apesar da escassez de encontros nos últimos anos, representam um segundo pilar de sustentação em minha vida.

Aos colegas do “lab”, incluindo aqueles que não fazem mais parte do grupo mas que estiveram presentes em algum momento desde a minha entrada na iniciação. Todos contribuíram com o meu aprendizado prestando ajuda com protocolos e experimentos, e também com a amizade mantida pelas discussões científicas e políticas associadas a conversas sobre nossas vidas pessoais. O convívio com estas pessoas me acrescentou muito mais do que conhecimento, proporcionou grande amadurecimento e mudanças no senso crítico. Certamente nosso orientador tem parte do mérito pelos alunos que o acompanham.

À FAPESP pelo apoio financeiro. Processo 2012/12658-8.

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVO</b> .....	<b>11</b>
2.1 Geral .....	11
2.2 Específico .....	11
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>12</b>
3.1 Animais .....	12
3.2 Protocolo comportamental .....	12
3.2.1 Pré-teste .....	13
3.2.2 Condicionamento.....	13
3.2.3 Teste 1 .....	13
3.2.4 Re-exposição.....	13
3.2.5 Teste 2 .....	14
3.3 O tratamento com inibidor de síntese protéica .....	14
3.4. Análise estatística .....	15
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>16</b>
4.1 Experimento 1.....	16
4.2 Experimento 2.....	19
4.3 Experimento 3.....	21
4.4 Experimento 4.....	23
4.5 Experimento 5.....	25
4.6 Experimento 6.....	27
4.7 Experimento 7.....	29
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>32</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>36</b>



## Lista de figuras

<b>Figura 1</b> - Esquema ilustrativo que apresenta a circuitaria do “ciclo da drogadição” ..3	3
<b>Figura 2</b> - A via mesolímbica como alvo neuroanatômico em comum para todas as drogas de abuso.....4	4
<b>Figura 3</b> - Desenho esquemático representando o protocolo do modelo da preferência condicionada ao local .....6	6
<b>Figura 4</b> - O esquema da memória .....7	7
<b>Figura 5</b> - Aparato de preferência condicionada ao local utilizado no presente estudo ..... 12	12
<b>Figura 6</b> - Desenho experimental geral ..... 15	15
<b>Figura 7</b> - Gráfico do Experimento 1 ..... 18	18
<b>Figura 8</b> - Gráfico do Experimento 2.....20	20
<b>Figura 9</b> - Gráfico do Experimento 3.....22	22
<b>Figura 10</b> - Gráfico do Experimento 4.....24	24
<b>Figura 11</b> - Gráfico do Experimento 5.....26	26
<b>Figura 12</b> - Gráfico do Experimento 6.....28	28
<b>Figura 13</b> - Gráfico do Experimento 7.....31	31

## Resumo

Uma das teorias a cerca da neurobiologia da drogadição sugere que existe uma constante atualização de memórias relacionadas aos repertórios contextuais e comportamentais de uso da substância. Neste sentido, a compreensão dos mecanismos envolvidos neste processo de atualização se faz necessário para a melhor compreensão da drogadição e também para o aprimoramento de estratégias de tratamento. Em memórias aversivas alguns grupos sugerem que a atualização é decorrente da consolidação de uma nova memória que é associada à memória original, enquanto outros grupos defendem a hipótese que a atualização envolve mecanismos de reconsolidação da memória original e não consolidação de uma nova memória. Para as memórias apetitivas não existe até o momento estudos que abordam diretamente o tema. Neste sentido, o presente estudo buscou investigar se a atualização da memória associativa de reforço positivo induzida pela cocaína envolve mecanismos de consolidação ou reconsolidação. Para tanto, camundongos C57BL6 machos adultos foram submetidos a um protocolo padrão de preferência condicionada ao local induzida por cocaína (20 mg/kg, i.p.). Em seguida, os animais foram submetidos a diferentes protocolos de re-exposição contextual, a fim de induzir a evocação e labilização do traço. Por fim, os animais foram submetidos a um novo teste de preferência condicionada ao local a fim de verificar o efeito dos protocolos de re-exposição. Os resultados aqui encontrados mostraram que os animais são capazes de atualizar a memória contextual no paradigma da preferência condicionada ao local. A atualização da memória foi abolida pela administração de ciclohexamida, um inibidor de síntese protéica somente quando administrada 3 e 6 horas após (mas não imediatamente após) cada re-exposição. Tendo em vista a característica temporal dos efeitos da ciclohexamida, podemos inferir que, no modelo da preferência condicionada ao local induzida pela cocaína, a atualização envolve mecanismos de consolidação e não reconsolidação.

## **Abstract**

One of the neurobiological theory of drug addiction suggest the memories related to contextual and behavioral aspects related to drug taking are constantly updated. Therefore, the knowledge of the mechanism involved in the memory update is particularly noteworthy to improve the comprehension of drug addiction as well as in the improvement of therapeutics of this disease. In aversive memories, some groups suggest that memory update involves consolidation of a new memory linked to an original memory. In contrast, according to other groups, memory update recruits reconsolidation rather consolidation mechanisms. In spite of these divergences, there are no direct evidences studing the role of consolidation and/or reconsolidation in appetitive associative memories. The present study was performed to address the relevance of consolidation and/or reconsolidation in the conditioned place preference paradigm. Male adult C57BL6 mice were submitted to a traditional protocol of conditioned place preference induced by cocaine (20 mg/kg, i.p.). After that, the animals were exposed to different protocols of re-exposition, in order to retrieve the original memory. Finally, the animals were submitted to an additional test in order to evaluate the score of conditioned place preference. Our results showed that animals were able to update the original memory. However, the memory update was abolished by cicloheximide (an inhibitor of protein synthesis) when administered 3 and 6 hour after (but not immediately after) each re-exposition. Considering the temporal profile of cicloheximide effects, our results suggest that in the cocaine induced conditioned place preference memory update involves consolidation rather reconsolidation mechanisms.

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de drogas psicoativas está presente em todas as culturas humanas. Não há relato de qualquer população humana, independente de questões culturais, que não tenha feito uso de algum psicoativo. Assim como demais comportamentos humanos, o uso dessas substâncias pode ser descontrolado por alguns indivíduos, provocando uma doença de característica multifatorial: a drogadição (Marx, 2006; Robinson et al., 2013).

A drogadição é uma enfermidade crônica caracterizada por forte compulsão em adquirir e consumir uma determinada substância psicoativa e pela alta incidência de recaída, mesmo após períodos prolongados sem o uso da droga (American Psychiatry Association, 2013).

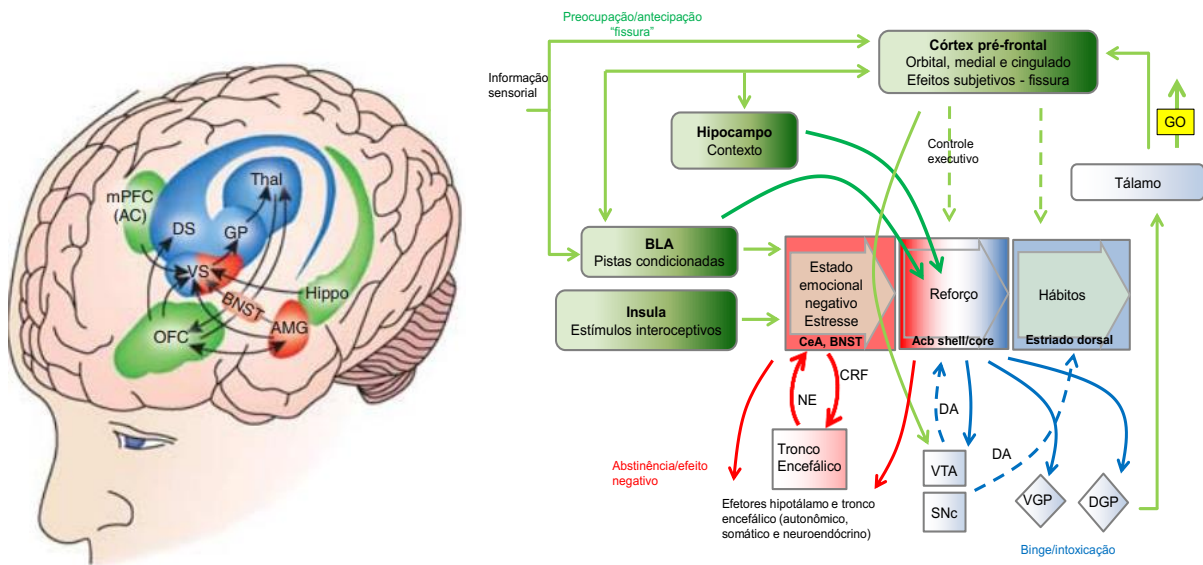
Todas as drogas de abuso produzem efeito de reforço positivo <sup>1</sup>, responsável pela manutenção do seu uso durante a fase inicial do processo da drogadição. Este reforço assemelha-se aos obtidos por estímulos recompensadores naturais. Com o decorrer do uso repetitivo da droga, os estados afetivos negativos durante o período de abstinência emergem como um fator determinante da manutenção do comportamento de busca da droga, caracterizando com isso uma prevalência da característica de reforço negativo <sup>1</sup> em relação ao reforço positivo (Le Moal e Koob, 2007; Koob e Volkow, 2010).

---

<sup>1</sup> **Reforço positivo:** processo pelo qual a apresentação do estímulo, em geral prazeroso, aumenta a probabilidade de uma resposta comportamental. **Reforço negativo:** processo em que a remoção de um estado aversivo aumenta a probabilidade de uma resposta emocional.

Dentre as pessoas que usam drogas, apenas em uma pequena parcela ocorre a progressão para a drogadição. Os indivíduos dependentes passam a direcionar seu comportamento para a busca da substância, de maneira a suprimir demais comportamentos anteriormente reforçadores como alimentar-se, hidratar-se, interagir socialmente, entre outros.

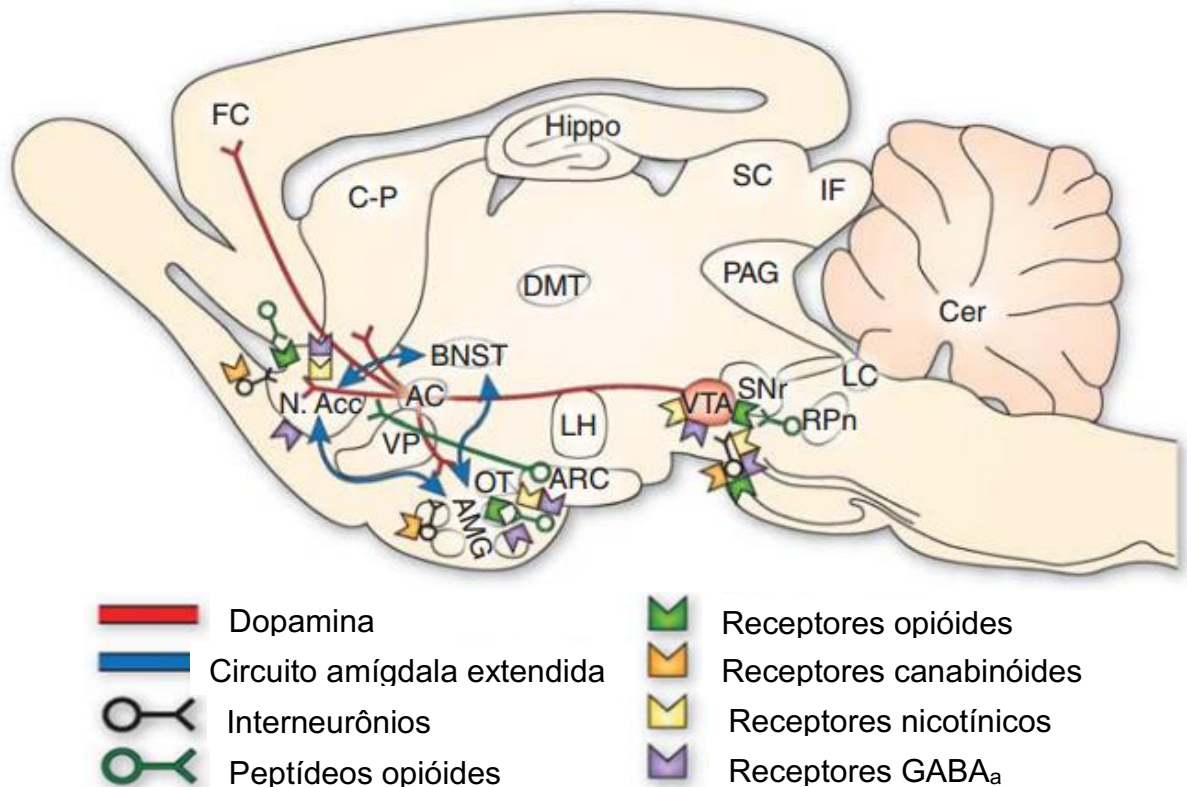
Tomada a complexidade da drogadição, diversas teorias tentam explicar o porquê ocorre a transição do uso ocasional para o uso descontrolado de substâncias em determinados indivíduos. Dentre elas, podemos citar a (1) teoria do processo inverso (Solomon e Corbit, 1974), (2) aprendizado patológico (Hyman, 2005) e (3) sensibilização ao incentivo (Robinson e Berridge, 2013). Mais recentemente, Koob e Volkow (2010) apresentaram uma abordagem mais conciliadora que contempla as teorias previamente propostas em conjunto com novas evidências comportamentais, moleculares e morfofisiológicas. O modelo foi chamado de "ciclo da drogadição" (*addiction cycle*) (Figura 1). De acordo com estes autores, o hipocampo é importante na evocação de pistas contextuais associadas aos efeitos subjetivos do uso da substância. Esse estado é gerado pela plasticidade que ocorre ao longo do desenvolvimento da drogadição, estando diretamente relacionado com uma desregulação do sistema dopaminérgico, do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal e da perda do controle inibitório da alça cortico-límbica. O dependente passa por estados de antecipação, preocupação e fissura, o que desencadeia o comportamento de busca da droga até mesmo de maneira inconsciente. Há então uma automatização desse comportamento semelhante ao que ocorre em memórias muito bem consolidadas como, por exemplo, memórias procedurais. O consumo de substâncias torna-se um hábito inconsciente controlado por vias que não necessitam de controle consciente para a execução dos comportamentos. Muitas vezes ocorre a perda do controle inibitório por parte do córtex pré-frontal o que desencadeia o comportamento de busca inconsciente reforçando ainda mais esse hábito, controlado, essencialmente, pelo estriado dorsal. A partir desta visão integrativa proposta por Koob e Volkow, ficou claro que a memória tem uma participação importante no "ciclo da drogadição".



