

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde  
Área de Concentração: Neurociências

Lorena Evelyn Silva Cavalcante

**Participação do Córtex Insular na formação da memória de reconhecimento  
social**

Orientador: Prof. Dr. Ivan Izquierdo  
Co-Orientadora: Profa. Dra. Jociane de Carvalho Myskiw

Porto Alegre  
2017

Lorena Evelyn Silva Cavalcante

**Participação do Córtex Insular na formação da memória de reconhecimento social**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Porto Alegre

2017

## Ficha Catalográfica

C376p Cavalcante, Lorena Evelyn Silva

Participação do Córtex Insular na formação da memória de reconhecimento social / Lorena Evelyn Silva Cavalcante . – 2017.

68 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Ivan Antonio Izquierdo.

Co-orientadora: Profa. Dra. Jociane de Carvalho Myskiw.

1. Memória. 2. Consolidação. 3. Modulação. 4. Córtex Insular. 5. Reconhecimento Social. I. Izquierdo, Ivan Antonio. II. Myskiw, Jociane de Carvalho. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Lorena Evelyn Silva Cavalcante

**Participação do Córtex Insular na formação da memória de reconhecimento social**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Aprovada em: \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

Profa. Dra. Nadja Schröder - PUCRS

---

Profa. Dra. Mônica Ryff Vianna - PUCRS

---

Prof. Dr. Fernando Benetti - UFRGS

---

Dra. Roberta Fabbri (Suplente) - PUCRS

Porto Alegre

2017

Dedico este trabalho a minha família, por todo o incentivo, encorajamento e auxílio dado para que isso fosse possível.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

Aos meus familiares, pelo amor, auxílio, incentivo e apoio incondicional.

Agradeço em especial aos meus professores orientadores: Dr. Ivan Izquierdo e Dra. Jociane Myskiw, pelo encorajamento e suporte dado durante todo o período de Iniciação Científica e Mestrado. Muitíssimo obrigada pela oportunidade de fazer parte da equipe do Centro de Memória/InsCer desde minha graduação e pela condução de todas as etapas para que o mestrado fosse possível.

A professora, amigos e colegas do Centro de Memória, com quais aprendi muito durante todo o período em que realizei o curso de mestrado: Profa. Dra. Cristiane Furini, Ms. Carolina Zinn, Ms. Scheila Schmidt, Flávia Ferreira, Bruna Saenger, Dra. Roberta Fabbri, Clarissa Penha, Eduarda Nachtigall, Eduardo de Assis Brasil, Leticia Bühler, Fernanda Rodrigues, Jonny Behling. Desejo para todos vocês muito sucesso.

Agradeço em especial a Profa. Dra. Cristiane Furini, Ms. Carolina Zinn, Ms. Scheila Schmidt, Flávia Ferreira, Bruna Saenger, Leticia Bühler, por estarem sempre dispostas a me ajudar. Obrigada por todo apoio dado para que alcançássemos êxito.

A todos os professores que contribuíram para a minha formação acadêmica desde a graduação até a conclusão do mestrado. Agradeço em especial ao Prof. Dr. Regis Mestriner, pelas diversas contribuições desde o período de minha graduação até a conclusão desse mestrado!

Aos professores que aceitaram fazer parte da comissão examinadora e por contribuir com seus conhecimentos para enriquecer esta dissertação!

A esta universidade, seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram esse momento tão importante em minha vida!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado. Foi fundamental esse apoio! E a todos que de alguma forma participaram desse processo, o meu muito obrigada.

## RESUMO

O córtex insular (CI) recebe projeções aferentes do córtex pré-frontal, giro cingulado, bulbo olfatório, núcleos da base, além de formar conexões recíprocas com importantes áreas límbicas: amígdala e córtex entorrinal. Estas diferentes conexões indicam um possível envolvimento do córtex insular no processo de aprendizado e memória. A memória de reconhecimento social (MRS) é essencial para formar grupos sociais, estabelecer hierarquias e vínculos sociais e afetivos. Apesar de sua importância, ainda é escasso o conhecimento sobre o papel das estruturas cerebrais e os mecanismos celulares e moleculares envolvidos em seu processamento e armazenamento. Assim, o presente trabalho teve como objetivo verificar a participação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, dopaminérgicos D1/D5, histaminérgico H2,  $\beta$ -adrenérgico e serotoninérgico 5-HT1A, do córtex insular, no processo de consolidação da MRS. Para isso, ratos Wistar machos adultos foram submetidos a uma cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas bilaterais no CI e, posteriormente, à tarefa de discriminação social. Esta tarefa consiste de 4 sessões diárias de 20 min de habituação ao aparato experimental, que é constituído de uma caixa de campo aberto contendo dois cilindros de acrílico. Vinte e quatro horas após a última sessão de habituação os animais foram recolocados no aparato, na presença de um coespecífico juvenil (22 dias pós-natal) dentro de um dos cilindros, por 1 hora (sessão de treino). Após 24 horas os animais foram submetidos a uma sessão de teste, de 5 min, na presença de um juvenil desconhecido e do juvenil previamente encontrado (familiar). Verificou-se que, os animais que receberam a infusão intra-CI do antagonista dos receptores D1/D5,  $\beta$ -adrenérgico ou 5-HT1A imediatamente após a sessão de treino, tiveram um prejuízo na consolidação da MRS. Contudo, esse efeito foi bloqueado pela infusão intra-CI concomitante do agonista e do antagonista dos respectivos receptores. Ainda, os animais que receberam a infusão intra-CI do antagonista dos receptores NMDA ou H2 imediatamente após a sessão de treino, foram capazes de consolidar a MRS. Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que os receptores dopaminérgicos D1/D5,  $\beta$ -adrenérgicos e serotoninérgicos 5-HT1A, mas não os glutamatérgicos NMDA e os histaminérgicos H2, do córtex insular participam da consolidação da MRS.

Palavras chave: Memória; Consolidação; Modulação; Córtex Insular; Reconhecimento Social.

## ABSTRACT

The insular cortex (IC) receives afferent projections from prefrontal cortex, cingulate gyrus, olfactory bulb, basal nuclei and forms reciprocal connections with important limbic areas: amygdala and entorhinal cortex. These different connections indicate a possible involvement of the insular cortex in the process of learning and memory. Social recognition memory (SRM) is essential for forming social groups, establishing hierarchies and social and affective ties. Despite its importance, the knowledge about the brain structures and the cellular and molecular mechanisms involved in its processing is still scarce. Thus, the present study aimed to verify the participation of NMDA-glutamatergic, D1/D5-dopaminergic, H2-histaminergic,  $\beta$ -adrenergic and 5-HT<sub>1A</sub> serotonergic receptors, of the IC, in the consolidation of SRM. For this, male Wistar adult rats (300-330 g) were submitted to stereotaxic surgery for implantation of bilateral cannulae in the IC and, later, to the task of social discrimination. The task consists of 4 consecutive days of habituation to the experimental apparatus, which is an open-field box containing 2 acrylic cylinders, for 20 min. Twenty four hours after the last habituation session, the animals were placed in the open field in the presence of a juvenile (22 days postnatal) for 1 hour (sample phase). After 24 hours, the retention test occurred, for 5 min, in the presence of a juvenile previously met (familiar) and a new juvenile. Animals that received the intra-IC infusion of the antagonist D1/D5,  $\beta$ -adrenergic or 5-HT<sub>1A</sub> receptor, immediately after the sample phase, impairs the consolidation of SRM. However, this effect was blocked by the concomitant intra-IC infusion of the agonist and the antagonist of the respective receptors. In addition, animals that received intra-IC infusion of the antagonists NMDA and H2 receptors, immediately after the sample phase, were able to consolidate the SRM. The results obtained in the present study suggest that the dopaminergic D1/D5,  $\beta$ -adrenergic and serotonergic 5-HT<sub>1A</sub> receptors, but not the glutamatergic NMDA and the histaminergic H2 receptors, of the IC, participates in the consolidation of the SRM.

Keywords: Memory; Consolidation; Modulation; Insular Córtex; Social Recognition.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Equipamento para realização da cirurgia estereotáxica (KOPF®).....	24
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática do protocolo experimental da tarefa de reconhecimento social .....	26
<b>Tabela 1.</b> Tratamento farmacológico .....	27
<b>Figura 3.</b> Efeito no CI da infusão do agonista e antagonista dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA sobre a consolidação da memória de reconhecimento social .....	30
<b>Figura 4.</b> Efeito no CI da infusão do agonista e antagonista dos receptores dopaminérgicos D1/D5 sobre a consolidação da memória de reconhecimento social .....	32
<b>Figura 5.</b> Efeito no CI da infusão do agonista e antagonista dos receptores histaminérgicos H2 sobre a consolidação da memória de reconhecimento social.....	33
<b>Figura 6.</b> Efeito no CI da infusão do agonista e antagonista dos receptores $\beta$ -adrenérgicos sobre a consolidação da memória de reconhecimento social .....	35
<b>Figura 7.</b> Efeito no CI da infusão do agonista e antagonista dos receptores serotoninérgicos 5HT1A sobre a consolidação da memória de reconhecimento social .....	37
<b>Tabela 2.</b> Tempo total de exploração durante a sessão de teste na tarefa de discriminação social .....	38

## **LISTA DE SIGLAS**

AMPA -  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato

CI - Córtex Insular

NMDA - N-metil-D-aspartato

MT - Memória de Trabalho

MCD - Memória de Curta Duração

MLD - Memória de Longa Duração

MRS - Memória de Reconhecimento Social

SNC - Sistema Nervoso Central

PTSD - transtorno de estresse pós-traumático

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	12
1.1	Memória: conceito, fases de formação e classificação	12
1.2	Memória de reconhecimento social e seus mecanismos	14
1.3	Participação do córtex insular na formação de memórias	16
1.4	Modulação de memórias	18
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	22
2.1	Objetivo geral	22
2.2	Objetivos específicos	22
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b>	23
3.1	Animais experimentais	23
3.2	Cirurgia estereotáxica	23
3.3	Manipulação	24
3.4	Paradigma de Discriminação Social	25
3.4.1	Protocolo experimental	25
3.5	Intervenção Farmacológica	27
3.6	Análise histológica	28
3.7	Análise estatística	28
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	29
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	39
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	42
	<b>REFERÊNCIAS</b>	43
	<b>ANEXO A - Aprovação do Projeto pelo CEUA/PUCRS</b>	51
	<b>ANEXO B – Artigo Original</b>	52

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Memória: conceito, fases de formação e classificação

A memória é a capacidade do cérebro em adquirir, armazenar e evocar informações (KANDEL; DUDAI; MAYFORD, 2014; IZQUIERDO, 2011). Pode ser definida também como a retenção da informação previamente adquirida, ou seja, é o processo pelo qual a informação aprendida persiste ao longo do tempo (IZQUIERDO, 2011; SQUIRE; KANDEL, 2003). Assim, as memórias são fundamentais para a composição da identidade, pois o acervo das memórias torna os seres únicos (IZQUIERDO, 2011). Certamente, o indivíduo sabe quem é e onde está e para onde quer ir devido a importante capacidade de aprender e lembrar. Desse modo, o aprendizado e memória estão inteiramente conectados (SQUIRE; KANDEL, 2003).

Além disso, as memórias são cruciais para o comportamento de sobrevivência e adaptação ao meio em que se vive (MCGAUGH, 2013; DOYLE; KIEBLER, 2011; SCHACTER, 1997). São formadas pela atividade de células neurais, mantidas por um complexo sistema de redes de neurônios e podem ser moduladas pelo nível de concentração, pelas emoções e pelo estado de ânimo (GIESE; MIZUNO, 2013; IZQUIERDO, 2011; KANDEL; DUDAI; MAYFORD, 2014).

O processo de formação da memória é bastante complexo, envolve vários mecanismos moleculares e diferentes estruturas cerebrais. O processo começa através da aquisição que é a etapa inicial do processo de formação da memória que corresponde à aprendizagem, nesta fase a memória encontra-se em um estado lábil e passível a interferências (IZQUIERDO, 2011; KÖHLER *et al.*, 2011; TRONEL; MILEKIC; ALBERINI, 2005) e para persistir, necessita passar por um processo de estabilização denominado de consolidação (KÖHLER *et al.*, 2011; BERMUDEZ-RATTONI, 2010; TRONEL; MILEKIC; ALBERINI, 2005). O acesso a essa informação é chamado de evocação, recordação ou lembrança, que é a expressão de uma memória previamente adquirida (IZQUIERDO, 2011; KÖHLER *et al.*, 2011; SQUIRE, 2009) e isto caracteriza que o aprendizado de fato gerou uma memória (IZQUIERDO, 2011).

A memória durante o período de consolidação está suscetível a interferências de diferentes fatores: uso de fármacos, eletroestimulação, até ao evento de novas memórias. Uma vez que, nas primeiras horas após a informação ser adquirida, as memórias estão lábeis (DE CARVALHO MYSKIW; BENETTI; IZQUIERDO, 2013; KIM *et al.*, 2012; MCGAUGH, 2000; REICHEL *et al.*, 2011; SQUIRE, 2009). Assim, as fases de formação da memória podem ser prejudicadas, moduladas ou até mesmo melhoradas (CAHILL; ALKIRE, 2003; SACAI *et al.*, 2014).

Ao longo das décadas ocorreram avanços nos estudos sobre a memória que permitiram classificá-la em relação ao seu conteúdo ou em relação ao seu tempo de duração. Quanto ao seu conteúdo, às memórias podem ser divididas em memórias explícitas ou declarativas, e memórias implícitas ou não declarativas (KANDEL; DUDAI; MAYFORD, 2014; IZQUIERDO, 2011; SQUIRE *et al.*, 2003).

As memórias declarativas ou explícitas podem ainda ser divididas em episódica e semântica (STERN; ALBERINI, 2013; IZQUIERDO, 2011; SQUIRE; KANDEL, 2003; SQUIRE; KNOWLTON; MUSEN, 1993). As memórias episódicas referem-se a eventos relacionados aos acontecimentos da vida de um indivíduo, uma recordação consciente, como por exemplo: a sua própria formatura (IZQUIERDO, 2011; SQUIRE, 2009). Já as memórias semânticas referem-se a conhecimentos gerais, como por exemplo: o conhecimento da língua portuguesa, história, psicologia entre outros (BURIANOVA; MCINTOSH; GRADY, 2010; IZQUIERDO, 2011; KOMPUS *et al.*, 2009; RENOULT *et al.*, 2012). As memórias não declarativas ou implícitas são as memórias que inclui informações que são adquiridas durante o aprendizado de habilidades, sejam elas sensoriais, motoras, de hábitos ou de associações simples. A memória implícita reflete-se no desempenho. O caso mais simples de memória não declarativa é a habituação (decréscimo da resposta a determinados estímulos repetidos) (MAYFORD; SIEGELBAUM; KANDEL, 2012; SQUIRE, 1992; SQUIRE, 2009; STERN; ALBERINI, 2013; STERN; ALBERINI, 2013).

É importante frisar que as memórias declarativas e não declarativas não atuam sozinhas, elas coexistem e interagem frequentemente (SQUIRE; KNOWLTON; MUSEN, 1993; STERN; ALBERINI, 2013).

Quanto ao tempo de duração, as memórias são classificadas em memórias de trabalho (MT), memórias de curta duração (MCD) ou memórias de longa duração (MLD) (KANDEL; DUDAI; MAYFORD, 2014; STERN; ALBERINI, 2013; IZQUIERDO, 2011). A memória de trabalho se refere à capacidade do cérebro de reter, por alguns segundos ou minutos, a informação que está sendo processado naquele momento, este tipo de memória não forma traço e não é seguida de alterações bioquímicas muito importantes (IZQUIERDO, 2011; ROOZENDAAL; MCGAUGH, 2011). Enquanto que, as memórias de curta duração permanecem arquivadas por um curto período de tempo, poucos minutos ou horas caso as memórias fiquem armazenadas por um longo período de tempo, muitas horas, dias, meses ou anos são denominadas de memórias de longa duração (STERN; ALBERINI, 2013; IZQUIERDO, 2011).

As memórias de curta e de longa duração utilizam as mesmas estruturas cerebrais para o seu processamento como hipocampo e a amígdala, porém, envolvem mecanismos moleculares diferentes. Por exemplo, a memória de longa duração necessita de ativação gênica, seguido de síntese proteica, enquanto a memória de curta duração não necessita de síntese de proteínas (KANDEL, 2012; IZQUIERDO, 2011; ALBERINI, 2005).

## 1.2 Memória de reconhecimento social

A memória de reconhecimento se refere à capacidade de discriminar algo novo de algo familiar, podendo ser um contexto, um objeto, um ambiente, um indivíduo, ou seja, é a capacidade de distinguir entre familiaridade e novidade de um item individual (objeto) ou de um espaço composto de vários itens. Portanto, é uma capacidade extremamente importante para o dia a dia e para a sobrevivência de muitas espécies (BERMUDEZ-RATTONI, 2014; BROWN; XIANG, 1998; MORICI; BEKINSCHTEIN; WEISSTAUB, 2015).

Existem vários tipos de memória de reconhecimento, tais como a memória de reconhecimento de objeto, a memória de reconhecimento de gosto, a

memória de reconhecimento social, entre outros (ZINN *et al.*, 2016; FURINI *et al.*, 2015). Em particular, a memória de reconhecimento social (MRS) pode ser estudada em roedores, uma vez que, o animal possui a tendência natural de explorar mais o animal novo do que o familiar (SHAHAR-GOLD; GUR; WAGNER, 2013), ou seja, o reconhecimento social reflete a capacidade do animal de identificar e lembrar-se de outros indivíduos da mesma espécie (SHAHAR-GOLD; GUR; WAGNER, 2013; GABOR *et al.*, 2012).

A memória de reconhecimento social é essencial para formar grupos sociais, estabelecer hierarquias e vínculos sociais e afetivos (BLUTHÉ; GHEUSI; DANTZER, 1993). Este reconhecimento social em roedores e em outros mamíferos se deve em grande parte a sua capacidade olfatória distinta (ENGELMANN; LUDWIG; LANDGRAF, 1994). A detecção dos odores característicos de cada coespecífico ocorre pelo sistema vomeronasal e vias do bulbo olfatório (ADOLPHS, 2009; BLUTHÉ; GHEUSI; DANTZER, 1993; THOR; HOLLOWAY, 1982a), além destes, também existe à influência de hormônios como a vasopressina, a ocitocina e os hormônios gonadais (BLUTHÉ; GHEUSI; DANTZER, 1993; BYCHOWSKI; MENA; AUGER, 2013; EVERTS; KOOLHAAS, 1997; POPIK; VETULANI; REE, VAN, 1992). Tanto os roedores quanto os seres humanos não vivem bem sozinhos. Existe uma necessidade de convívio entre membros da mesma espécie (LESER; WAGNER, 2015; GABOR *et al.*, 2012b; IZQUIERDO, 2011; ADOLPHS, 2009).

A espécie humana é extremamente sociável e este comportamento surge por meio de mecanismos neurobiológicos que também são compartilhado com outras espécies (GABOR *et al.*, 2012; ADOLPHS, 2009). Este comportamento sociável está relacionado ao reconhecimento social, uma capacidade fundamental para comportamentos sociais. Por exemplo, um indivíduo sabe como agir diante de coespecíficos, ou seja, outros da mesma espécie, por meio da observação do comportamento destes, mas também em função de encontros estabelecidos anteriormente (GABOR *et al.*, 2012; ADOLPHS, 2009). Desse modo, ocorrem as relações sociais, mas ainda pouco se sabe sobre os mecanismos e estruturas cerebrais envolvidas nesse comportamento (SHAHAR-GOLD; GUR; WAGNER, 2013).

Várias doenças neurológicas levam a alterações relevantes no comportamento social, desde isolamento social até sociabilidade extrema. Algumas doenças neurológicas, tais como o autismo, a ansiedade social, a esquizofrenia, a depressão, a síndrome de Williams e a doença de Huntington (BORA; VELAKOULIS; WALTERFANG, 2016; CREMERS; ROELOFS, 2016; JÄRVINEN; KORENBERG; BELLUGI, 2013), causam problemas sociais significativos no cotidiano do indivíduo. Por isso, a relevância de se estudar os mecanismos envolvidos neste tipo de memória.

### 1.3 Participação do córtex insular na formação de memórias

O córtex cerebral é dividido em quatro lobos principais. O lobo frontal, lobo parietal, lobo occipital e o lobo temporal. Em particular, o lobo temporal está envolvido com a percepção visual, audição e aprendizado e memória (SQUIRE; KANDEL, 2003). A primeira hipótese de que algum aspecto da memória poderia estar armazenado no lobo temporal do cérebro humano surgiu em 1938 com o trabalho do neurocirurgião Wilder Penfield, na qual obteve evocação de memórias por estimulação desse lobo (SQUIRE; KANDEL, 2008).

Com o avanço da neurociência, verificou-se que diferentes estruturas cerebrais participam da formação das memórias, em particular da memória de reconhecimento, tais como o hipocampo, a amígdala, o córtex entorrinal, o córtex pré-frontal, o córtex perirrinal e o córtex insular (NOACK; MURAU; ENGELMANN, 2015; MITCHNICK *et al.*, 2015; FURINI *et al.*, 2014; WILSON *et al.*, 2013; MYSKIW *et al.*, 2008; BERMUDEZ-RATTONI, 2005).

Em especial, o córtex insular (CI), também conhecido como ilha de Reil ou apenas insula, consiste de uma estrutura cerebral que faz parte do neocórtex, localizado no lobo temporal, tanto em humanos quanto em primatas não humanos (BERMUDEZ-RATTONI, 2014; SHURA; HURLEY; TABER, 2014; JONES; WARD; CRITCHLEY, 2010). Está dividido em três áreas principais: a área granular dorsal, a área desgranular central, e a área agranular ventral (SHURA; HURLEY; TABER, 2014; KOSAR; GRILL; NORNGREN, 1986). Possui conexões com os núcleos da base, córtex perirrinal, córtex olfatório, giro

cingulado, córtex parietal, e outras áreas límbicas importantes, como o hipocampo e a amígdala (AUGUSTINE, 1996).

O CI possui vias aferentes e eferentes relacionadas ao gosto, olfato, audição, visão, entre outros. Estas diferentes conexões podem indicar uma possível razão pela qual o CI pode estar envolvido em várias funções cognitivas (AUGUSTINE, 1996). Além disso, a associação entre lesões no CI e prejuízos no comportamento social, tem sido estudado através de técnicas de neuroimagem em humanos, demonstrando que a estrutura está envolvida em processos cognitivos sociais, embora as evidências sejam limitadas a poucos estudos (BOUCHER *et al.*, 2015; JONES; WARD; CRITCHLEY, 2010).

Estudos em roedores mostram que o CI está envolvido na consolidação de diferentes tipos de memória, tais como, reconhecimento de gosto (RODRÍGUEZ-DURÁN; ESCOBAR, 2014), medo condicionado ao contexto (ALVES *et al.*, 2013), esquivas inibitórias (BERMUDEZ-RATTONI; MCGAUGH, 1991), espacial (BERMUDEZ-RATTONI; INTROINI-COLLISON; MCGAUGH, 1991) e reconhecimento de objetos (BERMUDEZ-RATTONI, 2005).

O papel do CI em processos cognitivos ainda é pouco elucidado, porém, o estudo de Boucher e colaboradores (2015) verificaram que o CI está envolvido no processamento de informações sociais em pacientes com epilepsia submetidos à ressecção desta estrutura (BOUCHER *et al.*, 2015).