Fonte: Adaptado de Koob e Volkow, 2010.

**Figura 1 - Esquema ilustrativo que apresenta a circuitaria do “ciclo da drogação”.** Destaca-se o papel central do hipocampo no processamento contextual e amígdala no condicionamento relacionado a pistas ambientais. BLA=amígdala basolateral, CeA=amígdala central; BNST=núcleo da estria terminal; Acb=núcleo acumbente; VTA=área tegumentar ventral; SNc=substância negra; VGP e DGP=globo pálido.

Todas as drogas de abuso promovem reforço positivo através da ativação da via mesolímbica, conjunto de neurônios dopaminérgicos localizados na área tegumentar ventral, que projetam seus axônios para o núcleo acumbente (Berridge e Robinson, 1998; Horvitz, 2000). Embora diretamente relacionada com a sensação de prazer, a simples ativação desta via não explica a característica compulsiva e recorrente da enfermidade. Por outro lado, o uso continuado da droga promove alterações significativas no funcionamento da via mesolímbica, tornando-a sensibilizada ao efeito das drogas e pistas associadas, e, paradoxalmente, hipoativa durante a ausência destas (O’Brien et al., 1998; Berke e Hyman, 2000; Koob e Le Moal, 2008).



Fonte: Adaptado de Koob e Volkow, 2010.

**Figura 2 - A via mesolímbica como alvo neuroanatômico em comum para todas as drogas de abuso.** No caso da figura, a via mesolímbica representa a ligação entre VTA (área tegumentar ventral) e N. Acc (núcleo acumbente).

A sensibilização às pistas relacionadas ao uso da substância obviamente envolve processos de aprendizagem e memória. Evidências da literatura indicam que a vivência de certas situações contextuais (estímulo condicionado) sob o efeito prazeroso da droga (estímulo não condicionado), faz com que este contexto, por si só, estimule o desejo de consumir a droga. Estes aspectos cognitivos não influenciam somente o desenvolvimento da drogadição, como também a manutenção da mesma, através da indução de recaídas, mesmo após longos períodos de abstinência (Robinson e Berridge, 2003; Hyman et al., 2006).

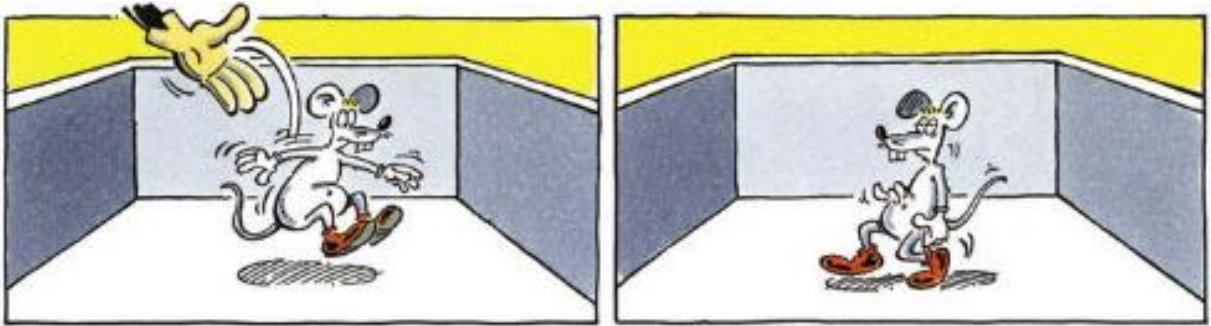
O modelo animal mais utilizado para se estudar a relação da aprendizagem associativa relacionada às drogas de abuso é a preferência condicionada ao local. Este modelo segue os princípios clássicos do condicionamento Pavloviano, a base da aprendizagem associativa (Sanchis-Segura e Spanagel, 2006; Tzschentke, 2007). Para tanto se utiliza um aparelho composto por compartimentos diferenciados. A princípio é realizada a habituação ao aparelho, o que de certa forma nos permite verificar se o animal tem preferência não condicionada a algum dos

compartimentos. A seguir, realiza-se uma série de pareamentos, no qual o animal é confinado em um dos compartimentos sob o efeito da droga e no compartimento oposto sob o efeito de solução salina. Passada estas sessões de condicionamento, o animal é submetido ao teste com livre acesso aos compartimentos. A partir de um mecanismo de aprendizagem associativa, o compartimento pareado com a droga, que até então era neutro, passa a adquirir a valência emocional associada ao estado de intoxicação com a droga (Figura 3).

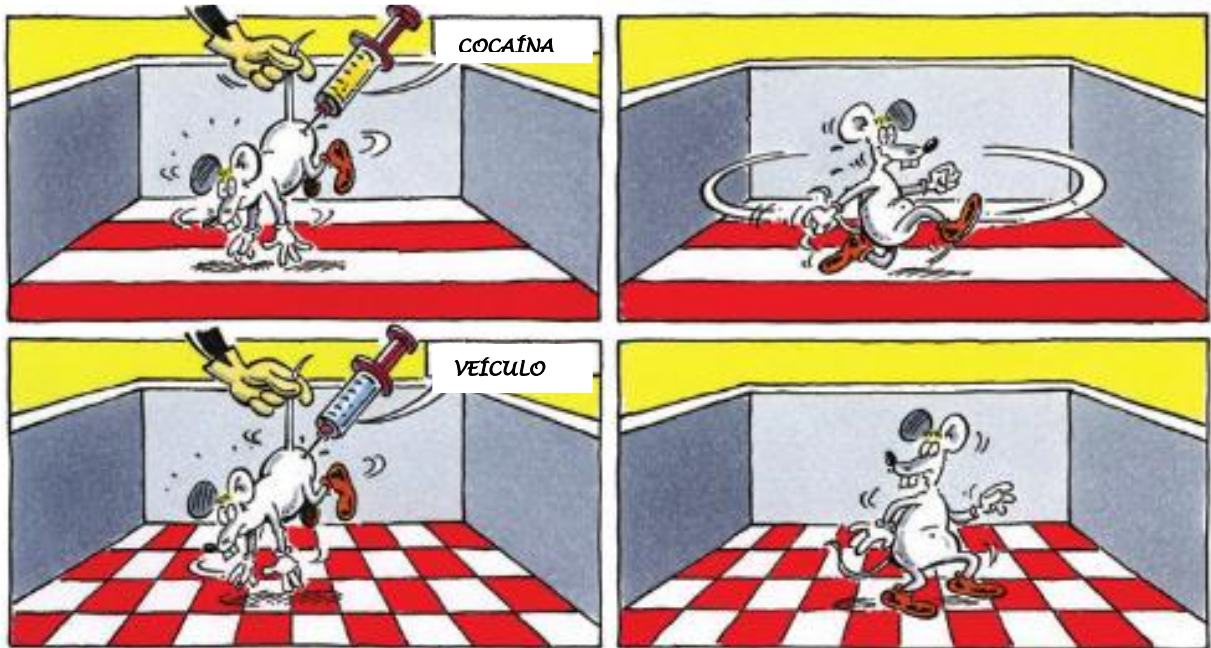
Em relação aos aspectos neuroanatômicos envolvidos na aprendizagem associativa de reforço positivo, estudos clínicos utilizando-se de técnicas de neuroimagem (Berke e Hyman, 2000; Ikemoto e Wise, 2004), bem como estudos experimentais (Di Chiara e Bassareo, 2007), mostraram que o hipocampo e a amígdala modulam ativamente o funcionamento da área tegumentar ventral, núcleo acumbente e córtex. Este circuito parece também ser importante para outros tipos de memórias contextuais, principalmente aqueles de características emocionais (Jarrard, 1995; Smith e Mizumori, 2006; Rudy, 2009; Fanselow e Dong, 2010).



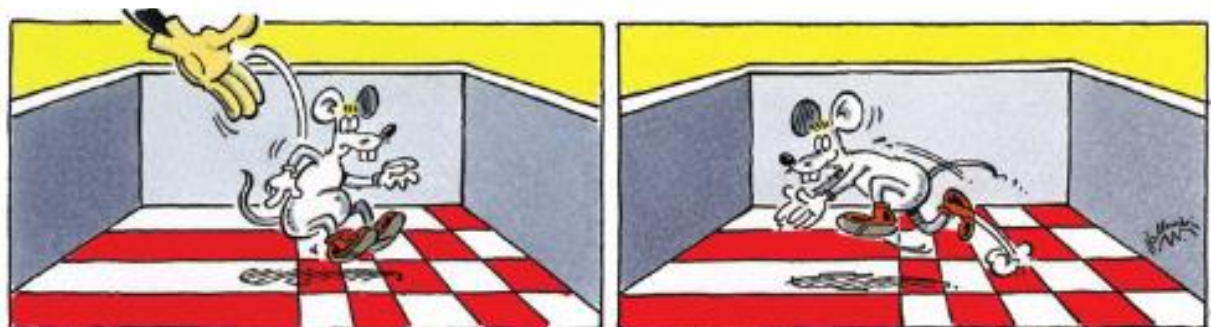
## HABITUAÇÃO



## SESSÕES DE CONDICIONAMENTO



## TESTE



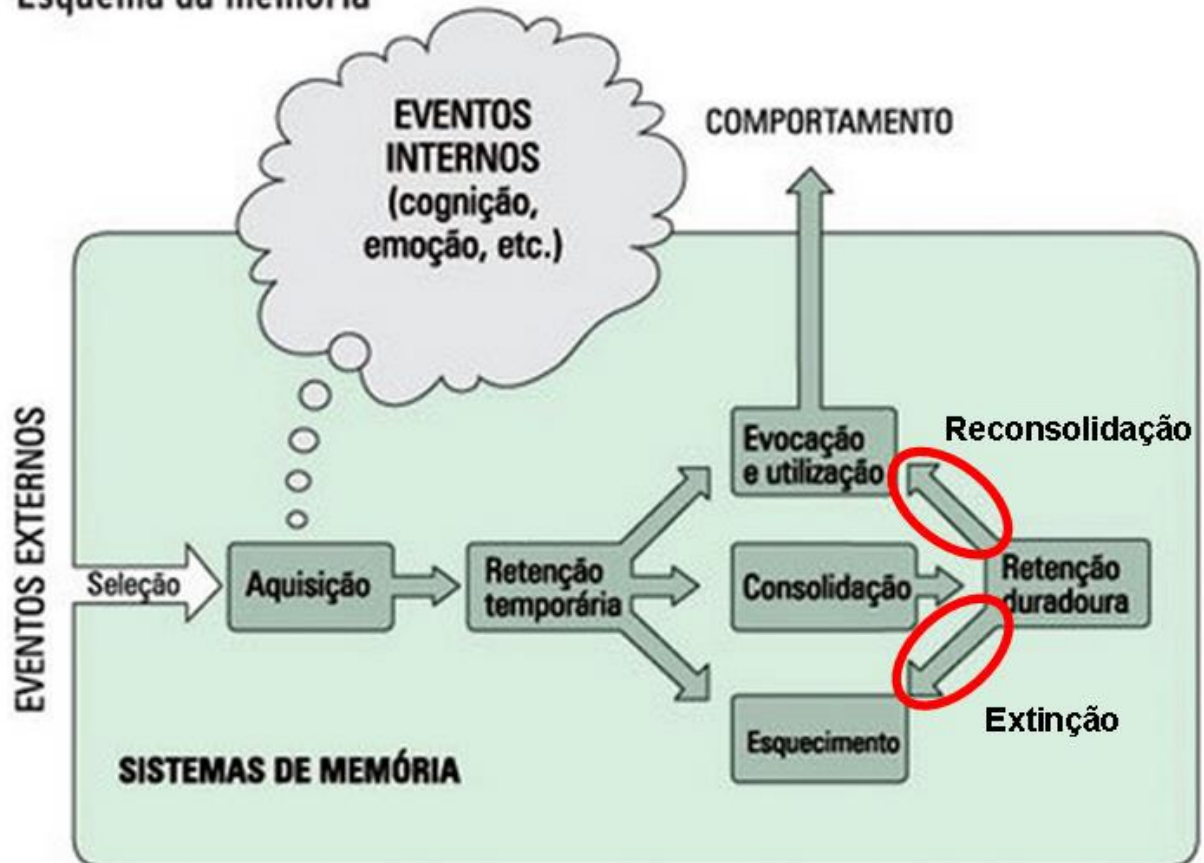
Fonte: Adaptado de Sanchis-Segura e Spanagel, 2006.

Figura 3 - Desenho esquemático representando o protocolo do modelo da preferência condicionada ao local.