Além disso, o CI tem sido relacionado com algumas doenças, transtornos e distúrbios: afasia, transtornos de humor, transtorno de estresse pós-traumático (PTSD), transtornos alimentares, esquizofrenia, autismo, doença de Alzheimer, dentre outros (GOGOLLA *et al.*, 2014; NAGAI; KISHI; KATO, 2007; AUGUSTINE, 1996). Por isso, investigar esta estrutura se faz tão necessário.

#### 1.4 Modulação de memórias

Os estudos envolvendo a modulação da formação da memória iniciaram com a investigação da ação de drogas sobre os processos de aprendizagem. Um estudo publicado por Karl Spencer Lashley, Psicólogo Americano, em 1917 verificou que a administração de estriquina em ratos antes da sessão de aprendizado na tarefa de labirinto melhorava a consolidação dessa memória,

indicando que a memória podia ser modulada por substâncias exógenas (ROESLER; SCHRÖDER, 2011; ROOZENDAAL; MCGAUGH, 2011; MCGAUGH; ROOZENDAAL, 2009).

A partir desse conhecimento, muitos pesquisadores têm dedicado seus estudos para o entendimento da modulação da memória, verificando a influência de drogas, neurotransmissores ou hormônios sobre as etapas de formação da memória (ROESLER; SCHRÖDER, 2011; TULLY; BOLSHAKOV, 2010; MCGAUGH, 2004; CAHILL; MCGAUGH, 1996). Sendo um meio de grande importância para se estudar as bases neurofisiológicas das diferentes fases do processamento da memória (QUEVEDO *et al.*, 2003).

Com os avanços do conhecimento descobriu-se que durante a formação das memórias, além da participação de diferentes estruturas cerebrais, também é necessário o envolvimento de diversos neurotransmissores. Dentre estes, estão o glutamato, a dopamina, a histamina a noradrenalina e a serotonina que estão entre os principais neurotransmissores envolvidos com o processamento de memória (IZQUIERDO, 2011).

Entre os neurotransmissores que regulam a plasticidade sináptica e a formação da memória está o glutamato que é um aminoácido que pode ser encontrado em grande quantidade no encéfalo de mamíferos, o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC). Os receptores glutamatérgicos são divididos em duas grandes categorias: metabotrópicos e ionotrópicos. Os receptores metabotrópicos (mGLU) pertencem a classe C de receptores acoplados a proteína G e, com base na função e estrutura, são subdivididos em Grupo I (mGluR1 e mGluR5), Grupo II (mGluR2 e mGluR3) e Grupo III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8) (RIBEIRO *et al.*, 2017; RONDARD; PIN, 2015). Os receptores ionotrópicos são canais iônicos controlados por ligante, e permeáveis a cátions. Existem 3 subtipos de receptores ionotrópicos, designados conforme o aminoácido análogo do glutamato que melhor mimetiza seus efeitos: NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato) e Cainato (RIBEIRO *et al.*, 2017). Em particular os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, possuem um importante papel em diferentes tipos de memórias (RODRÍGUEZ-DURÁN;

ESCOBAR, 2014; IZQUIERDO, 2011), além de exercer um papel importante em mecanismos relacionados à plasticidade sináptica (NAKAI *et al.*, 2014).

Estudos evidenciaram que o receptor NMDA presente no CI, quando bloqueado, seguido de inibição da atividade da proteína quinase C (PKC), prejudica a formação da memória no condicionamento aversivo ao gosto (RODRÍGUEZ-DURÁN; ESCOBAR, 2014). Além disso, Gutiérrez e colaboradores (1999) verificaram um prejuízo de memória na tarefa de aprendizagem espacial e condicionamento aversivo ao gosto, quando infundido o antagonista do receptor NMDA no CI, antes ou imediatamente após a sessão de aprendizado nestas tarefas (GUTIÉRREZ *et al.*, 1999).

Outro importante neurotransmissor envolvido com a formação de diferentes tipos de memória é a dopamina (MENEZES *et al.*, 2015; FURINI *et al.*, 2014). A dopamina é uma catecolamina importante e neuromoduladora do SNC (RANG; DALE, 2012) e está envolvida em diferentes funções, tais como o mecanismo de recompensa, a coordenação motora, a memória, entre outros. Sua ação ocorre por meio de famílias distintas de receptores: a família D1 que corresponde aos receptores D1 e D5 e a família D2 referente aos receptores D2, D3 e D4 (RANGEL-BARAJAS; CORONEL; FLORÁN, 2015). Em particular, os receptores D1/D5 são relevante devido sua ação sobre a plasticidade sináptica (CLAUSEN *et al.*, 2011; HUANG; KANDEL, 1995). Fernández-Ruiz e colaboradores (1993) relataram que o bloqueio dos receptores dopaminérgicos no CI ou na amígdala prejudica a aprendizagem olfativa ou gustatória. Sugerindo o envolvimento desses receptores do CI nesse tipo de aprendizagem (FERNANDEZ-RUIZ *et al.*, 1993).

Já a histamina sintetizada pelos neurônios do núcleo tuberomamilar (TMN), age por meio de 4 receptores (H1-H4) distintos acoplados a proteína G. A histamina está envolvida em diferentes funções do SNC como: memória, sono, atenção, entre outras (BONINI *et al.*, 2011; BROWN; STEVENS; HAAS, 2001). O estudo de Purón-Serra e colaboradores (2010) evidenciaram que a inibição dos receptores H1 no TMN ou ativação dos receptores H3 no CI prejudica a formação, mas não a evocação da memória aversiva ao gosto. Estes resultados

sugerem funções distintas para os receptores histaminérgicos do CI (PURÓN-SERRA et al., 2010).

Outro importante neurotransmissor envolvido com a formação de diferentes tipos de memória é a noradrenalina, uma amina biogênica que exerce a sua ação através de duas famílias de receptores:  $\alpha$  e  $\beta$ , ambos receptores acoplados a proteína G. Estes receptores  $\beta$ -adrenérgicos desempenham um importante papel na aprendizagem (CAHILL et al., 1994). E no CI desempenham uma função crucial na regulação da aprendizagem aversiva ao gosto (BERMAN et al., 2000). O estudo de Miranda e colaboradores (2011) verificou a importância da participação do receptor  $\beta$ -adrenérgico do CI. Estes concluíram ser necessário os receptores  $\beta$ -adrenérgicos do CI para a aquisição de memória aversiva (MIRANDA, M. I. et al., 2011).

Além dos neurotransmissores apresentados acima, a serotonina é outro transmissor neuromodulatório que participa da consolidação da memória. Quanto aos receptores serotoninérgicos existem sete famílias de receptores: 5-HT<sub>1-7</sub>. Ainda possui subtipos, como o 5-HT<sub>1(A-F)</sub> e de 5-HT<sub>2(A-C)</sub> (UPHOUSE, 1997). Os receptores 5-HT<sub>1</sub> são acoplados a proteína G, possuem ações inibitórias e se localizam principalmente no SNC (RANG; DALE, 2012; UPHOUSE, 1997). Em particular, o receptor 5-HT<sub>1A</sub> é um autorreceptor e o mais abundante expresso em encéfalo de mamíferos, acredita-se que os receptores 5-HT<sub>1A</sub> sejam o principal alvo de fármacos para o tratamento de desordens psiquiátricas (RANG; DALE, 2012).

Mello e Souza e colaboradores (2001) verificaram que a ativação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> do CI de ratos prejudica a consolidação da memória na tarefa de esquila inibitória, quando infundido o agonista (8-OH-DPAT) desse receptor, imediatamente após o aprendizado (MELLO e SOUZA et al., 2001).

Entender quais são os mecanismos, bem como, as estruturas encefálicas envolvidas na formação da MRS se faz relevante. Assim, uma das maneiras de compreensão dos mecanismos relacionados à memória é por meio da análise do processo de formação desta memória. Portanto, uma abordagem experimental bastante utilizada para o estudo da memória é a farmacologia, que

busca investigar como os sistemas neurais participam na modulação e ou formação da memória.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Verificar a participação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, dopaminérgicos D1/D5, histaminérgicos H2,  $\beta$ -adrenérgicos e o serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> do córtex insular na consolidação da memória de reconhecimento social.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Investigar a participação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA do córtex insular no processo de consolidação da memória de reconhecimento social.
- Investigar a participação dos receptores dopaminérgicos D1/D5 do córtex insular no processo de consolidação da memória de reconhecimento social.
- Investigar a participação dos receptores histaminérgicos H2 do córtex insular no processo de consolidação da memória de reconhecimento social.
- Investigar a participação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos do córtex insular no processo de consolidação da memória de reconhecimento social.
- Investigar a participação dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> do córtex insular no processo de consolidação da memória de reconhecimento social.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Animais Experimentais

Foram utilizados ratos Wistar machos juvenis, de 22 a 30 dias de idade, e adultos, de 3 meses de idade, que foram mantidos em caixas moradia em número de 4 por caixa, com ciclo claro/escuro de 12 horas (luz a partir das 7:00 horas e escuro a partir das 19:00 horas), com água e comida a vontade e temperatura ambiente constante de 23°C. As caixas foram trocadas e higienizadas a cada 2 dias. Os animais foram adquiridos do CeMBE (Centro de Modelos Biológicos Experimentais) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), e mantidos no biotério do Centro de Memória, localizado no Prédio 64 da PUCRS.

O tamanho da amostra foi definido com base em estudos da área publicados em revistas internacionais indexadas (Qualis A1), os quais utilizam de 9-12 animais por grupo experimental (DE CARVALHO MYSKIW, *et al.*, 2014; FURINI *et al.*, 2014; GARRIDO ZINN *et al.*, 2016). Os procedimentos experimentais apresentados nesta dissertação foram aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da PUCRS, sob o registro: CEUA 15/00470 (ANEXO A).

#### 3.2 Cirurgia Estereotáxica

Para viabilizar a infusão farmacológica intra-estrutura os animais adultos foram submetidos a uma cirurgia estereotáxica para implantação bilateral de cânulas guia no córtex insular (anterior, +1.2 mm; lateral,  $\pm 5.5$  mm; ventral, -3.1 mm) seguindo as coordenadas do atlas de Paxinos e Watson (PAXINOS; WATSON, 1986). Todo o procedimento foi realizado com os animais previamente anestesiados com Ketamina, um anestésico de ação rápida, juntamente com Xilazina, um sedativo/miorrelaxante/analgésico, ambos administrados via intraperitoneal (i.p.), nas doses de 75 mg/Kg e 10 mg/Kg

respectivamente. Como analgésico pós-cirúrgico os animais receberam nas primeiras 72 horas o anti-inflamatório Meloxicam, a cada 12 horas.

**Figura 1.** Equipamento utilizado para realização da cirurgia estereotáxica (KOPF®).



### 3.3 Manipulação

Nos três dias que antecedem os experimentos comportamentais, e pelo menos 7 dias após a cirurgia estereotáxica, os animais foram submetidos a sessões diárias de manipulação, com o objetivo de acostumá-los a serem manejados, e com isso se familiarizarem com o pesquisador, evitando estresse durante o experimento. Durante cada sessão os animais foram levados do biotério até a sala onde foi realizado a tarefa comportamental, retirados da caixa moradia e manuseados por aproximadamente 2 minutos. Após 24 horas da última sessão de manipulação, os animais foram submetidos ao paradigma comportamental de Discriminação Social.

### 3.4 Paradigma de Discriminação Social

Esse paradigma está baseado na tendência natural do animal de dedicar mais tempo investigando um coespecífico desconhecido do que um coespecífico familiar. Esta capacidade é medida por meio da redução do comportamento de exploração observado em animais reexpostos a um mesmo coespecífico (KOGAN; FRANKLAND; SILVA, 2000; THOR; HOLLOWAY, 1982a).