A memória é classicamente definida como a capacidade de adquirir (aquisição), armazenar (consolidação) e recuperar (evocação) informações. De acordo com a teoria da consolidação, uma vez que as memórias são armazenadas,

as mesmas tornam-se estáveis e resistentes à modulação (McGaugh, 2015). Alternativamente surgiram evidências de que após ser evocada, por exemplo, através de protocolos de re-exposições às situações originais, a memória torna-se lábil e sujeita a modulação durante um determinado período, podendo ser extinta ou reconsolidada (Nader et al., 2000a, 2000b; Tronson e Taylor, 2007; Lee, 2008, 2009; Nader e Hardt, 2009; Hardt et al., 2010).

### Esquema da memória



Fonte: Adaptado de Roberto Lent, 2010.

Figura 4 - O esquema da memória.

Nas últimas duas décadas o fenômeno da reconsolidação vem sendo investigado de forma intensa. Grande parte do que se sabe provém de estudos utilizando modelos animais de memória contextual aversiva. Foi possível então determinar alguns papéis funcionais da reconsolidação. Alguns grupos mostraram que a reconsolidação é fundamental para fortalecer a memória, e desta forma, prevenir o seu decaimento (Nader et al., 2000b; Tronson e Taylor, 2007; Nader e Hardt, 2009). Este fortalecimento faz com que a memória se torne dependente do hipocampo por mais tempo, aumentando com isso a precisão e o seu detalhamento

(De Oliveira Álvares et al., 2012, 2013). Outros grupos defendem a hipótese que a reconsolidação tem um papel fundamental na atualização da memória, em ordem de manter a sua relevância. Neste caso, novas informações relacionadas à memória original passam a ser incorporadas a ela (Lee, 2008, 2009; Hardt et al., 2010; De Oliveira Álvares et al., 2013; Sierra et al., 2013; Haubrich et al., 2015).

A reconsolidação parece ser importante para o fortalecimento de memórias associativas relacionadas ao uso de drogas de abuso (Milekic et al., 2006; Valjent et al., 2006; Robinson e Franklin, 2007; Fan et al., 2010). Curiosamente, até o momento, não existem evidências diretas a cerca da reconsolidação sobre os processos de atualização deste tipo de memória. Tal estudo seria de extrema relevância, já que o uso de drogas está associado a vários contextos e estímulos condicionados, e não somente a um estímulo constante.

Do ponto de vista translacional, poderíamos analisar a reconsolidação no contexto das drogas de abuso a partir de duas vertentes principais. Na primeira situação o usuário teria o contato com a substância sempre em um mesmo contexto. Isto tornaria a memória associativa de reforço positivo mais robusta, precisa e duradoura. Por um lado esta estratégia seria interessante, já que somente este contexto em específico seria capaz de induzir fissura no dependente. Em uma segunda situação, o uso da droga em diferentes contextos induziria a constante atualização desta memória. No entanto, este processo de atualização poderia provocar o fenômeno da generalização da memória, já que qualquer contexto previamente associado ao uso da substância seria capaz de induzir fissura no dependente. Neste sentido, a reconsolidação estaria atuando como um agravante ao processo da drogadição. Fica então claro que a drogadição pode ser vista como uma memória aberrante que está sendo constantemente evocada e reconsolidada. Portanto, modular a reconsolidação representa uma estratégia terapêutica promissora para a drogadição (Milton e Everitt, 2010).

Alguns investigadores sugerem que a reconsolidação é um processo contínuo ao da consolidação de longa-duração, fazendo com que a memória se estabilize gradualmente (Dudai e Eisenberg, 2004; Alberini, 2005, 2011). Sendo assim, a incorporação de uma nova informação à memória original poderia ser vista como um novo aprendizado baseado em memórias evocadas. Tal situação envolveria o fenômeno da consolidação e não reconsolidação (Tronson e Taylor, 2007). Por outro lado, outro estudo investigando a dissociação dupla da consolidação e

reconsolidação de memórias contextuais de medo mostrou que a atualização da memória em decorrência de um novo episódio de aprendizado envolve seletivamente mecanismos de reconsolidação (Lee, 2008). Ou seja, ainda não se sabe ao certo se a atualização da memória envolve mecanismos de consolidação ou de reconsolidação.

Existem muitas similaridades entre a consolidação e reconsolidação quanto aos aspectos neuroquímicos. Várias manipulações farmacológicas bloqueiam tanto a consolidação quanto a reconsolidação da memória (Przybylski et al., 1999; Nader et al., 2000a; Sangha et al., 2003). Por outro lado, uma série de estudos mostrou que a consolidação e reconsolidação apresentam componentes dissociáveis (Lee et al., 2004; Alberini, 2005). Por exemplo, a infusão de oligonucleotídeo antisense para o fator de crescimento derivado do cérebro bloqueia a consolidação, mas não a reconsolidação, enquanto que o oligonucleotídeo antisense para o fator de transcrição zif268 apresenta efeitos contrários (Lee et al., 2004). Uma característica interessante é que tanto a consolidação quanto a reconsolidação dependem de síntese de novas proteínas. No entanto, o padrão temporal de síntese protéica é diferente entre estes dois mecanismos. Estudos utilizando paradigmas de memória contextual aversiva mostraram que a consolidação requer duas janelas temporais de síntese protéica, próxima a aquisição da informação e entre quatro horas após a aquisição (Bourtchuladze et al., 1998; Igaz et al., 2002; Nader et al., 2005). Por outro lado, a inibição de síntese protéica imediatamente após (mas não em outros períodos) a reativação da memória prejudica a reconsolidação e a retenção desta memória em diferentes testes comportamentais, como no medo condicionado (Nader et al., 2000b) e na sensibilização locomotora contextual induzida por cocaína (Bernardi et al., 2007). Esta diferença temporal de síntese protéica tem sido bastante explorada e o uso de fármacos que inibem a síntese de novas proteínas representa uma ferramenta de validação farmacológica importante em desenhos experimentais relacionados à consolidação e reconsolidação.

Conforme descrito anteriormente, existe a necessidade da labilização da memória para que ocorra o fenômeno da reconsolidação. A labilização da memória ocorre a partir de sua evocação, o que não significa que a evocação e labilização são fenômenos únicos. De fato, uma memória pode ser evocada, no entanto, não necessariamente ser labilizada (Nader et al., 2000a, 2000b; Tronson e Taylor, 2007;

Lee, 2008, 2009; Nader e Hardt, 2009; Hardt et al., 2010). Embora ainda se saiba pouco sobre os mecanismos neuroquímicos envolvidos na labilização da memória (Cain et al., 2002; Bem Mamou et al., 2006; Lee et al., 2008; Suzuki et al., 2008; Flavell et al., 2011; Rao-Ruiz et al., 2011), alguns estudos mostraram que a ativação de canais de cálcio do tipo L é requerida para a desestabilização da memória que foi evocada (Cain et al., 2002; Suzuki et al., 2008; Flavell et al., 2011). Nestes estudos, a administração de nimodipina, um bloqueador de canal de cálcio do tipo L, foi capaz de inibir seletivamente a labilização da memória.

Tendo como premissa que a atualização da memória é um evento neurobiológico importante na drogadição, torna-se necessário um olhar mais atento para este processo. Sendo assim, no presente estudo buscamos investigar se a atualização da memória associativa de reforço positivo induzida pela cocaína envolve mecanismos de consolidação e/ou reconsolidação.

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 Geral**

Verificar o papel da consolidação e reconsolidação na atualização da memória associativa apetitiva.

### **2.2 Específico**

Verificar o efeito de diferentes protocolos de tratamento de ciclohexamida, um inibidor de síntese protéica, após sessões de re-exposição sobre a preferência condicionada ao local induzida pela cocaína em camundongos.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57/BL6J machos adultos provenientes do CEDEME – UNIFESP, N=347. Os animais foram mantidos em caixa moradia com livre acesso à ração e água, em condições controladas de temperatura, umidade e em ciclo claro-escuro de 12 horas. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Animais da UNIFESP (CEP N° 0280/12).

#### 3.2 Protocolo comportamental

O aparelho utilizado consiste de uma caixa de acrílico dividida em dois compartimentos periféricos A e B conectados entre si por um compartimento central. Os compartimentos periféricos diferenciam-se entre si pelo padrão visual da parede e textura do piso (Figura 5). O protocolo foi adaptado de Itzhak (2008) e envolveu cinco fases: pré-teste, fase de condicionamento, teste 1, re-exposição e teste 2.



Fonte: Laboratório de Neurobiologia, UNIFESP.

**Figura 5 - Aparato de preferência condicionada ao local utilizado no presente estudo.**

### **3.2.1 Pré-teste**

No primeiro dia de experimento (D1), os animais tiveram livre acesso aos três compartimentos do aparelho por 15 minutos, sendo avaliado o tempo de permanência em cada um dos compartimentos periféricos. Os animais que apresentaram preferência por algum dos compartimentos (tempo de permanência 25% superior ao compartimento oposto) foram eliminados do experimento.

### **3.2.2 Condicionamento**

Após a fase de pré-teste, foram realizados pareamentos diários durante seis dias (D2-D7). Nos D3, D5 e D7 os animais foram injetados com cocaína (20 mg/Kg, i.p.) (Grupos Cocaína) ou solução salina (Grupo Controle) e logo em seguida confinados em um dos compartimentos periféricos por 30 minutos. Já nos D2, D4 e D6 os animais de todos os grupos experimentais foram injetados com solução salina e submetidos ao pareamento no compartimento periférico oposto ao utilizado nos D3, D5 e D7.

### **3.2.3 Teste 1**

Um dia após a fase de condicionamento (D8), em um estado livre de droga, os animais tiveram acesso aos três compartimentos do aparelho durante 15 minutos. Assim como no pré-teste foi avaliado o tempo de permanência em cada um dos compartimentos periféricos. Foi então calculado para cada animal o escore de preferência condicionada (CPP), subtraindo-se o tempo de permanência no compartimento pareado com a droga no Teste 1 do mesmo tempo obtido no Pré-teste.

### **3.2.4 Re-exposição**

O protocolo de re-exposição variou de acordo com o experimento realizado. As variáveis incluíram: i. a presença ou ausência da droga no momento da re-exposição; ii. o contexto utilizado na exposição: contexto original, contexto alterado,



ou mesmo a ausência do contexto (neste caso os animais permaneceram nas suas respectivas caixas moradias). Independente das variáveis em questão, tal protocolo iniciou-se 7 dias após o Teste 1, e consistiu de 3 re-exposições em dias alternados (D15, D17, D19). Cada re-exposição teve duração de 15 minutos.

No caso da alteração do contexto, houve alterações discretas do contexto original em cada sessão de re-exposição, a fim de promover a atualização da memória original. Na primeira re-exposição uma das paredes do compartimento teve seu padrão visual alterado. Na segunda re-exposição tal alteração foi efetuada em uma parede adicional e na terceira re-exposição a alteração também ocorreu em mais uma parede do contexto.

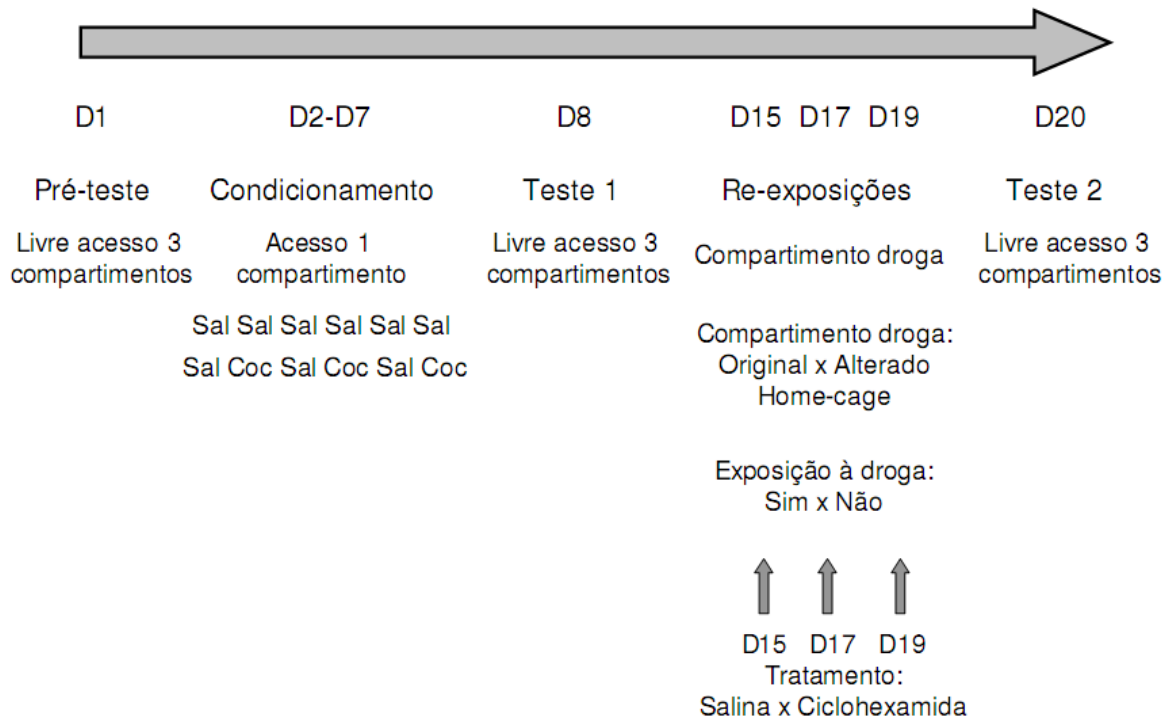
### **3.2.5 Teste 2**

Para avaliar o impacto do protocolo de re-exposição sobre a preferência condicionada ao local, foi realizado um teste adicional similar àquele do D8 – Teste 2 (D20). De acordo com o experimento realizado, o Teste 2 ocorreu no aparelho com o contexto original ou então com o contexto modificado. A partir do tempo de permanência no compartimento que foi manipulado na re-exposição, obteve-se o escore de preferência condicionada ao local no Teste 2, subtraindo-se o tempo de permanência neste contexto durante o Teste 2 em relação ao tempo verificado no pré-teste.