Este comportamento típico tem sido utilizado em um paradigma comportamental conhecido como discriminação social, o qual vem sendo utilizado para avaliar os mecanismos envolvidos na formação da memória de reconhecimento social (THOR; HOLLOWAY, 1982b)

O paradigma de discriminação social foi realizado em uma caixa retangular de campo aberto medindo 60 x 40 x 50 cm, localizada em uma sala experimental com iluminação fraca. Duas gaiolas cilíndricas idênticas, feitas em material acrílico transparente, medindo 9 cm de diâmetro e 13 cm de altura, com orifícios de 1 cm de diâmetro espaçados a 1 cm cada foram colocadas, na caixa de campo aberto, próximas aos cantos. Permitindo, assim, a passagem de pistas olfativas, porém sem contato direto entre o animal adulto e o juvenil. Todo o aparato experimental era limpo com álcool 70% entre a passagem de cada animal para garantir a ausência de pistas olfativas.

#### 3.4.1 Protocolo Experimental

Antes de serem submetidos ao paradigma de discriminação social, os animais adultos passaram por um processo de habituação ao dispositivo experimental que durou 4 dias e consistiu em uma sessão comportamental diária de 20 minutos, na qual foram colocados individualmente no campo aberto contendo duas gaiolas cilíndricas de acrílicos vazias, para que explorassem livremente o ambiente. Vinte e quatro horas antes da sessão de treino, os animais juvenis foram colocados na gaiola cilíndrica de acrílico, posicionado dentro do campo aberto na ausência do animal adulto, e permaneceram lá por

um período de 20 minutos, para se habituarem a situação de estar em um espaço restrito, que é a gaiola de acrílico.

Após os quatro dias de habituação ao aparato experimental, o animal adulto foi submetido a uma sessão de treino (primeiro encontro), que consistiu em colocá-lo no centro do campo aberto na presença de um juvenil desconhecido e uma gaiola de acrílico vazia por 1 hora. A fim de avaliar a memória de longa duração, a sessão de teste (segundo encontro) ocorreu 24 h após a sessão de treino, que consistiu na reexposição, por 5 minutos ao mesmo juvenil apresentado no dia anterior (familiar) e a um juvenil desconhecido (novo), selecionado de acordo com diferentes combinações previamente determinadas. Durante a sessão de teste foi quantificado o tempo que o animal adulto dispndia explorando cada um dos juvenis (Figura 2).

Durante as sessões de treino e teste, os juvenis foram mantidos nas gaiolas a fim prevenir agressão do adulto para com eles, e também para garantir que o adulto iniciasse a exploração. Os dois juvenis (familiar e novo) eram provenientes de diferentes caixas moradia, assim seus odores eram diferentes para o animal adulto. O comportamento social exploratório foi definido como cheirar os juvenis através dos orifícios da gaiola cilíndrica. Enquanto que, subir na gaiola ou permanecer ao redor dela não foram considerados comportamentos exploratórios. O tempo gasto explorando cada juvenil foi medido por um avaliador, com o auxílio de um cronômetro, e expresso como porcentagem do tempo total de exploração.

**Figura 2.** Representação esquemática do protocolo experimental da tarefa de discriminação social (Fonte: Adaptado de ZINN *et al.*, 2016).



### 3.5 Intervenção Farmacológica

Os compostos farmacológicos utilizados neste estudo foram: D-serina, AP5, SKF 38393, SCH 23390, Dimaprit, Ranitidina, Isoproteronol, Timolol, NAM-190 e 8-OH-DPAT; a dose e o mecanismo de ação de cada composto estão descritos na Tabela 1. Os mesmos foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (St. Luis, MO, USA), dissolvidos em solução salina 0,9% e armazenados protegidos da luz a  $-20^{\circ}\text{C}$  até seu uso. Os fármacos ou o veículo (salina) foram administrados intra-CI ( $0,5 \mu\text{l/lado}$ ) imediatamente após a sessão de treino da tarefa de discriminação social. Para as infusões intra-CI foi utilizado uma micro-seringa Hamilton® acoplada a um tubo de polietileno com uma agulha de infusão ( $0,05 \text{ mm}$  de diâmetro).

As doses utilizadas foram determinadas com base em estudos prévios que mostraram o efeito destes fármacos sobre o aprendizado e a memória de ratos, e em outras variáveis comportamentais e fisiológicas (DE CARVALHO MYSKIW *et al.*, 2015; FIORENZA *et al.*, 2012; (BARROS *et al.*, 2001). Ao término, as agulhas de infusão foram mantidas no interior das cânulas guia por mais 60 segundos, a fim de evitar o refluxo de líquido.

**Tabela 1.** Tratamento farmacológico

Composto Farmacológico	Mecanismo de Ação	Dose
D-Serina	Modulador positivo do receptor NMDA	50 µg/lado
AP5 (Ácido 2-amino-5-fosfonopentanóico)	Antagonista do receptor NMDA	5 µg/lado
SKF 38393	Agonista dos receptores D1/D5	12,5 µg/lado
SCH 23390	Antagonista dos receptores D1/D5	1,5 µg/lado
Dimaprit	Agonista do receptor H2	2,34 µg/lado
Ranitidina	Antagonista do receptor H2	17,54 µg/lado
8-OH-DPAT	Agonista do receptor 5-HT <sub>1A</sub>	6,25 µg/lado
NAM-190	Antagonista do receptor 5-HT <sub>1A</sub>	1,25 µg/lado
Isoproterenol	Agonista do β-adrenoreceptor	3 µg/lado
Timolol	Antagonista do β-adrenoreceptor	1,0 µg/lado

### 3.6 Análise Histológica

Após o término dos experimentos comportamentais os animais previamente operados foram avaliados histologicamente quanto à colocação de suas cânulas e a região cerebral atingida pela infusão, visando assim garantir que apenas os dados comportamentais de animais que efetivamente receberam a administração correta das drogas fossem incluídos na análise estatística final. Para isso, após os procedimentos comportamentais os animais foram submetidos à infusão bilateral de uma solução de azul de metileno a 4% através das cânulas guia; quinze minutos depois foram eutanasiados com uma overdose do anestésico tiopental sódico (100 mg/kg) e então decapitados. Seus cérebros foram removidos e colocados em uma solução de formol 4% por um período de quatro dias, quando então foi realizada a análise histológica, considerando somente os animais com a localização das cânulas dentro de 2 mm<sup>2</sup> dos locais desejados.

### 3.7 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do *software* GraphPad Prism 5.1. Para a análise estatística dos dados obtidos no paradigma de discriminação

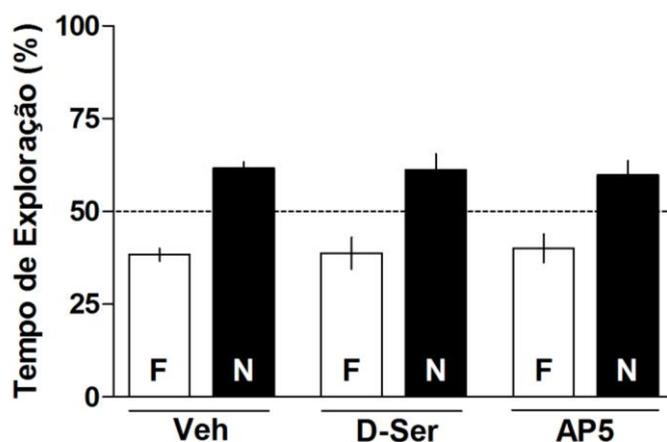
social, foram utilizados testes estatísticos paramétricos (ANOVA de uma via seguida do Teste de Comparação Múltipla de Newman-Keuls). Valores de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Participação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA do córtex insular na consolidação da memória de reconhecimento social.

Com o objetivo de verificar a participação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, do córtex insular, na consolidação da memória de reconhecimento social, animais foram submetidos à tarefa de discriminação social, imediatamente após a sessão de treino, receberam infusão bilateral de veículo (Veh), D-serina (D-Ser; 50 µg/lado) modulador positivo do receptor NMDA ou AP5 (AP5; 5 µg/lado) antagonista do receptor NMDA intra-CI (0,5 µl/lado). Vinte e quatro horas após a sessão de treino, os animais foram submetidos a uma sessão de teste, na qual foram expostos, por 5 minutos, ao juvenil familiar e a um juvenil novo.

Como pode ser observado na figura 3, os animais que receberam infusão de Veh, D-Serina ou AP5 no CI, imediatamente após a sessão de treino, foram capazes de reconhecer o juvenil familiar 24 h mais tarde na sessão de teste, pois passaram mais tempo explorando o juvenil novo (N) em comparação ao familiar (F), mostrando que formaram a memória de reconhecimento social para o juvenil apresentado na sessão de treino (teste *t* de uma amostra: **Fig. 3**, Veh  $t_{(11)}=6,811$ ,  $P<0,0001$ ; D-Serina  $t_{(11)}=2,607$ ,  $P=0,0244$ ; AP5  $t_{(11)}=2,586$ ,  $P=0,0253$ ). A ANOVA de uma via revelou diferença significativa entre os grupos ( $F_{(5,66)}=11,95$ ,  $P<0,0001$ ), entretanto, o teste de Comparações Múltiplas de Newman-Keuls não mostrou diferença significativa entre os grupos Veh-N vs. D-Ser-N; Veh-N vs. AP5-N. Estes resultados sugerem que os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA do CI não participam da consolidação da memória de reconhecimento social.



**Figura 3. Efeito da infusão do agonista e do antagonista dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA intra-CI sobre a consolidação da memória de reconhecimento social.** Animais foram submetidos ao paradigma de discriminação social e imediatamente após a sessão de treino receberam intra-CI (0,5 µl/lado) as infusões de veículo (Veh), D-Serina (D-Ser; 50 µg/lado) ou AP5 (AP5; 5 µg/lado). Vinte e quatro horas depois, os animais foram submetidos a uma sessão de teste de 5 min na presença do juvenil familiar (F) e de um juvenil novo (N). Os pontos indicam a média teórica de 50%. Os dados estão expressos como média ± erro padrão e estão representados como porcentagem do tempo total de exploração (n = 12 animais por grupo). ANOVA de uma via seguida do Teste de Comparações Múltiplas de Newman-Keuls.

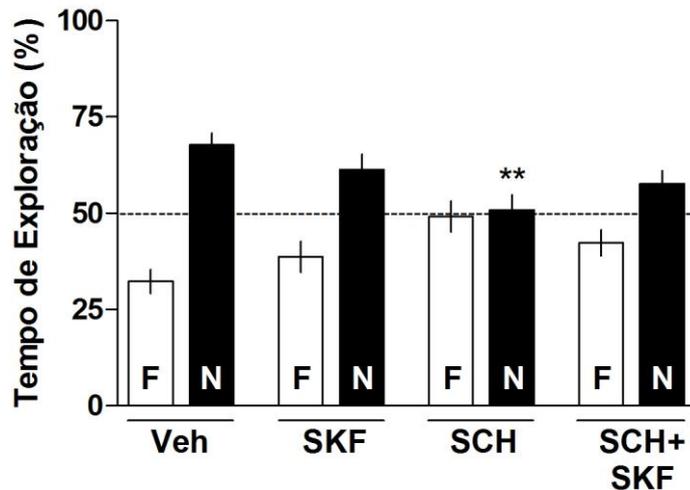
#### 4.2 Participação dos receptores dopaminérgicos D1/D5 do Córtex Insular na consolidação da memória de reconhecimento social

Com o objetivo de verificar a participação dos receptores dopaminérgicos D1/D5, do córtex insular, na consolidação da memória de reconhecimento social, animais foram submetidos à tarefa de discriminação social e imediatamente após a sessão de treino receberam infusão bilateral de veículo (Veh), SKF 38393 (SKF; 12,5 µg/lado) agonista dos receptores D1/D5 ou SCH 23390 (SCH; 1,5 µg/lado) antagonista dos receptores D1/D5, intra-CI (0,5 µl/lado). Vinte e quatro horas após a sessão de treino, os animais foram submetidos a uma sessão de teste, na qual foram expostos, por 5 minutos ao juvenil familiar (F) e a um juvenil novo (N).

Como pode ser observado na figura 4, os animais que receberam infusão de Veh ou SKF no CI imediatamente após a sessão de treino foram capazes de reconhecer o juvenil familiar 24 h mais tarde na sessão de teste, pois passaram mais tempo explorando o juvenil novo em comparação ao familiar (teste *t* para uma amostra: **Fig. 4**, Veh  $t_{(11)}=5,849$ ,  $P<0,01$ ; SKF 38393  $t_{(11)}=2,801$ ,  $P=0,0172$ ), indicando que formaram a memória de reconhecimento social para o juvenil apresentado na sessão de treino. Por outro lado, os animais que receberam a infusão de SCH, não mostraram diferença entre o tempo gasto na exploração do juvenil familiar e do juvenil novo (teste *t* para uma amostra: **Fig. 4**, SCH 23390  $t_{(8)}=0,2131$ ,  $P=0,8366$ ). Estes animais mostraram um prejuízo na memória de reconhecimento social, pois eles dedicaram a mesma quantidade de tempo explorando o juvenil familiar e o juvenil novo. A ANOVA de uma via demonstrou diferença significativa entre os grupos ( $F_{(7,76)}=12,01$ ,  $P<0,0001$ ). O teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls revelou diferença entre os grupos Veh-N e SCH-N na sessão de teste ( $P<0,01$ ).

Ainda, com o objetivo de verificar se o prejuízo causado pelo SCH 23390 era devido especificamente a sua ação sobre o processo de consolidação da MRS, animais receberam intra-CI, imediatamente após a sessão de treino, a coinfusão de SKF 38393 (SKF; 12,5 µg/lado) e SCH 23390 (SCH; 1,5 µg/lado). Como pode ser observado na figura 4, os animais foram capazes de reconhecer o juvenil familiar 24 h mais tarde na sessão de teste, pois passaram mais tempo explorando o juvenil novo (N) em comparação ao familiar (F) (teste *t* para uma amostra: **Fig. 4**, SKF + SCH  $t_{(8)}=2,315$ ,  $P<0,05$ ), indicando que ocorreu um bloqueio do prejuízo causado pela infusão do SCH, logo, os animais foram capazes de formar a MRS. A ANOVA de uma via não demonstrou diferença significativa entre os grupos SCH + SKF e Veh.

Estes resultados sugerem que os receptores dopaminérgicos D1/D5, do CI, participam da consolidação da memória de reconhecimento social.



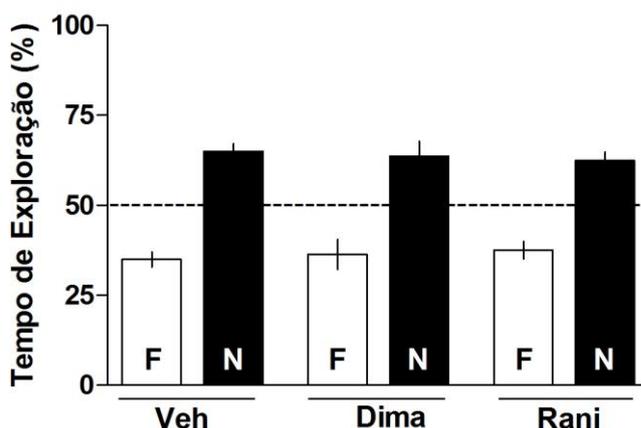
**Figura 4. Efeito da infusão do agonista e do antagonista dos receptores dopaminérgicos D1/D5 intra-CI sobre a consolidação da memória de reconhecimento social.** Animais foram submetidos ao paradigma de discriminação social e imediatamente após a sessão de treino receberam intra-CI (0,5 µl/lado) as infusões de veículo (Veh), SKF 38393 (SKF; 12,5 µg/lado), SCH 23390 (SCH; 1,5 µg/lado) ou de SKF 38393 mais SCH 23390 (SKF+SCH). Vinte e quatro horas depois, os animais foram submetidos a uma sessão de teste por 5 min na presença do juvenil familiar (F) e de um juvenil novo (N). Os pontos indicam a média teórica de 50%. Os dados estão expressos como média ± erro padrão e estão representados como porcentagem do tempo total de exploração (n = 9-12 animais por grupo). \*\* $P < 0,01$  Veh-N vs. SCH-N, ANOVA de uma via seguida do Teste de Comparações Múltiplas de Newman-Keuls.

#### 4.3 Participação dos receptores histaminérgicos H2 do Córtex Insular na consolidação da memória de reconhecimento social

Com o objetivo de verificar a participação dos receptores histaminérgicos H2, do córtex insular, na consolidação da memória de reconhecimento social, animais foram submetidos à tarefa de discriminação social e imediatamente após a sessão de treino receberam infusão bilateral de veículo (Veh), Dimaprit (Dima; 2,34 µg/lado) agonista dos receptores H2 ou Ranitidina (Rani; 17,54 µg/lado) antagonista dos receptores H2, intra-CI (0,5 µl/lado). Vinte e quatro horas após a sessão de treino, os animais foram submetidos a uma sessão de teste, na qual foram expostos por 5 minutos ao juvenil familiar e a um juvenil novo.

Como pode ser observado na figura 5, os animais que receberam infusão de Veh, Dimaprit ou Ranitidina no CI, imediatamente após a sessão de treino, foram capazes de reconhecer o juvenil familiar 24 h mais tarde na sessão de teste, pois passaram mais tempo explorando o juvenil novo (N) em comparação ao familiar (F), mostrando que formaram a memória de reconhecimento social para o juvenil apresentado na sessão de treino (teste *t* para uma amostra: **Fig. 5**, VEH  $t_{(13)}=7,149$ ,  $P<0,0001$ ; Rani  $t_{(9)}=5,127$ ,  $P=0,0006$ ; Dima  $t_{(7)}=3,265$ ,  $P=0,0138$ ). A ANOVA de uma via mostrou diferença significativa entre os grupos ( $F_{(5,58)}=31,13$ ,  $P<0,0001$ ), entretanto, o teste de Comparações Múltiplas de Newman-Keuls não revelou diferença significativa entre os grupos Veh-N vs. Rani-N; Veh-N vs. Dima-N.

Estes resultados sugerem que os receptores histaminérgicos H2 do CI não estão envolvidos na consolidação da memória de reconhecimento social.



**Figura 5. Efeito da infusão do agonista e do antagonista dos receptores histaminérgicos H2 intra-CI sobre a consolidação da memória de reconhecimento social.** Animais foram submetidos ao paradigma de discriminação social e imediatamente após a sessão de treino receberam intra-CI (0,5 µl/lado) as infusões de veículo (Veh), Dimaprit (Dima; 2,3 µg/lado) ou Ranitidina (Rani; 17,5 µg/lado). Vinte e quatro horas depois, os animais foram submetidos a uma sessão de teste de 5 min na presença do juvenil familiar (F) e de um juvenil novo (N). Os pontos indicam a média teórica de 50%. Os dados estão expressos como média ± erro padrão e estão representados como porcentagem do tempo total de exploração (n = 8-14 animais por grupo). ANOVA de uma via seguida do Teste de Comparações Múltiplas de Newman-Keuls.

#### 4.4 Participação dos receptores $\beta$ -adrenérgicos do Córtex Insular na consolidação da memória de reconhecimento social

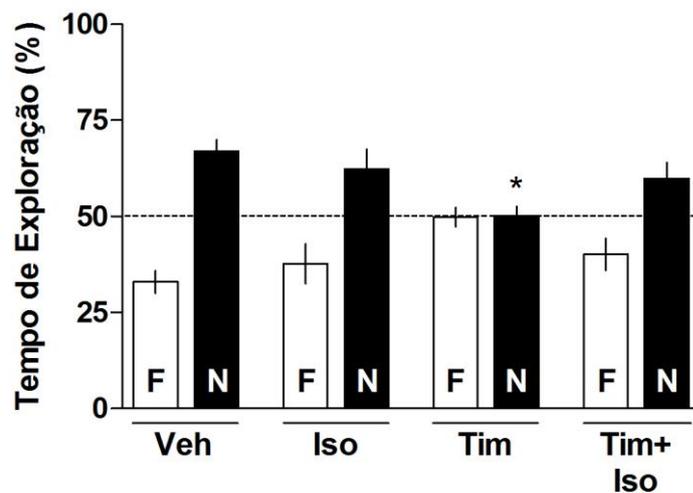
Com o objetivo de verificar a participação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos, do córtex insular, na consolidação da memória de reconhecimento social, animais foram submetidos à tarefa de discriminação social e imediatamente após a sessão de treino receberam infusão bilateral de veículo (Veh), Isoproterenol (Iso; 3  $\mu\text{g/lado}$ ) agonista dos  $\beta$ -adrenérgicos ou Timolol (Tim; 1,0  $\mu\text{g/lado}$ ) antagonista dos  $\beta$ -adrenérgicos, intra-CI (0,5  $\mu\text{l/lado}$ ). Vinte e quatro horas após a sessão de treino, os animais foram submetidos a uma sessão de teste, na qual foram expostos, por 5 minutos ao juvenil familiar e a um juvenil novo.

Como pode ser observado na figura 6, os animais que receberam infusão de Veh ou Iso no CI, imediatamente após a sessão de treino, foram capazes de reconhecer o juvenil familiar 24 h mais tarde na sessão de teste, pois passaram mais tempo explorando o juvenil novo (N) em comparação ao familiar (F), mostrando que formaram a memória de reconhecimento social para o juvenil apresentado na sessão de treino (teste  $t$  para uma amostra: **Fig. 6**, Veh  $t_{(11)}=5,950$ ,  $P<0,0001$ ; Iso  $t_{(9)}=2,392$ ,  $P<0,05$ ). Por outro lado, os animais que receberam a infusão de Tim, não mostraram diferença entre o tempo gasto na exploração do juvenil familiar e do juvenil novo (teste  $t$  para uma amostra: **Fig. 7**, Tim  $t_{(7)}=0,05126$ ,  $P=0,9605$ ). Estes animais mostraram um prejuízo na memória de reconhecimento social, pois eles dedicaram a mesma quantidade de tempo explorando o juvenil familiar e o juvenil novo. A ANOVA de uma via mostrou diferença significativa entre os grupos ( $F_{(7,72)}=11,43$ ,  $P<0,0001$ ). O teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls revelou diferença entre os grupos Veh-N vs. Tim-N na sessão de teste ( $P<0,05$ ).

Com o objetivo de verificar se o prejuízo causado pelo Timolol era devido especificamente sua ação sobre o processo de consolidação da MRS, animais receberam intra-CI, imediatamente após a sessão de treino, a coinfusão de Isoproterenol (Iso; 3  $\mu\text{g/lado}$ ) e Timolol (Tim; 1,0  $\mu\text{g/lado}$ ). Como pode ser observado na figura 6, os animais foram capazes de reconhecer o juvenil familiar 24 h mais tarde na sessão de teste, pois passaram mais tempo explorando o

juvenil novo (N) em comparação ao familiar (F) (teste  $t$  para uma amostra: **Fig. 6**, Tim + Iso  $t_{(9)}=2,370$ ,  $P<0,05$ ), mostrando que ocorreu o bloqueio do prejuízo causado pela infusão do Tim, logo, os animais foram capazes de formar a memória de reconhecimento social. A ANOVA de uma via não demonstrou diferença significativa entre os grupos Tim + Iso vs. Veh.

Estes resultados sugerem que os receptores  $\beta$ -adrenérgicos, do córtex insular, participam da consolidação da memória de reconhecimento social.