Considerando então todas as fases do protocolo comportamental, o desenho experimental geral do presente estudo encontra-se ilustrado na Figura 6.

### **3.3 O tratamento com inibidor de síntese protéica**

Tendo em vista que tanto o processo de consolidação quanto o de reconsolidação são dependentes de síntese de novas proteínas, e considerando que a diferença neste caso versa somente na janela temporal de síntese, foi utilizado como ferramenta farmacológica um inibidor de síntese protéica – a ciclohexamida. Para tanto, os grupos experimentais de interesse foram submetidos ao tratamento com ciclohexamida (15mg/kg, s.c.), em diferentes momentos após cada re-exposição e com nimodipina (16mg/kg, i.p.), 30 minutos antes de cada re-exposição.



**Figura 6 - Desenho experimental geral.**

### **3.4. Análise estatística**

A análise estatística utilizada encontra-se descrita na sessão de resultados, já que foram realizadas análises distintas para os diferentes experimentos. Independente da análise utilizada considerou-se diferença significativa quando o valor de P foi menor que 0,05.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Experimento 1

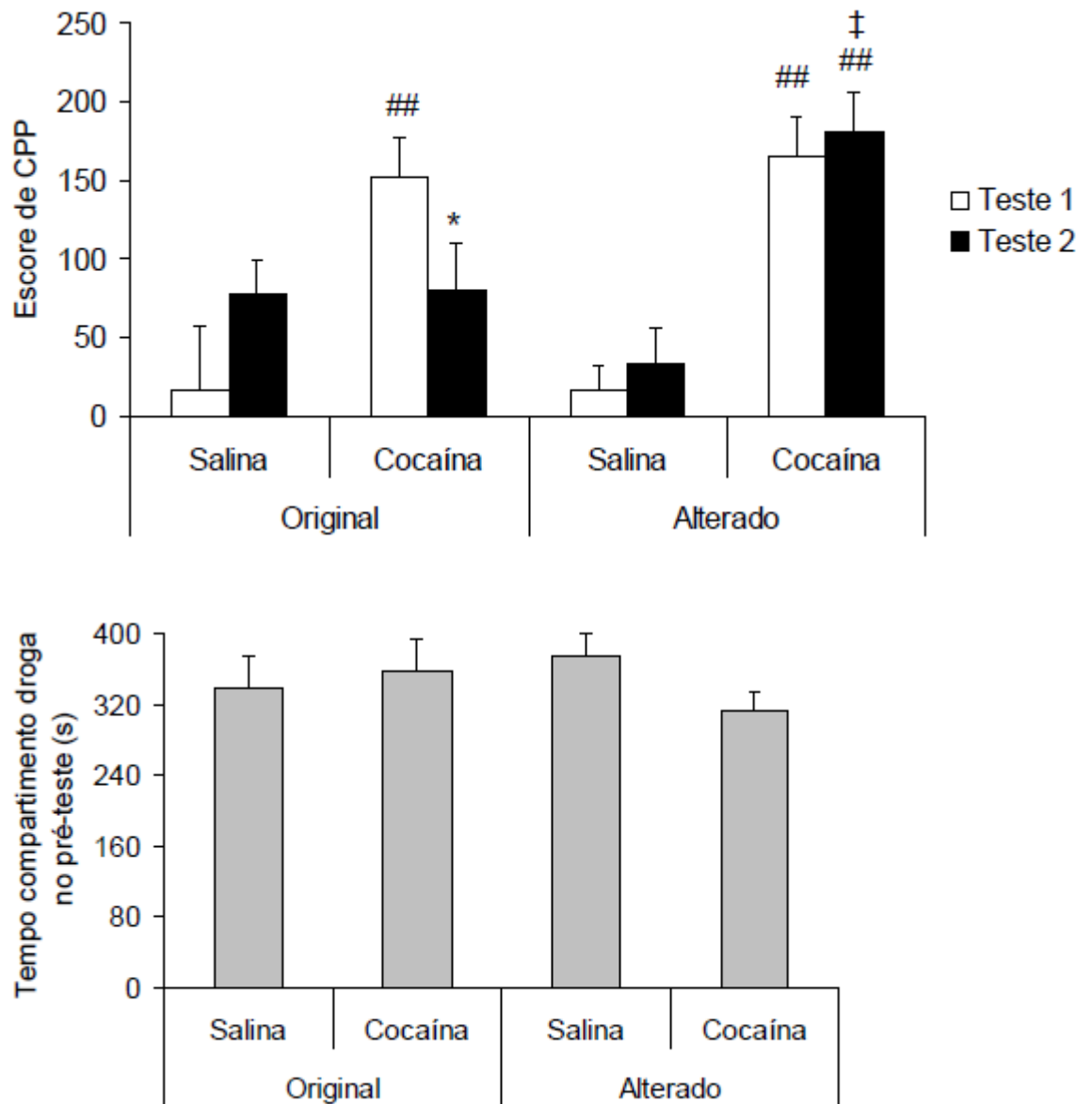
O primeiro experimento foi realizado para verificar se alterações discretas durante o protocolo de re-exposição poderiam ser assimiladas pelos animais em um novo teste de preferência (Teste 2). Tal verificação seria essencial para se estudar o fenômeno da atualização da memória. Para tanto, parte dos animais foi submetida a re-exposição no contexto original e a outra parte no contexto com alterações. O Teste 2 foi realizado no contexto com alterações para todos os animais. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 7.

ANOVA de medidas repetidas detectou diferença no fator grupo [ $F(3,40)=13,67$   $P<0,01$ ], mas não no fator sessão [ $F(1,40)=0,43$   $P=0,51$ ]. Não houve interação entre os fatores [ $F(3,40)=2,41$   $P=0,08$ ]. Conforme esperado, Newman Keuls *pos hoc* mostrou que os animais pareados com cocaína (mas não com salina) foram capazes de desenvolver preferência condicionada ao local. Houve uma diminuição significativa do escore de CPP no Teste 2 em relação ao Teste 1 nos animais pareados com cocaína e submetidos a re-exposições no contexto original.

Em relação especificamente ao escore de CPP no Teste 2, análise adicional utilizando ANOVA de duas vias detectou diferença no fator tratamento [ $F(1,40)=5,55$   $P<0,05$ ] mas não no fator contexto [ $F(1,40)=0,25$   $P<0,62$ ]. Houve interação entre os fatores [ $F(1,40)=11,85$   $P<0,01$ ]. Newman Keuls *pos hoc* mostrou que, entre os animais pareados com cocaína, as mudanças contextuais durante a re-exposição determinaram maior preferência ao local no Teste 2.

Finalmente, a fim de determinar se os dados referentes ao escore de preferência foram decorrentes de vieses de uma possível preferência não condicionada, foi analisado o tempo de permanência no compartimento pareado com a droga durante a sessão pré-teste. ANOVA de duas vias não detectou diferença nos fatores tratamento [ $F(1,40)=0,06$   $P=0,81$ ] e contexto [ $F(1,40)=1,69$   $P=0,21$ ], além de não ter havido interação entre estes fatores [ $F(1,40)=0,06$   $P=0,94$ ]. Este experimento foi importante no sentido de sinalizar que as alterações proporcionadas durante a re-exposição foram assimiladas pelos animais, haja vista que o Teste 2 foi realizado com o contexto alterado. Além disso, tais alterações de

fato mudaram significativamente o contexto, já que os animais submetidos às re-exposições no contexto original, não foram capazes de desenvolver preferência condicionada ao local no Teste 2. Por outro lado, como nas re-exposições todos os animais (incluindo os pareados com salina) foram tratados com cocaína, os dados deste primeiro experimento não nos permitiram inferir se houve o fenômeno da reconsolidação, ou então a consolidação de uma nova informação.



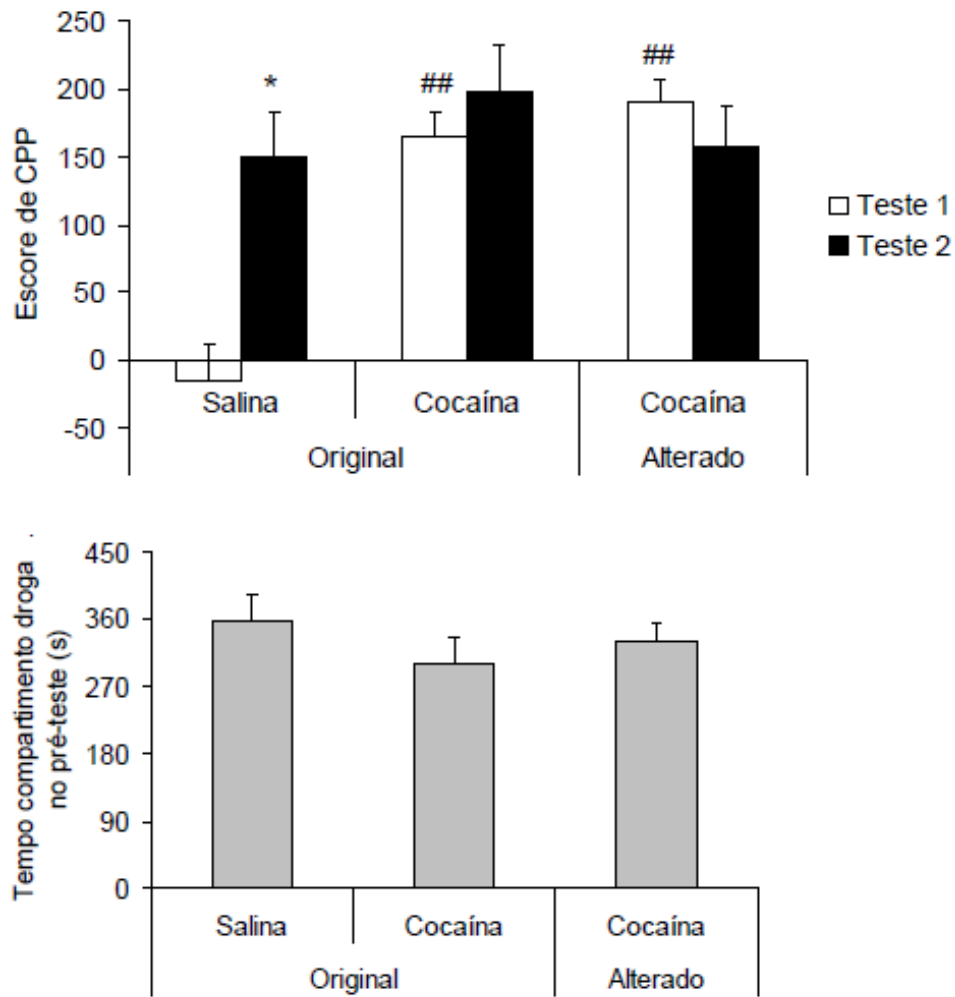
**Figura 7 - Gráfico do Experimento 1.** Efeito da manipulação do contexto durante as re-exposições sobre a expressão da preferência condicionada ao local induzida pela cocaína. Para cada grupo experimental, em uma metade as re-exposições foram realizadas no contexto original, enquanto na outra metade, a cada re-exposição houve uma leve alteração no contexto original. Para todos os grupos experimentais, o teste 2 foi realizado no contexto alterado. A. Escore de CPP. B. Tempo de permanência no compartimento pareado com a droga durante a sessão pré-teste. Os dados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. \*  $P < 0,05$  em relação ao Teste 1. ##  $P < 0,01$  em relação ao grupo Salina, ‡  $P < 0,05$  em relação ao contexto original.  $N = 44$ .

## 4.2 Experimento 2

O experimento 2 foi similar ao anterior. No entanto, neste caso, o Teste 2 foi realizado no contexto original, e não no contexto alterado. Utilizamos três grupos experimentais: um pareado com salina e re-exposto ao contexto original, e dois pareados com cocaína, sendo um re-exposto ao contexto original e outro em contexto sofrendo modificações. Os dados estão apresentados na Figura 8.

ANOVA de medidas repetidas detectou diferenças nos fatores grupo [ $F(2,39)=4,48$   $P<0,05$ ] e sessão [ $F(1,39)=11,61$   $P<0,01$ ], com interação significativa entre eles [ $F(2,39)=11,87$   $P<0,01$ ]. Conforme esperado, os grupos pareados com cocaína tiveram maior escore de CPP quando comparado ao grupo pareado com salina no Teste 1. Interessantemente este grupo pareado com salina apresentou aumento significativo do escore de CPP no Teste 2, quando comparado ao valor visto no Teste 1. A análise do tempo de permanência no compartimento pareado com a droga durante a sessão pré-teste (ANOVA de uma via considerando os três grupos experimentais) não mostrou diferença significativa [ $F(2,39)=0,59$   $P=0,56$ ].