**Figura 6. Efeito da infusão do agonista e do antagonista dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos intra-CI sobre a consolidação da memória de reconhecimento social.** Animais foram submetidos ao paradigma de discriminação social e imediatamente após a sessão de treino receberam intra-CI (0,5  $\mu$ l/lado) as infusões de veículo (Veh), Isoproterenol (Iso; 3  $\mu$ g/lado), Timolol (Tim; 1,0  $\mu$ g/lado) ou coinfusão de Timolol mais Isoproterenol (Tim+Iso). Vinte e quatro horas depois os animais foram submetidos a uma sessão de teste de 5 min na presença do juvenil familiar (F) e de um juvenil novo (N). Os pontos indicam a média teórica de 50%. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão e estão representados como porcentagem do tempo total de exploração ( $n = 8-12$  animais por grupo). \* $P<0,05$  Veh-N vs. Tim-N, ANOVA de uma via seguida do Teste de Comparações Múltiplas de Newman-Keuls.

#### 4.5 Participação dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> do Córtex Insular na consolidação da memória de reconhecimento social

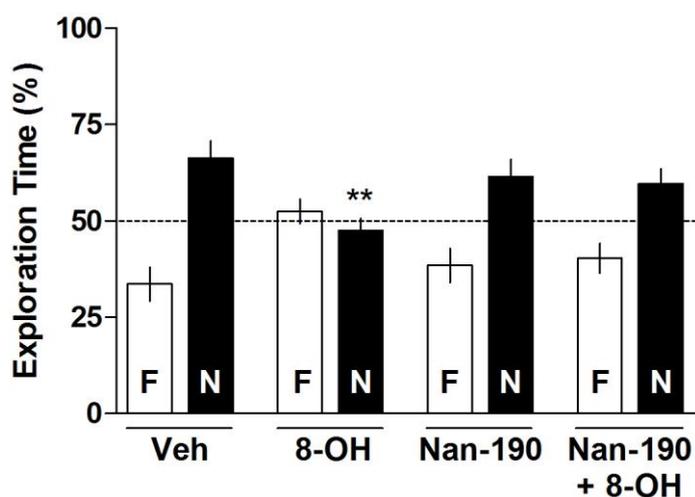
Com o objetivo de verificar a participação dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub>, do Córtex Insular, na consolidação da memória de reconhecimento social, animais foram submetidos à tarefa de discriminação social e imediatamente após a sessão de treino receberam infusão bilateral de veículo (Veh), 8-OH-DPAT (8-OH; 6,25 µg/lado) agonista dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> ou Nan-190 (Nan-190; 1,25 µg/lado) antagonista dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, intra-CI (0,5 µl/lado). Vinte e quatro horas após a sessão de treino, os animais foram submetidos a uma sessão de teste, na qual foram expostos, por 5 minutos, ao juvenil familiar e a um juvenil novo.

Como pode ser observado na figura 7, os animais que receberam infusão de Veh ou Nan-190 intra-CI imediatamente após a sessão de treino foram capazes de reconhecer o juvenil familiar 24 h mais tarde na sessão de teste, pois passaram mais tempo explorando o juvenil novo (N) em comparação ao familiar (F), mostrando que formaram a memória de reconhecimento social para o juvenil apresentado na sessão de treino (teste *t* para uma amostra: **Fig. 7**, Veh  $t_{(11)}=3,742$ ,  $P<0,01$ ; Nan-190  $t_{(8)}=2,614$ ,  $P<0,05$ ). Por outro lado, os animais que receberam a infusão de 8-OH-DPAT, não mostraram diferença entre o tempo gasto na exploração do juvenil familiar e do juvenil novo (teste *t* para uma amostra: **Fig. 7**, 8-OH  $t_{(11)}=0,7785$ ,  $P=0,4527$ ). Estes animais mostraram um prejuízo na memória de reconhecimento social, pois eles dedicaram a mesma quantidade de tempo explorando o juvenil familiar e o juvenil novo. A ANOVA de uma via demonstrou diferença significativa entre os grupos ( $F_{(7,80)}=9,189$ ,  $P<0,0001$ ). O teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls revelou diferença entre os grupos Veh-N vs. 8-OH-N na sessão de teste ( $P<0,01$ ).

Com o objetivo de verificar se o prejuízo causado pelo 8-OH-DPAT era devido especificamente a sua ação sobre o processo de consolidação da MRS, animais receberam intra-CI, imediatamente após a sessão de treino, a coinfusão bilateral com o 8-OH-DPAT (8-OH; 6,25 µg/lado) mais o Nan-190 (1,25 µg/lado). Como pode ser observado na figura 7, os animais foram capazes de reconhecer

o juvenil familiar 24 h mais tarde na sessão de teste, pois passaram mais tempo explorando o juvenil novo (N) em comparação ao familiar (F) (teste *t* para uma amostra: **Fig. 7**, Nan-190 + 8-OH-DPAT  $t_{(10)}=2,523$ ,  $P<0,05$ ), mostrando que ocorreu o bloqueio do prejuízo causado pela infusão do 8-OH, logo, os animais foram capazes de formar a memória de reconhecimento social. A ANOVA de uma via não mostrou diferença significativa entre os grupos Nan-190 + 8-OH vs. Veh.

Estes resultados sugerem que os receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> do CI participam da consolidação da memória de reconhecimento social.



**Figura 7. Efeito da infusão do agonista e do antagonista dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> sobre a consolidação da memória de reconhecimento social.** Animais foram submetidos ao paradigma de discriminação social e imediatamente após a sessão de treino receberam intra-CI (0,5 µl/lado) as infusões de veículo (Veh), 8-OH-DPAT (8-OH; 6,25 µg/lado), Nan-190 (Nan-190; 1,25 µg/lado) ou coinfusão de 8-OH mais Nan-190 (8-OH +Nan-190). Vinte e quatro horas após a sessão de treino, os animais foram submetidos a uma sessão de teste de 5 min na presença do juvenil familiar (F) e de um juvenil novo (N). Os pontos indicam a média teórica de 50%. Os dados estão expressos como média ± erro padrão e estão representados como porcentagem do tempo total de exploração (n = 9-12 animais por grupo). \*\* $P<0,01$  Veh-N vs. 8-OH-N, ANOVA de uma via seguida do Teste de Comparações Múltiplas de Newman-Keuls.

Importante destacar que não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos no tempo total de exploração durante a sessão de teste (Tabela 2)

indicando que as doses dos fármacos utilizados não afetaram as habilidades motoras ou a motivação para explorar os juvenis.

**Tabela 2.** Tempo total de exploração durante a sessão de teste na tarefa de discriminação social.

Tratamento	Tempo total de exploração (s)
Veiculo	81,9±3,6
D-Serina	74,2±8,8
AP5	60,5±7,2
Isoproterenol	90,8±10,2
Timolol	83,3±7,6
Isoproterenol +Timolol	96,4±14,9
SKF38393	83±6,7
SCH23390	58,1±8,9
SKF38393+SCH23390	56,4±7,7
Dimaprite	56,6±3,4
Ranitidina	82,6±8,9
8-OH-DPAT	79,9±9,1
Nan-190	77±10,9
8-OH-DPAT +Nan-190	89,7±10,2

Os dados são apresentados como média ± erro padrão para ANOVA de uma via.

## 5. DISCUSSÃO

Evidências sugerem que o CI possui uma participação significativa no funcionamento da memória em diferentes tarefas comportamentais. Embora tenha sido demonstrado que o CI é necessário para formação e modulação de diferentes memórias (BALDERAS; RODRIGUEZ-ORTIZ; BERMUDEZ-RATTONI, 2015; DELINT-RAMÍREZ; SALCEDO-TELLO; BERMUDEZ-RATTONI, 2008; BERMUDEZ-RATTONI; MCGAUGH 1991; MELLO e SOUZA et al. 2001), não se tinha o conhecimento sobre o seu envolvimento na memória de reconhecimento social.

A MRS é crucial para a sobrevivência, formação de grupos e evolução da espécie (LESER; WAGNER, 2015; NORMAN *et al.*, 2012; VANDERSCHUREN; ACHTERBERG; TREZZA, 2016), no entanto poucos estudos evidenciam os seus mecanismos. Sabe-se que as memórias podem ser moduladas por substâncias exógenas (ROOZENDAAL; MCGAUG, 2011). Esta modulação pode ocorrer através de diferentes neurotransmissores e neuromoduladores, como glutamato, dopamina, histamina, noradrenalina e serotonina (BERMUDEZ-RATTONI, 2014; MIRANDA *et al.*, 2011; BARROS *et al.* 2001).

Os dados obtidos no presente trabalho sugerem que os receptores dopaminérgicos D1/D5,  $\beta$ -adrenérgicos e serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub>, mas não os glutamatérgicos do tipo NMDA e os histaminérgicos H<sub>2</sub>, do CI, estão envolvidos na consolidação da MRS, pelo menos no intervalo de tempo que foi analisado (imediatamente após a sessão de aprendizado).

Em relação aos receptores alvos do estudo, PARKES et al., (2014) estudaram a participação dos receptores NMDA e muscarínicos na aprendizagem do gosto apetitivo. O estudo demonstrou que os receptores muscarínicos e NMDA participam de forma diferente, quando bloqueado os receptores NMDA com a infusão do seu antagonista, isso não prejudicou o aprendizado no gosto apetitivo, mas sim o aprendizado no condicionamento aversivo ao gosto, indicando que o CI pode ter função participativa oposta em distintos aprendizados. Em concordância com estas observações, os resultados do presente trabalho verificaram que os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA não participa da consolidação da MRS, uma vez que a infusão do seu

antagonista AP5 no CI, imediatamente após a sessão de treino, não causou prejuízo na MRS. Indicando, portanto que os receptores NMDA do CI participam de forma diferente para distintos aprendizados (PARKES *et al.*, 2014).

Outro neurotransmissor envolvido com diferentes funções neurobiológicas, inclusive a memória é a histamina. O entendimento dos efeitos dos receptores histaminérgicos é complexo, pois o seu envolvimento pode ser distinto, dependendo da tarefa, estrutura encefálica e tipo de memória analisada (KÖHLER *et al.*, 2011; BROWN; STEVENS; HAAS, 2001). Os resultados do presente estudo sugerem que o sistema histaminérgico, mais especificamente os receptores H2 do CI não estão envolvidos na MRS. Este resultado é similar ao encontrado com os receptores NMDA. Indicando que estes receptores, no CI, participam de forma diferente para distintos aprendizados, neste caso, na MRS. Apesar desta estrutura encefálica receber densas projeções histaminérgicas (HAAS; SERGEEVA; SELBACH, 2008), e o bloqueio dos receptores histaminérgicos indicar prejuízo de diferentes funções do SNC, inclusive a memória (PURÓN-SIERRA *et al.*, 2010) são escassos os trabalhos, principalmente sobre o receptor histaminérgico H2.

Outro também importante neurotransmissor que participa de diferentes funções neurobiológicas é a dopamina. Todos os seus receptores são amplamente expressos no SNC. Os resultados do presente estudo sugerem que os receptores dopaminérgicos D1/D5 do CI estão envolvidos na consolidação da MRS, uma vez que a infusão do seu antagonista SCH 23390 imediatamente após a sessão de treino, prejudicou a consolidação da MRS, além disso, esse efeito foi bloqueado pela coinfusão do agonista juntamente com o antagonista dos receptores dopaminérgicos D1/D5 no CI. O estudo de Berman e colaboradores (2000) evidenciou a importância de diferentes neurotransmissores do CI para formação da memória gustativa, incluindo os receptores dopaminérgicos D1/D5, sendo necessários para a aquisição da informação, mas não para a evocação desta memória (BERMAN *et al.*, 2000).