Este experimento foi importante no sentido de mostrar que para os animais previamente pareados com salina, a re-exposição ao contexto original na vigência do efeito psicoativo da droga pode alterar a valência emocional do contexto. No entanto, estes dados são insuficientes para afirmar que tal alteração seja decorrente de processos de consolidação de uma nova informação ou reconsolidação. Além disso, os resultados deste experimento mostraram que a re-exposição ao contexto original é importante para a manutenção do traço, independente da condição contextual da re-exposição. Ou seja, mesmo que as re-exposições sejam efetuadas mediante alterações contextuais, o traço ainda se mantém.



**Figura 8 - Gráfico do Experimento 2.** Efeito da manipulação do contexto (realizada em contexto original ou com modificações contextuais) durante as re-exposições sobre a expressão da preferência condicionada ao local induzida pela cocaína. O teste 2 foi realizado no contexto original. A. Escore de CPP. B. Tempo de permanência no compartimento pareado com a droga durante a sessão pré-teste. Os dados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. \*  $P < 0,05$  em relação ao Teste 1. ##  $P < 0,01$  em relação ao grupo Salina.  $N = 42$ .

### 4.3 Experimento 3

Concluído o segundo experimento, optamos por realizar um experimento adicional, no qual incluímos uma série de grupos controles, a fim de estabelecer com mais clareza a importância da re-exposição sobre o escore de CPP no Teste 2. Neste terceiro experimento utilizamos três grupos. Em um grupo os animais foram pareados com salina, a re-exposição ocorreu no contexto alterado e com injeção de salina (e não cocaína), e o Teste 2 foi feito no contexto alterado. Nos outros dois grupos, um foi pareado com salina e o outro com cocaína, e ambos não sofreram protocolo de re-exposição e o Teste 2 foi realizado no contexto original. Os resultados obtidos encontram-se ilustrados na Figura 9.

ANOVA de medidas repetidas mostrou diferença no fator grupo [ $F(2,39)=27,91$   $P<0,01$ ], mas não no fator sessão [ $F(1,39)=0,41$   $P=0,53$ ]. Não houve interação entre os fatores [ $F(2,39)=2,23$   $P=0,12$ ]. Conforme esperado o grupo de animal pareado com cocaína teve escore de CPP mais elevado no Teste 1 quando comparado aos demais grupos pareados com salina. Este padrão se manteve no Teste 2. A análise do tempo de permanência no compartimento pareado com a droga durante a sessão pré-teste (ANOVA de uma via considerando os três grupos experimentais) não mostrou diferença significativa [ $F(2,39)=1,57$   $P=0,22$ ].

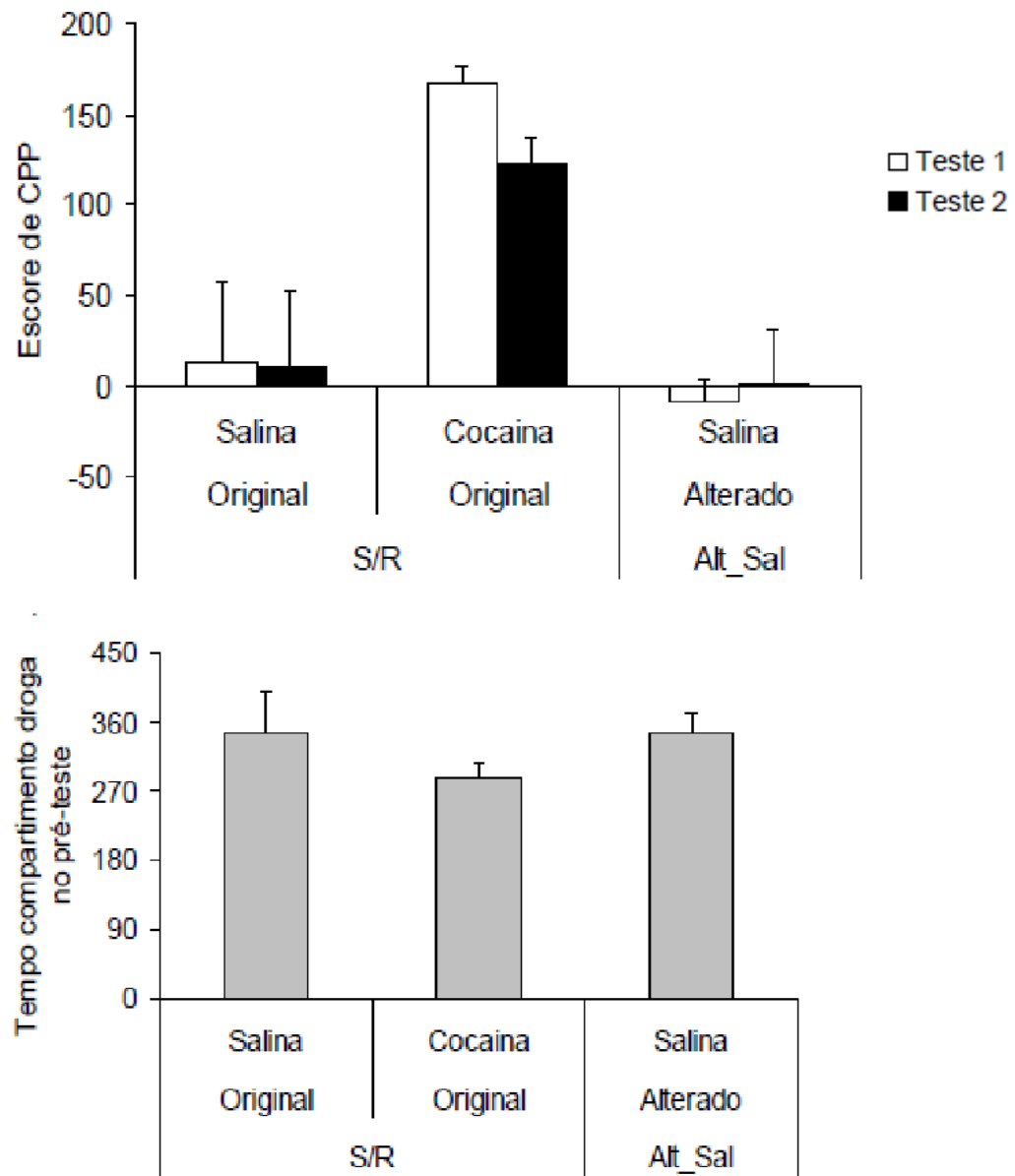
A análise conjunta dos três experimentos mostraram que: (i) O traço é mantido nos animais pareados com cocaína, independente do fator re-exposição; (ii) nos animais pareados com salina, o tratamento com cocaína na fase de re-exposição tem um efeito expressivo no Teste 2, seja ele decorrente da aquisição de uma nova memória, ou então da atualização da valência emocional da memória original.

Além disso, poderíamos sugerir a existência do fenômeno da reconsolidação em duas situações: i. nos animais pareados com solução salina, submetido às re-exposições com alterações contextuais e sobre o efeito da cocaína, e testados no Teste 2 com o contexto original; ii. nos animais pareados com cocaína, submetidos às re-exposições com alterações contextuais e sobre o efeito da droga, e testados no Teste 2 no contexto alterado.

No intuito de validar farmacologicamente o modelo, nos próximos experimentos os animais foram tratados com inibidor de síntese protéica (ciclohexamida) ou antagonista dos canais de cálcio voltagem dependente do tipo L



(nimodipina).



**Figura 9 - Gráfico do Experimento 3.** Dados representando os grupos controles adicionais do estudo. O primeiro grupo (Salina – Original – S/R) inclui animais pareados com salina, sem serem submetidos às re-exposições (S/R) e o Teste 2 realizado no contexto original. O segundo grupo (Cocaína – Original – S/R) foi similar ao primeiro, no entanto os animais foram pareados com cocaína. Finalmente o terceiro grupo (Salina – Alterado – Alt\_Sal), os animais foram pareados com salina, submetidos às re-exposições com tratamento salina e o Teste 2 foi realizado no contexto alterado. A. Escore de CPP. B. Tempo de permanência no compartimento pareado com a droga durante a sessão pré-teste. Os dados estão expressos como média ± E.P.M. N=42.

#### 4.4 Experimento 4

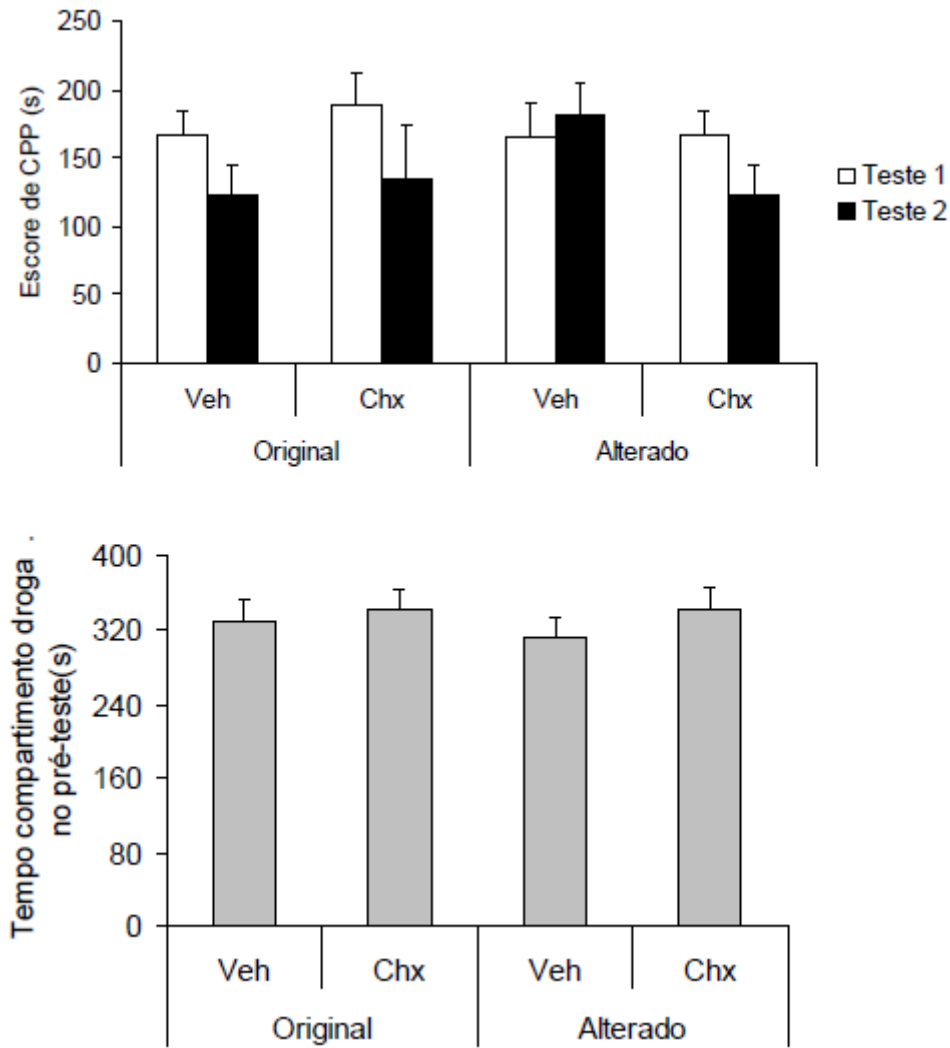
Neste experimento os animais foram pareados com cocaína, submetidos a re-exposição no contexto alterado sob o efeito de cocaína, e submetido ao Teste 2 tanto no contexto original quanto no alterado. Além disso, os animais receberam ciclohexamida (15 mg/kg, i.p.) logo após cada re-exposição. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 10.

ANOVA de medidas repetidas não detectou diferença no fator grupo [ $F(3,51)=0,42$   $P=0,74$ ], e no fator sessão [ $F(1,51)=3,17$   $P=0,08$ ]. Não houve interação entre os fatores [ $F(3,51)=0,92$   $P=0,44$ ]. Não houve diferença entre nenhum dos grupos experimentais nem no Teste 1 e nem no Teste 2. Além disso, dentro de cada grupo, o escore de Cpp no Teste 2 foi sempre similar ao visto no Teste 1.

Em relação especificamente ao escore de CPP no Teste 2, análise adicional utilizando ANOVA de duas vias não detectou diferença no fator tratamento [ $F(1,51)=1,56$   $P=0,22$ ] e nem no fator contexto do Teste 2 [ $F(1,51)=0,03$   $P=0,86$ ]. Não houve interação entre os fatores [ $F(1,51)=0,28$   $P=0,61$ ]. Não houve diferença entre nenhum dos grupos experimentais.

Finalmente, a fim de determinar se os dados referentes ao escore de preferência foram decorrentes de vieses de uma possível preferência não condicionada, foi analisado o tempo de permanência no compartimento pareado com a droga durante a sessão pré-teste. ANOVA de duas vias não detectou diferença nos fatores tratamento [ $F(1,51)=0,62$   $P=0,43$ ] e contexto [ $F(1,51)=0,09$   $P=0,76$ ], além de não ter havido interação entre estes fatores [ $F(1,51)=0,12$   $P=0,73$ ].

Os dados obtidos neste experimento sinalizaram uma falta de efeito da ciclohexamida quando administrada logo após cada re-exposição. Neste sentido, considerando a questão temporal de síntese protéica, os achados sugerem que o presente protocolo não foi capaz de recrutar mecanismos de reconsolidação.



**Figura 10 - Gráfico do Experimento 4.** Dados representando o efeito do tratamento com ciclohexamida (15 mg/kg, i.p.) logo após cada re-exposição, nos animais pareados com cocaína, submetidos a re-exposição no contexto alterado sob o efeito da droga, e ao Teste 2 tanto no contexto original como no contexto alterado. A. Escore de CPP. B. Tempo de permanência no compartimento pareado com a droga durante a sessão pré-teste. Os dados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. N=52.