Os receptores  $\beta$ -adrenérgicos parecem desempenhar um papel importante na consolidação da MRS (ZINN *et al.*, 2016), porém o conhecimento das funções dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos do CI são escassos. O estudo de

Miranda e colaboradores (2009) demonstrou que são necessários os receptores  $\beta$ -adrenérgicos do CI durante a aquisição da memória em um contexto aversivo (MIRANDA; ORTIZ-GODINA; GARCÍA, 2009). Os resultados obtidos no presente trabalho vão ao encontro destes, pois demonstram que os  $\beta$ -adrenoreceptores do CI participam da consolidação da MRS, uma vez que a infusão do seu antagonista timolol, imediatamente após a sessão de treino, prejudicou a consolidação da MRS, entretanto, esse prejuízo foi bloqueado pela coinfusão do agonista juntamente com o antagonista dos  $\beta$ -adrenoreceptores.

Ainda, os dados obtidos no presente trabalho indicam que os receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> do CI também são importantes para a consolidação da MRS, uma vez que a infusão do seu agonista 8-OH-DPAT imediatamente após a sessão de treino, prejudicou a consolidação da MRS, além disso, a coinfusão do agonista juntamente com o antagonista dos receptores 5-HT<sub>1A</sub> foi capaz de bloquear esse prejuízo. Esses resultados corroboram com dados previamente descritos sobre o CI e os receptores 5-HT<sub>1A</sub>, pois Mello e Souza e colaboradores (2001) treinaram os animais na tarefa esquiva inibitória e imediatamente após o treino foi infundido o agonista ou antagonista dos receptores serotoninérgico 5HT<sub>1A</sub>. O teste de retenção revelou um prejuízo quando infundido o agonista desse receptor, indicando uma sobreativação dos receptores 5HT<sub>1A</sub> no CI prejudicando a consolidação da memória na esquiva inibitória. Isto sugere que estes receptores do CI podem modular a consolidação da memória.

Portanto, o presente trabalho constitui um importante complemento para o conhecimento da modulação da consolidação da memória de reconhecimento social, bem como do Córtex Insular, pois o conhecimento das funções dos receptores NMDA, D1/D5, H2,  $\beta$ -adrenérgico e 5HT<sub>1A</sub> é de grande importância, uma vez que podem surgir novas abordagens terapêuticas.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados desta dissertação de mestrado demonstram que:

Os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, do córtex insular, não participam do processo de consolidação da memória de reconhecimento social.

Os receptores dopaminérgicos D1/D5, do córtex insular, participam do processo de consolidação da memória de reconhecimento social.

Os receptores histaminérgicos H2, do córtex insular, não participam do processo de consolidação da memória de reconhecimento social.

Os receptores  $\beta$ -adrenérgicos, do córtex insular, participam do processo de consolidação da memória de reconhecimento social.

Os receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub>, do córtex insular, participam do processo de consolidação da memória de reconhecimento social.

## REFERÊNCIAS

ADOLPHS, R. The social brain: neural basis of social knowledge. **Annual review of psychology**, jan. 2009. v. 60, n. 1, p. 693–716.

ALVES, F. H. F. *et al.* Involvement of the insular cortex in the consolidation and expression of contextual fear conditioning. **European journal of neuroscience**, jul. 2013. v. 38, n. 2, p. 2300–2307.

BALDERAS, I.; RODRIGUEZ-ORTIZ, C. J.; BERMUDEZ-RATTONI, Federico. Consolidation and reconsolidation of object recognition memory. **Behavioural brain research**, maio. 2015. v. 285, p. 213–222.

BARROS, D. M. *et al.* Simultaneous modulation of retrieval by dopaminergic d(1), beta-noradrenergic, serotonergic-1a and cholinergic muscarinic receptors in cortical structures of the rat. PMID: 11423160: **Behavioural brain research**, 28 set. 2001. v. 124, n. 1, p. 1–7.

BERMAN, D. E. *et al.* The role of identified neurotransmitter systems in the response of insular cortex to unfamiliar taste: activation of erk1–2 and formation of a memory trace. **The journal of neuroscience**, 15 set. 2000. v. 20, n. 18, p. 7017.

BERMUDEZ-RATTONI, F. Insular cortex is involved in consolidation of object recognition memory. **Learning & memory**, 1 set. 2005. v. 12, n. 5, p. 447–449.

\_\_\_\_\_; INTROINI-COLLISON, I.; MCGAUGH, J L. Reversible inactivation of the insular cortex by tetrodotoxin produces retrograde and anterograde amnesia for inhibitory avoidance and spatial learning. 1991. v. 88.

BERMUDEZ-RATTONI, Federico. Is memory consolidation a multiple-circuit system? **Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america**, 4 maio. 2010. v. 107, n. 18, p. 8051–8052.

\_\_\_\_\_. The forgotten insular cortex: its role on recognition memory formation. **Neurobiology of learning and memory**, mar. 2014. v. 109, p. 207–216.

\_\_\_\_\_; MCGAUGH, James L. Insular cortex and amygdala lesions differentially affect acquisition on inhibitory avoidance and conditioned taste aversion. **Brain research**, maio. 1991. v. 549, n. 1, p. 165–170.

BLUTHÉ, R. M.; GHEUSI, G.; DANTZER, R. Gonadal steroids influence the involvement of arginine vasopressin in social recognition in mice. **Psychoneuroendocrinology**, 1993. v. 18, n. 4, p. 323–335.

BONINI, J. S. *et al.* Histamine facilitates consolidation of fear extinction. **The international journal of neuropsychopharmacology**, 7 jan. 2011. v. 14, n. 09, p. 1209–1217.

BOUCHER, O. *et al.* Social information processing following resection of the insular cortex. **Neuropsychologia**, maio. 2015. v. 71, p. 1–10.

BROWN, M. W.; XIANG, J. Z. Recognition memory: neuronal substrates of the judgement of prior occurrence. **Progress in neurobiology**, jun. 1998. v. 55, n. 2, p. 149–189.

BROWN, R. E.; STEVENS, D. R.; HAAS, Helmut L. The physiology of brain histamine. **Progress in neurobiology**, abr. 2001. v. 63, n. 6, p. 637–672.

BURIANOVA, H.; MCINTOSH, A. R.; GRADY, C. L. A common functional brain network for autobiographical, episodic, and semantic memory retrieval. **Neuroimage**, 1 jan. 2010. v. 49, n. 1, p. 865–874.

BYCHOWSKI, M. E.; MENA, J. D.; AUGER, C. J. Vasopressin infusion into the lateral septum of adult male rats rescues progesterone-induced impairment in social recognition. **Neuroscience**, ago. 2013. v. 246, p. 52–58.

CAHILL, L; MCGAUGH, J L. Modulation of memory storage. **Current opinion in neurobiology**, abr. 1996. v. 6, n. 2, p. 237–242.

CAHILL, Larry *et al.* B-adrenergic activation and memory for emotional events. **Nature**, 20 out. 1994. v. 371, n. 6499, p. 702–704.

\_\_\_\_\_; ALKIRE, M. T. Epinephrine enhancement of human memory consolidation: interaction with arousal at encoding. PMID: 12591227: **Neurobiology of learning and memory**, mar. 2003. v. 79, n. 2, p. 194–198.

CARVALHO MYSKIW, J. DE *et al.* Hippocampal molecular mechanisms involved in the enhancement of fear extinction caused by exposure to novelty. **Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america**, 25 mar. 2014. v. 111, n. 12, p. 4572–4577.

CLAUSEN, B. *et al.* Impairments of exploration and memory after systemic or prefrontal d1-receptor antagonism in rats. **Behav brain res**, out. 2011. v. 223, p. 241–254.

DE CARVALHO MYSKIW, J. *et al.* Extinction learning, which consists of the inhibition of retrieval, can be learned without retrieval. **Proceedings of the national academy of sciences**, 13 jan. 2015. v. 112, n. 2, p. E230–E233. . Acesso em: 22 jan. 2015.

\_\_\_\_\_; BENETTI, F.; IZQUIERDO, Iván. Behavioral tagging of extinction learning. **Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america**, 15 jan. 2013. v. 110, n. 3, p. 1071–1076.

DELINT-RAMÍREZ, I.; SALCEDO-TELLO, P.; BERMUDEZ-RATTONI, Federico. Spatial memory formation induces recruitment of nmda receptor and psd-95 to synaptic lipid rafts. **Journal of neurochemistry**, ago. 2008. v. 106, n. 4, p. 1658–1668.

DOYLE, M.; KIEBLER, M. A. Mechanisms of dendritic mrna transport and its role in synaptic tagging. PMID: 21878995 PMCID: PMC3181491: **The embo journal**, 31 ago. 2011. v. 30, n. 17, p. 3540–3552.

ENGELMANN, M.; LUDWIG, M.; LANDGRAF, R. Simultaneous monitoring of intracerebral release and behavior: endogenous vasopressin improves social recognition. **Journal of neuroendocrinology**, ago. 1994. v. 6, n. 4, p. 391–395.

EVERTS, H. G.; KOOLHAAS, J. M. Lateral septal vasopressin in rats: role in social and object recognition? **Brain research**, 20 jun. 1997. v. 760, n. 1–2, p. 1–7.

FERNANDEZ-RUIZ, J. *et al.* Effects of catecholaminergic depletion of the amygdala and insular cortex on the potentiation of odor by taste aversions. **Behavioral and neural biology**, nov. 1993. v. 60, n. 3, p. 189–191.

FIORENZA, N. G. *et al.* Modulation of the extinction of two different fear-motivated tasks in three distinct brain areas. **Behavioural brain research**, 15 jun. 2012. v. 232, n. 1, p. 210–216.

FURINI, C.R.G. *et al.* D1 and d5 dopamine receptors participate on the consolidation of two different memories. **Behavioural brain research**, set. 2014a. v. 271, p. 212–217.

\_\_\_\_\_ *et al.* D1 and d5 dopamine receptors participate on the consolidation of two different memories. **Behavioural brain research**, set. 2014b. v. 271, p. 212–217.

GABOR, C. S. *et al.* Interplay of oxytocin, vasopressin, and sex hormones in the regulation of social recognition. **Behavioral neuroscience**, fev. 2012. v. 126, n. 1, p. 97–109.

GARRIDO ZINN, C. *et al.* Major neurotransmitter systems in dorsal hippocampus and basolateral amygdala control social recognition memory. **Proceedings of the national academy of sciences**, 16 ago. 2016. v. 113, n. 33, p. E4914–E4919.

GIESE, K. P.; MIZUNO, K. The roles of protein kinases in learning and memory. **Learn mem**, out. 2013. v. 20, p. 540–52.

GOGOLLA, N. *et al.* Sensory integration in mouse insular cortex reflects gaba circuit maturation. **Neuron**, ago. 2014. v. 83, n. 4, p. 894–905.

GUTIÉRREZ, H. *et al.* Blockade of n-methyl-d-aspartate receptors in the insular cortex disrupts taste aversion and spatial memory formation. **Neuroscience**, mar. 1999. v. 89, n. 3, p. 751–758.

HAAS, H. L.; SERGEEVA, O. A.; SELBACH, O. Histamine in the nervous system. **Physiological reviews**, 1 jul. 2008. v. 88, n. 3, p. 1183–1241.

HUANG, Y. Y.; KANDEL, E. R. D1/d5 receptor agonists induce a protein synthesis-dependent late potentiation in the ca1 region of the hippocampus. **Proc natl acad sci u s a**, mar. 1995. v. 92, p. 2446–50.

IZQUIERDO, Iván. **Memória**. 2<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

JÄRVINEN, A.; KORENBERG, J. R.; BELLUGI, U. The social phenotype of williams syndrome. **Current opinion in neurobiology**, jun. 2013. v. 23, n. 3, p. 414–422.

JONES, C. L.; WARD, J.; CRITCHLEY, H. D. The neuropsychological impact of insular cortex lesions. **Journal of neurology, neurosurgery & psychiatry**, 1 jun. 2010. v. 81, n. 6, p. 611–618.

KANDEL, Eric R. The molecular biology of memory: camp, pka, cre, creb-1, creb-2, and cpeb. **Molecular brain**, 2012. v. 5, n. 1, p. 14.