## 4.5 Experimento 5

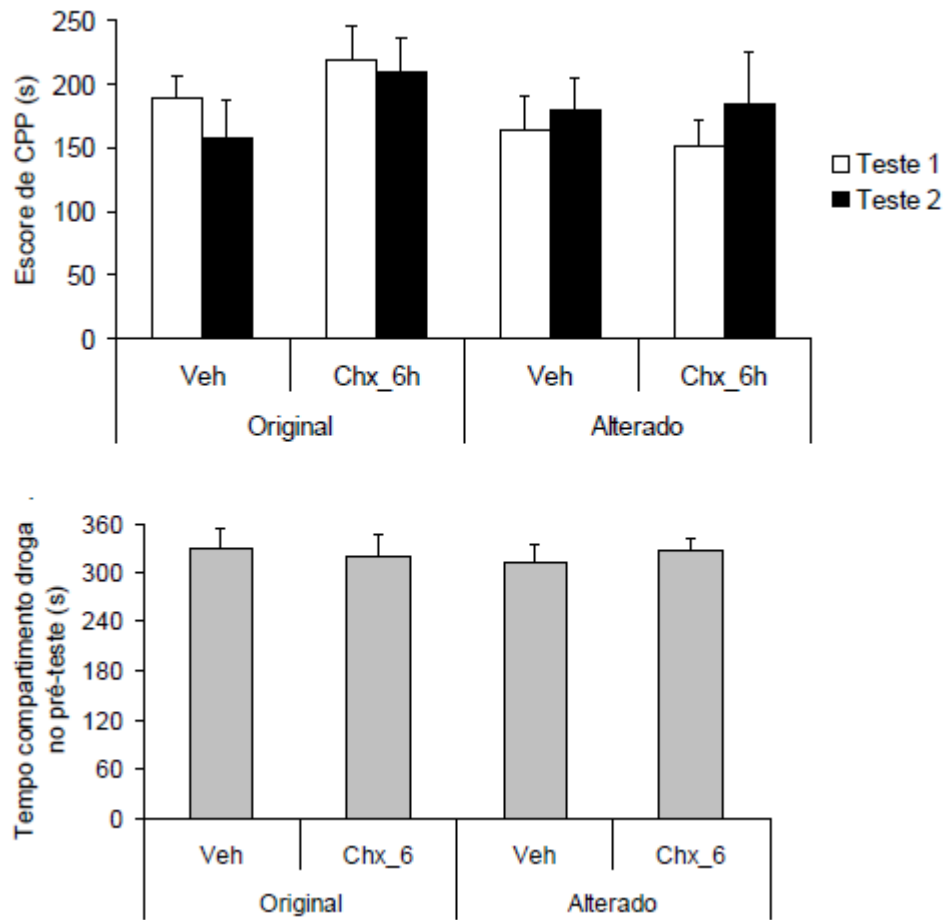
Como não vimos efeito da ciclohexamida logo após cada re-exposição (mimetizando com isso a inibição da síntese protéica na janela da reconsolidação), optamos por fazer um tratamento tardio 6 horas após cada re-exposição a fim de investigar se os resultados obtidos foram decorrentes de mecanismos de consolidação (e não reconsolidação). Os dados estão ilustrados na Figura 11.

ANOVA de medidas repetidas não detectou diferença no fator grupo [ $F(3,45)=0,54$   $P=0,66$ ], e no fator sessão [ $F(1,45)=0,01$   $P=0,93$ ]. Não houve interação entre os fatores [ $F(3,51)=0,83$   $P=0,48$ ]. Não houve diferença entre nenhum dos grupos experimentais nem no Teste 1 e nem no Teste 2. Além disso, dentro de cada grupo, o escore de Cpp no Teste 2 foi sempre similar ao visto no Teste 1.

Em relação ao escore de CPP no Teste 2, análise adicional utilizando ANOVA de duas vias não detectou diferença no fator tratamento [ $F(1,45)=0,56$   $P=0,46$ ] e nem no fator contexto do Teste 2 [ $F(1,45)=0,01$   $P=0,98$ ]. Não houve interação entre os fatores [ $F(1,45)=0,43$   $P=0,52$ ]. Não houve diferença entre nenhum dos grupos experimentais.

Finalmente, a fim de determinar se os dados referentes ao escore de preferência foram decorrentes de vieses de uma possível preferência não condicionada, foi analisado o tempo de permanência no compartimento pareado com a droga durante a sessão pré-teste. ANOVA de duas vias não detectou diferença nos fatores tratamento [ $F(1,45)=0,01$   $P=0,95$ ] e contexto [ $F(1,45)=0,05$   $P=0,83$ ], além de não ter havido interação entre estes fatores [ $F(1,45)=0,17$   $P=0,68$ ].

Os dados obtidos neste experimento sinalizaram uma falta de efeito da ciclohexamida quando administrada 6 horas após cada re-exposição. No entanto, isso não significa que não esteja ocorrendo o fenômeno da consolidação, levando-se em consideração a sua longa e extensa janela temporal quanto à dependência de síntese protéica.



**Figura 11 - Gráfico do Experimento 5.** Dados representando o efeito do tratamento com ciclohexamida ( ) 6 horas após cada re-exposição, nos animais pareados com cocaína, submetidos a re-exposição no contexto alterado sob o efeito da droga, e ao Teste 2 tanto no contexto original como no contexto alterado. A. Escore de CPP. B. Tempo de permanência no compartimento pareado com a droga durante a sessão pré-teste. Os dados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. N=48.

## 4.6 Experimento 6

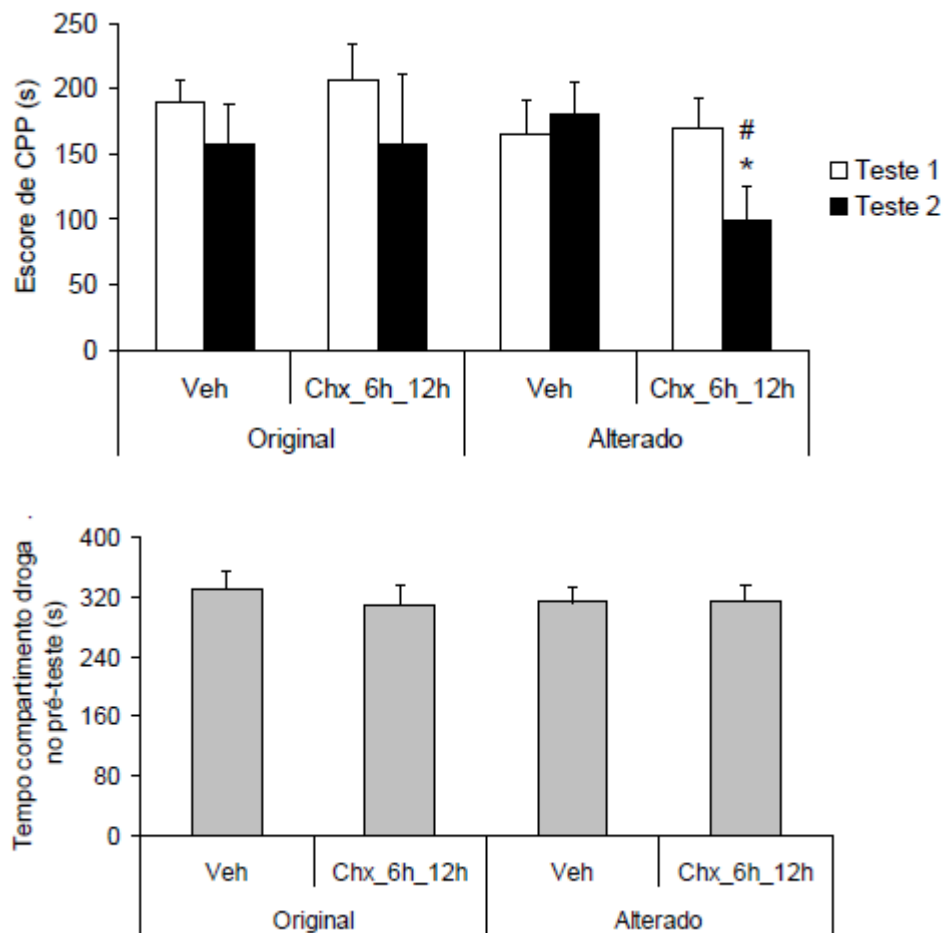
Considerando a longa janela temporal dependente de síntese protéica na consolidação, optamos por realizar neste experimento o tratamento com ciclohexamida em 2 administrações uma 6 h e a outra 12 h após cada re-exposição. Os resultados estão descritos na Figura 12.

ANOVA de medidas repetidas não detectou diferença no fator grupo [ $F(3,47)=0,58$   $P=0,63$ ], e no fator sessão [ $F(1,47)=3,01$   $P=0,09$ ]. Não houve interação entre os fatores [ $F(3,47)=0,85$   $P=0,47$ ]. Embora ANOVA não tenha detectado nenhuma diferença, o teste Newman-Keuls *post hoc* mostrou que os animais testados no contexto alterado e que receberam ciclohexamida após as re-exposições tiveram uma diminuição significativa ( $P<0,05$ ) do escore de Cpp no Teste 2 quando comparado ao respectivo valor no Teste 1.

Em relação especificamente ao escore de CPP no Teste 2, análise adicional utilizando ANOVA de duas vias não detectou diferença no fator tratamento [ $F(1,47)=1,22$   $P=0,28$ ] e nem no fator contexto do Teste 2 [ $F(1,47)=0,22$   $P=0,64$ ]. Não houve interação entre os fatores [ $F(1,47)=1,16$   $P=0,29$ ]. Embora ANOVA não tenha detectado nenhuma diferença, o teste Newman-Keuls *post hoc* mostrou que os animais testados no contexto alterado e que receberam ciclohexamida após as re-exposições tiveram uma diminuição significativa ( $P<0,05$ ) do escore de Cpp no Teste 2 quando comparado ao respectivo grupo tratado com veículo.

Finalmente, a fim de determinar se os dados referentes ao escore de preferência foram decorrentes de vieses de uma possível preferência não condicionada, foi analisado o tempo de permanência no compartimento pareado com a droga durante a sessão pré-teste. ANOVA de duas vias não detectou diferença nos fatores tratamento [ $F(1,47)=0,11$   $P=0,74$ ] e contexto [ $F(1,47)=0,06$   $P=0,79$ ], além de não ter havido interação entre estes fatores [ $F(1,47)=0,15$   $P=0,71$ ].

Os dados obtidos neste experimento sinalizaram que a dinâmica apresentada pelo grupo pareado com cocaína e submetidos a re-exposição e ao Teste 2 no contexto alterado se trata de um fenômeno de consolidação e não de reconsolidação. Neste sentido, não podemos dizer que neste caso esteja ocorrendo atualização do traço, e sim, a formação de uma nova memória.



**Figura 12 - Gráfico do Experimento 6.** Dados representando o efeito do tratamento com ciclohexamida ( ) 6 e 12 horas após cada re-exposição, nos animais pareados com cocaína, submetidos a re-exposição no contexto alterado sob o efeito da droga, e ao Teste 2 tanto no contexto original como no contexto alterado. A. Escore de CPP. B. Tempo de permanência no compartimento pareado com a droga durante a sessão pré-teste. Os dados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. N=50. \*  $P < 0,05$  em relação ao Teste 1. #  $P < 0,05$  em relação ao respectivo grupo tratado com veículo.

## 4.7 Experimento 7

Diante dos resultados negativos obtidos no Experimento 4, no que se refere a falta de efeito da ciclohexamida quando administrada logo após as re-exposições, buscamos utilizar uma outra ferramenta farmacológica a fim de poder inferir com segurança que o protocolo adotado não recruta mecanismos de reconsolidação. Para tanto, utilizamos a nimodipina (15 mg/kg, i.p.), um bloqueador de canal de cálcio voltagem dependente. Todos os animais foram submetidos a re-exposição sob o efeito da cocaína, e o tratamento com nimodipina foi realizado 30 minutos antes de cada re-exposição. Foram formados quatro grupos experimentais: i. animais pareados com salina, submetidos ao protocolo de re-exposição e ao Teste 2 no contexto alterado; ii. animais pareados com cocaína, submetidos ao protocolo de re-exposição e ao Teste 2 no contexto alterado; iii. animais pareados com salina, submetidos ao protocolo de re-exposição no contexto alterado e Teste 2 no contexto original; iv. animais pareados com cocaína, submetidos ao protocolo de re-exposição no contexto alterado e Teste 2 no contexto original. Os resultados estão descritos na Figura 13.

ANOVA de medidas repetidas detectou diferença no fator grupo [ $F(3,65)=15,38$   $P<0,01$ ], e no fator sessão [ $F(1,65)=46,11$   $P<0,01$ ], com interação entre os fatores [ $F(3,65)=17,99$   $P<0,01$ ]. O teste Newman-Keuls *post hoc* mostrou que nos animais pareados com salina houve um aumento significativo do escore de Cpp no Teste 2 quando comparado ao respectivo valor no Teste 1 ( $P<0,01$ ). Este aumento ocorreu independente da condição do contexto no Teste 2 (alterado ou original). Quanto aos animais pareados com cocaína, não houve diferença entre o escore de CPP no Teste 2 e Teste 1, independente da condição do contexto no Teste 2.

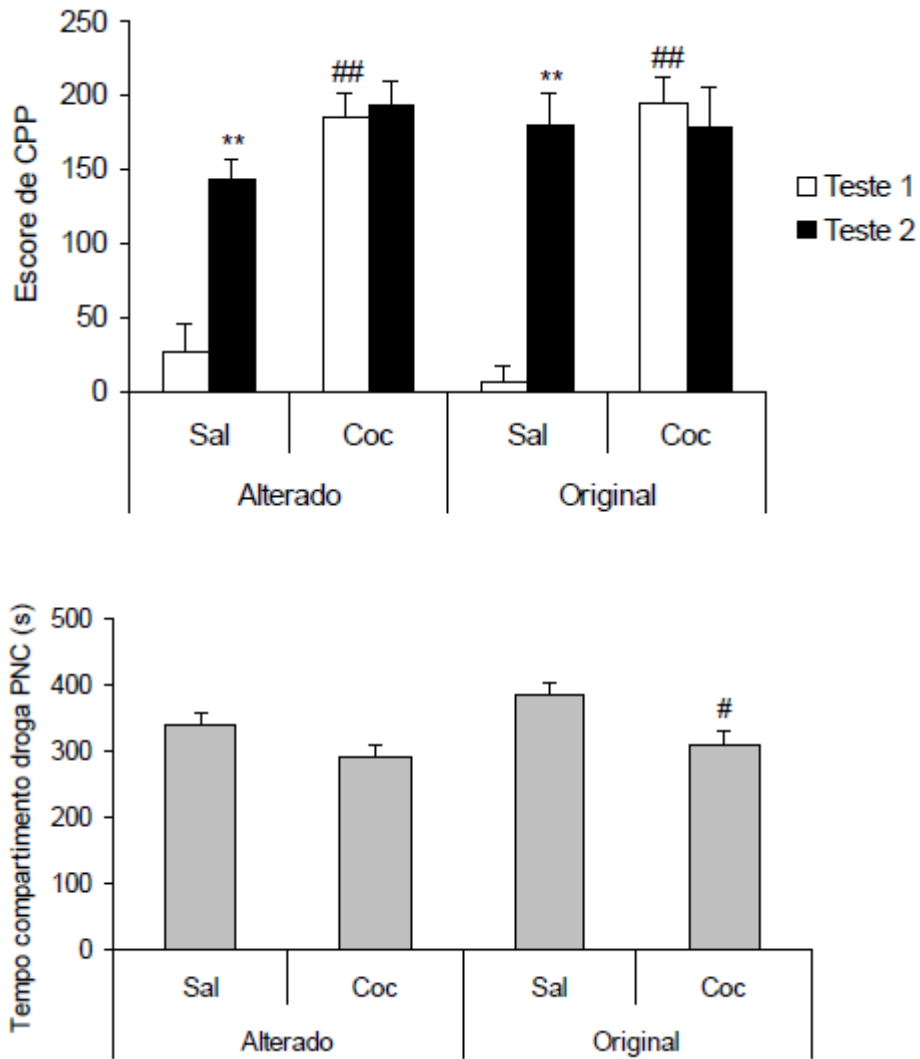
Em relação especificamente ao escore de CPP no Teste 2, análise adicional utilizando ANOVA de duas vias não detectou diferença no fator droga do paramento (salina x cocaína) [ $F(1,65)=2,92$   $P=0,09$ ] e nem no fator contexto do Teste 2 (original x alterado) [ $F(1,65)=0,79$   $P=0,38$ ]. Não houve interação entre os fatores [ $F(1,65)=2,15$   $P=0,15$ ].

Finalmente, a fim de determinar se os dados referentes ao escore de preferência foram decorrentes de vieses de uma possível preferência não condicionada, foi analisado o tempo de permanência no compartimento pareado



com a droga durante a sessão pré-teste. ANOVA de duas vias detectou diferença no fator droga do pareamento (salina x cocaína) [ $F(1,65)=8,22$   $P<0,01$ ] mas não no fator contexto do Teste 2 (original x alterado) [ $F(1,65)=2,45$   $P=0,12$ ]. Não houve interação entre estes fatores [ $F(1,65)=0,47$   $P=0,49$ ]. O teste Newman-Keuls *post hoc* mostrou que os animais pareados com cocaína e submetidos ao Teste 2 no contexto original permaneceu menos tempo no compartimento pareado com a droga quando comparado ao seu respectivo grupo pareado com salina ( $P<0,05$ ). Ainda que diferente estatisticamente, esta diferença certamente não promoveu nenhum viés quanto à relevância dos achados obtidos na avaliação de escore.

Os dados obtidos no presente estudo corroboram os achados obtidos com a ciclohexamida, mostrando que o protocolo utilizado não foi capaz de induzir reconsolidação e atualização da memória. Além disso, este experimento mostrou claramente que uma breve re-exposição ao contexto sob o efeito da droga é capaz de induzir consolidação de uma nova memória nos animais previamente pareados com salina, independente da condição contextual utilizada no Teste 2 (contexto original e contexto alterado).



**Figura 13 - Gráfico do Experimento 7.** Dados representando o efeito do tratamento com nimodipina (15 mg/kg, i.p.) 30 minutos antes de cada re-exposição, nos animais pareados com salina ou cocaína, submetidos a re-exposição no contexto alterado sob o efeito da droga, e ao Teste 2 tanto no contexto original como no contexto alterado. A. Escore de CPP. B. Tempo de permanência no compartimento pareado com a droga durante a sessão pré-teste. Os dados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. N=69. \*\*  $P < 0,01$  em relação ao Teste 1. #  $P < 0,05$  ##  $P < 0,01$  em relação ao respectivo grupo pareado com salina.

## 5 DISCUSSÃO

A fim de determinar a importância da consolidação e/ou reconsolidação sobre a atualização da preferência condicionada ao local induzida pela cocaína, realizamos uma série de experimentos, envolvendo diferentes manipulações do contexto durante o protocolo de re-exposição, bem como o uso de diferentes ferramentas farmacológicas. Os resultados aqui encontrados nos permitiu concluir que:

i. As alterações proporcionadas durante as re-exposições foram assimiladas pelos animais, haja vista que o Teste 2 foi realizado com o contexto alterado. Tais alterações de fato mudaram significativamente o contexto, já que os animais submetidos às re-exposições no contexto original, não foram capazes de desenvolver preferência condicionada ao local no Teste 2.

ii. Nos animais previamente pareados com salina, as re-exposições ao contexto original na vigência do efeito psicoativo da droga podem alterar a valência emocional deste contexto. Além disso, as re-exposições ao contexto original são importantes para a manutenção do traço, independente da condição contextual da re-exposição. Ou seja, mesmo que as re-exposições sejam efetuadas mediante alterações contextuais, o traço ainda se mantém.

iii. A administração de ciclohexamida logo após cada re-exposição não foi capaz de alterar o escore de preferência condicionada no Teste 2. O mesmo foi constatado quando este inibidor de síntese proteica foi administrado seis horas após cada re-exposição. No entanto, quando administrada seis e doze horas (ou seja, duas injeções) após cada re-exposição, a ciclohexamida diminui significativamente o escore de preferência condicionada no Teste 2.

iv. A administração de nimodipina antes de cada re-exposição também não foi capaz de alterar o escore de preferência condicionada no Teste 2.

Estes resultados em conjunto mostraram que a atualização da memória associativa de reforço positivo induzida pela cocaína envolveu mecanismos de consolidação e não reconsolidação.

Uma série de estudos utilizando o modelo da preferência condicionada ao

local vem mostrando a importância da reconsolidação no fortalecimento da memória associativa de reforço positivo induzida pelas drogas de abuso (Itzhak, 2008; Robinson e Franklin, 2010; Robinson et al., 2011; Sorg et al., 2012; Alaghband e Marshall, 2013; Yan et al., 2013; De Carvalho et al., 2013; Jian et al., 2014; Liddie e Itzhak, 2014). No entanto, até o presente momento, nenhum trabalho estudou a questão da atualização deste tipo de memória.

Nossa proposta foi de estudar o mecanismo de reconsolidação utilizando-se como referência funcional a atualização da memória. Isto porque, ao se analisar a dinâmica do uso de substâncias, podemos inferir que a memória relacionada ao comportamento do uso está sendo constantemente atualizada. De fato, o usuário consome a substância em diferentes contextos e situações, promovendo com isso a atualização periódica da memória. Buscamos então mimetizar esta dinâmica no nosso desenho experimental.

Considerando as evidências bibliográficas a cerca da reconsolidação no modelo da preferência condicionada ao local, nossa hipótese experimental era de que a atualização da memória seria mediada por mecanismos de reconsolidação e não consolidação. No entanto, os resultados encontrados foram opostos a nossa hipótese experimental. Isto não significa que o fenômeno da reconsolidação não esteja presente no modelo da preferência condicionada ao local, mas sim, que no caso da atualização, a reconsolidação não é recrutada.

A maioria dos estudos que investigam a reconsolidação de memória associativa aversiva mostra que a simples re-exposição ao estímulo condicionado (por exemplo, contexto) é suficiente para evocar e labilizar o traço. No entanto, no caso da memória associativa apetitiva, parece ser necessária a apresentação tanto do estímulo condicionado (contexto) como do estímulo incondicionado (droga) (Milekic et al., 2006; Valjent et al., 2006). No presente estudo vimos que, de fato, a apresentação do estímulo incondicionado durante a re-exposição foi importante para os animais previamente pareados com cocaína manterem a memória associativa no Teste 2. Por outro lado, vimos que esta estratégia fez com que os animais do grupo Controle (pareados com salina) adquirissem uma nova memória, já que os mesmos apresentaram um escore elevado de Cpp no Teste 2, independente do contexto utilizado neste teste (original ou alterado).

Dentre os mecanismos neurobiológicos envolvidos no processo de reconsolidação podemos destacar a dependência de síntese protéica. A síntese de

novas proteínas é necessária para a re-estabilização da memória (Nader et al.; 2000b; Sara, 2000; Reichelt e Lee, 2013). Vale ressaltar que tanto os mecanismos de consolidação e reconsolidação dependem da síntese de novas proteínas. No entanto existe uma importante diferença de ordem temporal neste aspecto. Estudos em modelos de memória aversiva mostram que a consolidação requer duas janelas temporais de síntese protéica, próxima ao tempo do treino e após aproximadamente 4 horas do treino (Bourtchuladze et al., 1998; Igaz et al., 2002). Por outro lado, a inibição de síntese protéica logo após o processo de reativação da memória prejudica a sua reconsolidação e retenção, tanto em modelos de memória aversiva (Nader et al., 2000b) como apetitiva (Bernardi et. al., 2007).

No presente estudo, a administração de ciclohexamida logo após cada reativação não afetou o escore de Cpp no Teste 2, sugerindo que tal protocolo não foi capaz de recrutar o fenômeno da reconsolidação. Uma série de estudos tem mostrado uma inibição da Cpp no Teste 2 mediante o uso de inibidores de síntese protéica logo após a reativação da memória (Valjent et al., 2006; Robinson and Franklin 2007; Fan et al., 2010). Mas de acordo com Milekic e colaboradores (2006) somente duas injeções de inibidor de síntese protéica (0 h e 5 h após a re-exposição) foram capazes de inibir o mecanismo de reconsolidação da Cpp induzida por morfina. Conforme descrito anteriormente, embora tanto a consolidação como a reconsolidação dependa de síntese de novas proteínas, existe uma importante diferença entre elas quanto aos aspectos temporais de síntese protéica (Bourtchuladze et al., 1998; Nader, 2000a, 200b; Nader et al., 2005). Sendo assim, a nossa crítica ao estudo de Milekic e colaboradores (2006) é que, de fato, aquele protocolo tratou-se de um mecanismo de consolidação e não reconsolidação da memória.

Assim como constatado no presente estudo, evidências prévias na literatura também falharam em detectar o efeito deletério de inibidores de síntese protéica sobre a reconsolidação de memórias apetitivas (Blaiss and Janak, 2007; Hernandez and Kelley, 2004). Alguns autores sugerem que em memórias consideradas “fortes”, sejam elas apetitivas ou aversivas, existe uma dificuldade para se recrutar o fenômeno da reconsolidação (Suzuki et al., 2004; Hernandez e Kelley, 2004; Morris et al., 2006, Wang et al., 2009). Uma possível interpretação desta condição especial seria que memórias bem estabelecidas podem ser protegidas de futuras interferências.

De acordo com Jonathan Lee (2008) as memórias contextuais aversivas são passíveis de processos de atualização a partir de um novo episódio de aprendizagem, e que este mecanismo envolve mecanismos de reconsolidação e não consolidação. No entanto, o grupo da Dra. Cristina Alberini sugere que, a inserção de novas informações em uma memória já existente poderia ser visto simplesmente como um novo aprendizado baseado na memória evocada, e que ativaria mecanismos de consolidação, e não reconsolidação (Tronel et al., 2005). No presente estudo vimos que duas administrações de ciclohexamida (6 e 12 h), mas não a administração de ciclohexamida logo após ou 6 h após cada re-exposição, foram capazes de diminuir drasticamente o escore de Cpp no Teste 2. Neste sentido, considerando a janela temporal de síntese protéica, nosso estudo corrobora os achados de Tronel e colaboradores (2005) no paradigma da esQUIVA inibitória, demonstrando que para a aprendizagem associativa de reforço positivo induzida pela cocaína a inserção de novas informações em uma memória já existente se dá por mecanismo de consolidação e não reconsolidação.

Sabe-se que a memória, pra ser reconsolidada, precisa ser evocada e labilizada. O processo de labilização da memória, após a sua evocação, requer a ativação destes canais de cálcio voltagem dependente tipo L (Suzuki et al., 2008, Flavell et al., 2011). Neste sentido, a nimodipina tem a capacidade de bloquear a reconsolidação por inibir a labilização do traço (Suzuki et al., 2008; Lee, 2008; De Oliveira Álvares et al., 2013; Haubrich et al., 2014). Corroborando os achados encontrados com a ciclohexamida, a nimodipina não foi capaz de alterar os escore de Cpp no Teste 2, provendo uma constatação farmacológica adicional de que o fenômeno verificado no modelo do presente estudo não se tratada de reconsolidação.