KANDEL, Eric R.; DUDAI, Y.; MAYFORD, M. R. The molecular and systems biology of memory. **Cell**, mar. 2014. v. 157, n. 1, p. 163–186.

KIM, J. *et al.* A perfusion fmri study of the neural correlates of sustained-attention and working-memory deficits in chronic traumatic brain injury. PMID: 22357634: **Neurorehabilitation and neural repair**, set. 2012. v. 26, n. 7, p. 870–880.

KOGAN, J. H.; FRANKLAND, P. W.; SILVA, A. J. Long-term memory underlying hippocampus-dependent social recognition in mice. **Hippocampus**, 2000. v. 10, n. 1, p. 47–56.

KÖHLER, C. A. *et al.* Histaminergic mechanisms for modulation of memory systems. **Neural plasticity**, 2011. v. 2011, p. 1–16.

KOMPUS, K. *et al.* Dynamic switching between semantic and episodic memory systems. **Neuropsychologia**, set. 2009. v. 47, n. 11, p. 2252–2260.

KOSAR, E.; GRILL, H. J.; NORNGREN, R. Gustatory cortex in the rat. ii. thalamocortical projections. **Brain research**, ago. 1986. v. 379, n. 2, p. 342–352.

LESER, N.; WAGNER, S. The effects of acute social isolation on long-term social recognition memory. **Neurobiology of learning and memory**, out. 2015. v. 124, p. 97–103.

MAYFORD, M.; SIEGELBAUM, S. A.; KANDEL, E. R. Synapses and memory storage. **Cold spring harbor perspectives in biology**, 1 jun. 2012. v. 4, n. 6, p. a005751–a005751.

MCGAUGH, J. L. Memory--a century of consolidation. 5451: **Science**, jan. 2000. v. 287, p. 248–51.

MCGAUGH, James L. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. **Annual review of neuroscience**, 2004. v. 27, p. 1–28.

MCGAUGH, James L. Making lasting memories: remembering the significant. PMID: 23754441 PMCID: PMC3690616: **Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america**, 18 jun. 2013. v. 110 Suppl 2, p. 10402–10407.

\_\_\_\_\_; ROOZENDAAL, B. Drug enhancement of memory consolidation: historical perspective and neurobiological implications. **Psychopharmacology**, jan. 2009. v. 202, n. 1–3, p. 3–14.

MENEZES, J. *et al.* Facilitation of fear extinction by novelty depends on dopamine acting on d1-subtype dopamine receptors in hippocampus. **Proceedings of the national academy of sciences**, 31 mar. 2015. v. 112, n. 13, p. E1652–E1658.

MIRANDA, M. I. *et al.* -adrenergic receptors in the insular cortex are differentially involved in aversive vs. incidental context memory formation. **Learning & memory**, 15 jul. 2011. v. 18, n. 8, p. 502–507.

MIRANDA, María Isabel; ORTIZ-GODINA, F.; GARCÍA, D. Differential involvement of cholinergic and beta-adrenergic systems during acquisition, consolidation, and retrieval of long-term memory of social and neutral odors. **Behavioural brain research**, 24 ago. 2009. v. 202, n. 1, p. 19–25.

MITCHNICK, K. A. *et al.* Differential contributions of *de novo* and maintenance dna methyltransferases to object memory processing in the rat hippocampus and perirhinal cortex - a double dissociation. **European journal of neuroscience**, mar. 2015. v. 41, n. 6, p. 773–786.

MORICI, J. F.; BEKINSCHTEIN, P.; WEISSTAUB, N. V. Medial prefrontal cortex role in recognition memory in rodents. **Behavioural brain research**, out. 2015. v. 292, p. 241–251.

MYSKIW, J. C. *et al.* On the participation of mtor in recognition memory. **Neurobiol learn mem**, mar. 2008. v. 89, p. 338–51.

NAGAI, M.; KISHI, K.; KATO, S. Insular cortex and neuropsychiatric disorders: a review of recent literature. **European psychiatry**, set. 2007. v. 22, n. 6, p. 387–394.

NAKAI, T. *et al.* Girdin phosphorylation is crucial for synaptic plasticity and memory: a potential role in the interaction of bdnf/trkb/akt signaling with nmda receptor. **Journal of neuroscience**, 5 nov. 2014. v. 34, n. 45, p. 14995–15008.

NOACK, J.; MURAU, R.; ENGELMANN, M. Consequences of temporary inhibition of the medial amygdala on social recognition memory performance in mice. **Frontiers in neuroscience**, 29 abr. 2015. v. 9. Disponível em:

<<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2015.00152/abstract>>. Acesso em: 23 jan. 2017.

NORMAN, G. J. *et al.* Social neuroscience: the social brain, oxytocin, and health. **Social neuroscience**, jan. 2012. v. 7, n. 1, p. 18–29.

PARKES, S. L. *et al.* Differential role of insular cortex muscarinic and nmda receptors in one-trial appetitive taste learning. **Neurobiology of learning and memory**, dez. 2014. v. 116, p. 112–116.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. San Diego: Academic Press, 1986.

POPIK, P.; VETULANI, J.; REE, J. M. VAN. Low doses of oxytocin facilitate social recognition in rats. **Psychopharmacology**, 1992. v. 106, n. 1, p. 71–74.

PURÓN-SIERRA, L. *et al.* Blockade of nucleus basalis magnocellularis or activation of insular cortex histamine receptors disrupts formation but not retrieval of aversive taste memory. **Neurobiology of learning and memory**, fev. 2010. v. 93, n. 2, p. 216–220.

QUEVEDO, J. *et al.* Consolidação da memória e estresse pós-traumático. **Revista brasileira de psiquiatria**, jun. 2003. v. 25. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-44462003000500007&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-44462003000500007&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)>. Acesso em: 24 jan. 2017.

RANG, H. P. **Rang & dale farmacologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

RANGEL-BARAJAS, C.; CORONEL, I.; FLORÁN, B. Dopamine receptors and neurodegeneration. **Aging and disease**, 2015. v. 6, n. 5, p. 349.

REICHEL, C. M. *et al.* Loss of object recognition memory produced by extended access to methamphetamine self-administration is reversed by positive allosteric modulation of metabotropic glutamate receptor 5. PMID: 21150906PMCID: PMC3052905: **Neuropsychopharmacology: official publication of the american college of neuropsychopharmacology**, mar. 2011. v. 36, n. 4, p. 782–792.

RENOULT, L. *et al.* Personal semantics: at the crossroads of semantic and episodic memory. **Trends in cognitive sciences**, nov. 2012. v. 16, n. 11, p. 550–558.

RIBEIRO, F. M. *et al.* Metabotropic glutamate receptors and neurodegenerative diseases. **Pharmacological research**, jan. 2017. v. 115, p. 179–191.

RODRÍGUEZ-DURÁN, L. F.; ESCOBAR, M. L. Nmda receptor activation and pkc but not pka lead to the modification of the long-term potentiation in the insular cortex induced by conditioned taste aversion: differential role of kinases in metaplasticity. **Behavioural brain research**, jun. 2014. v. 266, p. 58–62.

ROESLER, R.; SCHRÖDER, N. Cognitive enhancers: focus on modulatory signaling influencing memory consolidation. **Pharmacology biochemistry and behavior**, ago. 2011. v. 99, n. 2, p. 155–163.

RONDARD, P.; PIN, J.-P. Dynamics and modulation of metabotropic glutamate receptors. **Current opinion in pharmacology**, fev. 2015. v. 20, p. 95–101.

ROOZENDAAL, B.; MCGAUGH, James L. Memory modulation. **Behavioral neuroscience**, 2011. v. 125, n. 6, p. 797–824.

SACAI, H. *et al.* The impairment in spatial learning and hippocampal ltd induced through the pka pathway in juvenile-onset diabetes rats are rescued by modulating nmda receptor function. **Neuroscience research**, 16 fev. 2014.

SCHACTER, D. L. The cognitive neuroscience of memory: perspectives from neuroimaging research. PMID: 9415920 PMCID: PMC1692095: **Philosophical transactions of the royal society of london. series b, biological sciences**, 29 nov. 1997. v. 352, n. 1362, p. 1689–1695.

SHAHAR-GOLD, H.; GUR, R.; WAGNER, S. Rapid and reversible impairments of short- and long-term social recognition memory are caused by acute isolation of adult rats via distinct mechanisms. **Plos one**, 31 maio. 2013. v. 8, n. 5, p. e65085.

SHURA, R. D.; HURLEY, R. A.; TABER, K. H. Insular cortex: structural and functional neuroanatomy. **The journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences**, jan. 2014. v. 26, n. 4, p. iv-282.

SQUIRE; KANDEL, Eric R. **Memória: da mente às moléculas**. [S.l.]: Artmed, 2003.

SQUIRE, L. R. Declarative and nondeclarative memory: multiple brain systems supporting learning and memory. PMID: 23964880: **Journal of cognitive neuroscience**, 1992. v. 4, n. 3, p. 232–243.

\_\_\_\_\_; KNOWLTON, B.; MUSEN, G. The structure and organization of memory. **Annual review of psychology**, jan. 1993. v. 44, n. 1, p. 453–495.

SQUIRE, Larry R. **Memory: from mind to molecules**. 2nd ed ed. Greenwood Village, Colo: Roberts & Co, 2009.

STERN, S. A.; ALBERINI, C. M. Mechanisms of memory enhancement. **Wiley interdisciplinary reviews. systems biology and medicine**, fev. 2013. v. 5, n. 1, p. 37–53.

THOR, D. H.; HOLLOWAY, W. R. Social memory of the male laboratory rat. **Journal of comparative and physiological psychology**, 1982a. v. 96, n. 6. Disponível em: <<http://psycnet.apa.org/psycinfo/1983-20411-001>>. Acesso em: 20 nov. 2013.

\_\_\_\_\_; \_\_\_\_\_. Social memory of the male laboratory rat. **Journal of comparative and physiological psychology**, 1982b. v. 96, n. 6. Disponível em: <<http://psycnet.apa.org/psycinfo/1983-20411-001>>. Acesso em: 20 nov. 2013.

TRONEL, S.; MILEKIC, M. H.; ALBERINI, C. M. Linking new information to a reactivated memory requires consolidation and not reconsolidation mechanisms. **Plos biology**, 23 ago. 2005. v. 3, n. 9, p. e293.

TULLY, K.; BOLSHAKOV, V. Y. Emotional enhancement of memory: how norepinephrine enables synaptic plasticity. **Molecular brain**, 2010. v. 3, n. 1, p. 15.

VANDERSCHUREN, L. J. M. J.; ACHTERBERG, E. J. M.; TREZZA, V. The neurobiology of social play and its rewarding value in rats. **Neuroscience & biobehavioral reviews**, nov. 2016. v. 70, p. 86–105.

WILSON, D. I. G. *et al.* Lateral entorhinal cortex is critical for novel object-context recognition. **Hippocampus**, maio. 2013. v. 23, n. 5, p. 352–366.

## ANEXO A - Aprovação do projeto pela CEUA/PUCRS



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 73/2015 - CEUA

Porto Alegre, 09 de outubro de 2015.

Prezado Sr(a). Pesquisador(a),

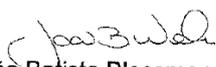
A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 15/00470, intitulado **“Participação do córtex insular na formação da memória de reconhecimento social”**.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está **autorizada** a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Nº de Animais	Espécie	Duração do Projeto
326	Rattus norvegicus	10/2015 – 10/2017

Atenciosamente,

  
Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber  
Coordenador da CEUA/PUCRS

Ilmo. Sr.  
Prof. Dr. Iván Antônio Izquierdo  
INSCER  
Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central  
Av. Ipiranga, 6681 – P. 99 – Portal Tecnopuc – sala 1512  
CEP: 90619-900 – Porto Alegre/RS  
Fone: (51) 3353-6365  
E-mail: ceua@pucrs.br