Em suma, os resultados do presente estudo mostraram que a atualização da memória associativa de reforço positivo induzida pela cocaína envolve mecanismo de consolidação e não reconsolidação.

## **6 CONCLUSÃO**

A atualização da memória associativa de reforço positiva induzida pela cocaína envolve mecanismos de consolidação de uma nova memória e não atualização da memória original.

## REFERÊNCIAS

- Alagband Y, Marshall JF. Common influences of non-competitive NMDA receptor antagonists on the consolidation and reconsolidation of cocaine-cue memory. *Psychopharmacology (Berl)*. 2013 Apr;226(4):707-19.
- Alberini CM. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends Neurosci*. 2005;28:51-6.
- Alberini CM. The role of reconsolidation and the dynamic process of long-term memory formation and storage. *Front Behav Neurosci*. 2011;5:12.
- American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 5<sup>th</sup> ed. Washington DC: American Psychiatric Association; 2013. 947 p.
- Ben Mamou C, Gamache K and Nader K. NMDA receptors are critical for unleashing consolidated auditory fear memories. *Nat Neurosci*. 2006;9:1237-9.
- Berke JD, Hyman SE. Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron*. 2000;25:515-32.
- Bernardi RE, Lattal KM, Berger SP. Anisomycin disrupts a contextual memory following reactivation in a cocaine-induced locomotor activity paradigm. *Behav Neurosci*. 2007;121:156-63.
- Berridge KC, Robinson TE. What is the role of dopamine in reward, hedonic impact, reward learning, or incentive salience ? *Brain Res Rev*. 1998;28:309-69.
- Blaiss CA, Janak PH. Post-training, but not post-reactivation, administration of amphetamine and anisomycin modulates Pavlovian conditioned approach. *Neurobiol Learn Mem*. 2007;87:644-58.
- Blundell L, Kouser M, Powell CM. Systemic inhibition of mammalian target of rapamycin inhibits fear memory reconsolidation. *Neurobiol Learn Mem*. 2008;90:28-35.
- Bourtchouladze R, Abel T, Berman N, Gordon R, Lapidus K, Kandel ER. Different training procedures recruit either one or two critical periods for contextual memory consolidation, each of which requires protein synthesis and PKA. *Learn Mem*. 1998;5:365-74.
- Cain CK, Blouin AM, Barad M. L-type voltage-gated calcium channels are required for extinction, but not for acquisition or expression of conditional fear in mice. *J Neurosci*. 2002;22:9113-21.
- De Carvalho CR, Pamplona FA, Cruz JS, Takahashi RN. Endocannabinoids underlie reconsolidation of hedonic memories in Wistar rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 2014 Apr;231(7):1417-25.



- De Oliveira Álvares L, Crestani AP, Cassini LF, Haubrich J, Santana F, Quillfeldt JA. Reactivation enables memory updating, precision-keeping and strengthening: exploring the possible biological roles of reconsolidation. *Neuroscience*. 2013;244:42-8.
- De Oliveira Álvares L, Einarsson EO, Santana F, Crestani AP, Haubrich J, Cassini LF, Nader K, Quillfeldt JA. Periodically reactivated context memory retains its precision and dependence on the hippocampus. *Hippocampus*. 2012;22:1092-5.
- Debiec J, Ledoux JE. Disruption of reconsolidation but not consolidation of auditory fear conditioning by noradrenergic blockade in the amygdala. *Neuroscience*. 2004;129:267-72.
- Di Chiara G, Bassareo V. Reward system and addiction: what dopamine does and doesn't do. *Curr Opin Pharmacol*. 2007;7:69-76.
- Dudai Y, Eisenberg M. Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron*. 2004;44:93-100.
- Dudai Y. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol*. 2004;55:51-86.
- Duvarci S, Nader K, Ledoux JE. De novo mRNA synthesis is required for both consolidation and reconsolidation of fear memories in the amygdala. *Learn Mem*. 2008;15:747-55.
- Fan HY, Cherg CG, Yang FY, Cheng LY, Tsai CJ, Lin LC, Yu L. Systemic treatment with protein synthesis inhibitors attenuates the expression of cocaine memory. *Behav Brain Res*. 2010;208:522-7.
- Fanselow MS, Dong HW. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron*. 2010;65:7-19.
- Flavell CR, Baerber DJ, Lee JL. Behavioural memory reconsolidation of food and fear memories. *Nat Commun*. 2011;2:504.
- Hardt O, Einarsson EO, Nader K. A bridge over troubled water: reconsolidation as a link between cognitive and neuroscientific memory research traditions. *Annu Rev Psychol*. 2010;61:141-67.
- Haubrich J, Crestani AP, Cassini LF, Santana F, Sierra RO, Alvares LD, Quillfeldt JA. Reconsolidation allows fear memory to be updated to a less aversive level through the incorporation of appetitive information. *Neuropsychopharmacology*. 2015;40:315-26.
- Hernandez PJ, Kelley AE. Long-term memory for instrumental responses does not undergo protein synthesis-dependent reconsolidation upon retrieval. *Learn Mem*. 2004;11:748-54.

Horvitz JC. Mesolimbocortical and nigrostriatal dopamine responses to salient non-reward events. *Neuroscience*. 2000;96:651-6.

Hupbach A, Gomez R, Hardt O, Nadel L. Reconsolidation of episodic memories: a subtle reminder triggers integration of new information. *Learn Mem*. 2007;14:47-53.

Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ. Neural mechanisms of addiction: the role of reward related learning and memory. *Annu Rev Neurosci*. 2006;29:565-98.

Hyman SE. Reviews and overviews addiction : a disease of learning and memory. *Am J Psychiatry*. 2005;162:1414-22.

Igaz LM, Vianna MR, Medina JH, Izquierdo I. Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear motivated learning. *J Neurosci*. 2002;22:6781-9

Ikemoto S, Wise RA. Mapping of chemical trigger zones for reward. *Neuropharmacology*. 2004;47(suppl1):190-201.

Inda MC, Muravieva EV, Alberini CM. Memory retrieval and the passage of time: from reconsolidation and strengthening to extinction. *J Neurosci*. 2011;31:1635-43.

Itzhak Y. Role of the NMDA receptor and nitric oxide in memory reconsolidation of cocaine-induced conditioned place preference in mice. *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Oct;1139:350-7.

Jarrard LE. What does the hippocampus really do? *Behav Brain Res*. 1995;71:1-10.

Jian M, Luo YX, Xue YX, Han Y, Shi HS, Liu JF, Yan W, Wu P, Meng SQ, Deng HW, Shi J, Lu L. EIF2 $\alpha$  dephosphorylation in basolateral amygdala mediates reconsolidation of drug memory. *J Neurosci*. 2014;34(30):10010-21.

Koob GF, Le Moal M. Addiction and the brain antireward system. *Annu Rev Psychol*. 2008;59:29-53.

Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology*. 2010 ;35:217-38.

Le Moal M, Koob GF. Drug addiction: pathways to the disease and pathophysiological perspectives. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2007;17:377-93.

Lee JL, Everitt BJ, Thomaz KL. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science*. 2004;304:839-43.

Lee JL. Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nat Neurosci*. 2008 ;11:1264-6.

Lee JL. Reconsolidation: maintaining memory relevance. *Trends Neurosci*. 2009 ;32:413-20.

- Lee SH, Choi JH, Lee N, Lee HR, Kim JI, Yu NK, Choi SL, Lee SH, Kim H, Kaang BK. Synaptic protein degradation underlies destabilization of retrieved fear memory. *Science*. 2008;319:1253-6.
- Lent R. Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência. 2a ed. São Paulo: Atheneu; 2010. 765 p.
- Liddie S, Itzhak Y. Variations in the stimulus salience of cocaine reward influences drug-associated contextual memory. *Addict Biol*. 2014 Oct 28.
- Lin J, Liu L, Wen Q, Zheng C, Gao Y, Peng S, Tan Y, Li Y. Rapamycin prevents drug seeking via disrupting reconsolidation of reward memory in rats. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2014 Jan;17(1):127-36.
- Marx J. Drugs inspired by a drug. *Science*. 2006;311:322-5.
- McGaugh JL. Consolidating memories. *Annu Rev Psychol*. 2015;66:1-24.
- Milekic MH, Brown SD, Castellini C, Alberini CM. (2006). Persistent disruption of an established morphine conditioned place preference. *J Neurosci* 26:3010-3020.
- Milekic MH, Brown SD, Castellini C, Alberini CM. Persistent disruption of an established morphine conditioned place preference. *J Neurosci*. 2006;26:3010-20.
- Morris RG, Inglis J, Ainge JA, Olverman HJ, Tulloch J, Dudai Y, Kelly PA. Memory reconsolidation: sensitivity of spatial memory to inhibition of protein synthesis in dorsal hippocampus during encoding and retrieval. *Neuron*. 2006;50:479-89.
- Nader K, Einarsson EO. Memory reconsolidation: an update. *Ann NY Acad Sci*. 2010;1191:27-41.
- Nader K, Hardt O, Wang SH. Response to Alberini: right answer, wrong question. *Trends Neurosci*. 2005;28:346-7.
- Nader K, Hardt O. A single standart for memory: the case for reconsolidation. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10:224-34.
- Nader K, Schafe GE, LeDoux JE. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*. 2000b;406:722-6.
- Nader K, Schafe GE, LeDoux JE. The labile nature of consolidation theory. *Nat Rev Neurosci*. 2000a;1:216-9.
- O'Brien CP, Childress AR, Ehrman R, Robbins SJ. Conditioning factors in drug abuse: can they explain compulsion? *J Psychopharmacol*. 1998;12:15-22.
- Rao-Ruiz P, Rotaru DC, van der Loo RJ, Mansvelter HD, Stiedl O, Smit AB, Spijker S. Retrieval-specific endocytosis of GluA2-AMPA receptors underlies adaptive reconsolidation of contextual fear. *Nat Neurosci*. 2011;14:1302-8.

Reichelt AC, Lee JL. Memory reconsolidation in aversive and appetitive settings. *Front Behav Neurosci.* 2013;7:118.

Robinson MJ, Franklin KB. Effects of anisomycin on consolidation and reconsolidation of a morphine-conditioned place preference. *Behav Brain Res.* 2007;178:146-53.

Robinson MJ, Franklin KB. Reconsolidation of a morphine place preference: impact of the strength and age of memory on disruption by propranolol and midazolam. *Behav Brain Res.* 2010 Dec;213(2):201-7.

Robinson MJ, Robinson TE, Berridge KC. Incentive salience and the transition to addiction. In: *Biological Research on Addiction*. 1st ed. Waltham: Academic Press; 2013. Vol 2.

Robinson MJ, Ross EC, Franklin KB. The effect of propranolol dose and novelty of the reactivation procedure on the reconsolidation of a morphine place preference. *Behav Brain Res.* 2011 Jan;216(1):281-4.

Robinson TE, Berridge KC. Addiction. *Annu Rev Psychol.* 2003 ;54:25-53.

Rudy JW. Context representations, context functions, and the parahippocampal-hippocampal system. *Learn Mem.* 2009;16:573-85.

Sanchis-Segura C, Spanagel R. Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addict Biol.* 2006;11:2-38.

Sara SJ. Retrieval and Reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. *Learn Mem.* 2000;7:73-84.

Sierra RO, Cassini LF, Santana F, Crestani AP, Duran JM, Haubrich J, De Oliveira Álvares L, Quillfeldt JA. Reconsolidation may incorporate state-dependency into previously consolidated memories. *Learn Mem.* 2013;20:379-87.

Smith DM, Mizumori SJ. Hippocampal place cells, context, and episodic memory. *Hippocampus.* 2006;16:716-29.

Solomon RL, Corbit JD. An opponent-process theory of motivation: I. Temporal dynamics of affect. *Psychol Rev.* 1974;81:119-45.

Sorg BA. Reconsolidation of drug memories. *Neurosci Biobehav Rev.* 2012 May;36(5):1400-17.

Suzuki A, Josselyn SA, Frankland PW, Masushige S, Silva AJ, Kida S. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J Neurosci.* 2004;24:4787-95.

Suzuki A, Mukawa T, Tsukagoshi A, Frankland PW, Kida S. Activation of LVGCCs and CB1 receptors required for destabilization of reactivated contextual fear memories. *Learn Mem.* 2008;15:426-33.

Tronel S, Milekic MH, Alberini CM. Linking new information to a reactivated memory requires consolidation and not reconsolidation mechanisms. *Plos Biol.* 2005;3:e293.

Tronson NC, Taylor JR. Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nat Rev Neurosci.* 2007;8:262-75.

Tzschentke TM. Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addict Biol.* 2007;12:227-462.

Valjent E, Corbillé AG, Bertran-Gonzalez J, Herve D, Girault JA. Inhibition of ERK pathway or protein synthesis during reexposure to drugs of abuse erases previously learned place preference. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:2932-7.

Wang SH, De Oliveira Alvares L, Nader K. Cellular and systems mechanisms of memory strength as a constraint on auditory fear reconsolidation. *Nat Neurosci.* 2009;12:905-12.

Yan Y, Kong H, Wu EJ, Newman AH, Xu M. Dopamine D3 receptors regulate reconsolidation of cocaine memory. *Neuroscience.* 2013 Jun;241:32-40.