



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS, LETRAS E ARTES  
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIA  
COGNITIVA E COMPORTAMENTO (PPGNeC)**



**Prejuízo de memória do tipo episódica induzido pela Cetamina:  
diferenças funcionais na expressão de c-Fos em sub-regiões do  
hipocampo**

Ingrid Brasilino Montenegro Bento de Souza

João Pessoa  
Abril de 2015

Ingrid Brasilino Montenegro Bento de Souza

**Prejuízo de memória do tipo episódica induzido pela Cetamina:  
diferenças funcionais na expressão de c-Fos em sub-regiões do  
hipocampo**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Neurociência Cognitiva e Comportamento na Universidade Federal da Paraíba, em defesa do grau de mestre em Neurociência Cognitiva e Comportamento, na linha de pesquisa: Psicobiologia: Processos Psicológicos Básicos e Neuropsicologia, sob orientação do Prof. Dr. Flávio Freitas Barbosa.

João Pessoa  
Abril de 2015

S729p Souza, Ingrid Brasilino Montenegro Bento de.

Prejuízo de memória do tipo episódica induzido pela  
Cetamina: diferenças funcionais na expressão de c-Fos em  
sub-regiões do hipocampo / Ingrid Brasilino Montenegro Bento  
de Souza.- João Pessoa, 2015.

120f. : il.

Orientador: Flávio Freitas Barbosa

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCHL

1. Psicologia. 2. Neurociência cognitiva e comportamento.  
3. Psicobiologia. 4. Memória do tipo episódica. 5. Cetamamina.  
6. C-Fos.

UFPB/BC

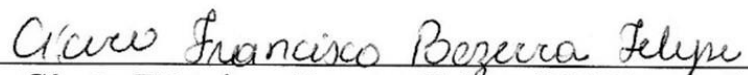
CDU: 159.9(043)

**Prejuízo de memória do tipo episódica induzido pela Cetamina:  
diferenças funcionais na expressão de c-Fos em sub-regiões do  
hipocampo**

Ingrid Brasilino Montenegro Bento de Souza

Assinatura da banca examinadora atestando que a presente dissertação foi  
defendida e aprovada em 24 de abril de 2015

  
Prof. Dr. Flávio Freitas Barbosa (Orientador)

  
Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe (UFPB, membro interno)

  
Prof. Dr. Ramón Hypólito Lima (UFRN, membro externo)

*“São precisamente as perguntas para as  
quais não existem respostas que marcam os  
limites das possibilidades humanas e traçam  
as fronteiras da nossa existência”*

*- Milan Kundera*

*O esforço e a coragem foram imprescindíveis, mas esse trabalho não seria possível sem a confiança que em mim foi depositada e a mestria de um guia que me segurou pela mão e mostrou que seria possível semear flores mesmo em solos pedregosos. Dedico este trabalho ao meu orientador, **Dr. Flávio Freitas Barbosa**, pelo exemplo como pessoa, professor e pesquisador, pelos ensinamentos acadêmicos e de vida, por cada filosofia dividida nas xícaras de café e, acima de tudo, por ter acreditado e apostado em mim, desde o início.*

*Muito obrigada!*

## *Agradecimentos*

*O ciclo chegou ao final? Vitória? Apenas mais uma linha de partida! Um degrau importantíssimo da minha “stairway to haven”. A jornada foi longa e aprendi muito com os caminhos percorridos para chegar até aqui. Apostei todas as minhas fichas na Neurociência, lá no início da graduação. Foi a paixão proporcionada por esse universo encantador - o estudo do cérebro - que me manteve firme, mesmo quando os caminhos pareciam tortos. Consegui escolher uma área e um trabalho que me fazem levantar se não com a ideia de que estou no caminho certo, com a certeza de que faço, diariamente, o que amo. Foram decisões importantes, enfrentei vários desafios acadêmicos e pessoais, me propus novos e desafiantes sonhos. Nesse final, sinto que para montar esse quebra-cabeça muitas peças apresentaram papéis decisivos, às quais, agradeço:*

*Aos meus pais, **Glória e Guilherme**, pela dedicação que sempre esteve presente para erguer meus sonhos, mesmo sem gostar ou entender e, por muitas vezes, sem aceitar minhas abdições. Obrigada por aguentar minhas ausências e me deixar voar alto. À minha irmã, **Mylena**, patrocinadora oficial de todos os meus momentos de procrastinação em casa e incentivadora dos meus finais de semana no laboratório ao repetir “Ei, hoje é sábado, tu não vais pro laboratório?”. E ao meu irmão, **Guilherme**, que me orgulha e divide comigo o gosto pela ciência e pelo rock. Vocês aguentaram o peso do meu humor pelas tarefas acadêmicas e compensaram-me com amizade;*

*À toda minha família que torce por mim. À **vovó**, pelo apoio dado aos meus estudos e por me aturar sempre falando deles, nos dez anos que passei morando com ela. Especialmente, à **Fafá e Rocha**, tios-amigos, tenho muito orgulho de tê-los ao meu lado me ensinando a ser melhor, dia após dia. E à **Tia Graça**, pelo carinho com qual me incentivou, apostou no meu potencial e me deu um espelho de pessoa e de profissional;*

*Ao **Laboratório de Estudos em Memória e Cognição (LEMCOG)**. A jornada não teria graça sem vocês. Ter vocês ao lado desse lindo sonho de pesquisa me fez notar que dividi o peso das tarefas diárias e o amor pela ciência com amigos e companheiros. Em especial, aos que estiveram diretamente envolvidos nos meus (apreensivos) sorrisos enquanto fazia os experimentos: **Ricardo, Isabella, Karen, Davi e Jalles**, muito obrigada por TUDO.*

*À professora **Dra. Regina Helena da Silva** pelo apoio científico, dados direta e indiretamente. Pela simpatia acolhedora quando fiz o primeiro contato, pelo incentivo em todas as conversas e por ser um grande exemplo para a “netinha científica”. Obrigada pelas contribuições emocionalmente episódicas.*

*Ao **Laboratório de Estudos de Memória em Roedores (LEME-UFRN)**, que me acolheu tão bem. Minha temporada em Natal foi riquíssima e aprender com o bom humor, a disponibilidade e a dedicação de vocês foi maravilhoso. Dentro do laboratório, destaco a importância de **Ywlliane Meurer**, que abraçou meu projeto e, todos os dias, fazia questão de me acompanhar e me ensinar passo-à-passo, sua orientação foi FUNDAMENTAL. **Priscila Macedo**, obrigada pela ajuda, pela confiança desde o começo e pelos sorrisos ao final do dia quando chegávamos em casa. Foi maravilhoso ter uma “roomie” com quem eu podia discutir até as tarefas comportamentais no café da manhã. **Luiz Eduardo e André Medeiros** pelas risadas compartilhadas.*

*Ao **Dr. Ramón Hypólito** pela alegria com que me recebeu e me ajudou a entender os procedimentos do laboratório e a memória episódica (rs), e por aceitar o convite para enriquecer o trabalho;*

*À todo o **Laboratório de Estudos Neuroquímicos (LENq-UFRN)** pela simpatia, o espaço cedido, os anticorpos e o conhecimento adquirido;*

*Ao professor **Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe** por aceitar contribuir de maneira tão atenciosa com meu trabalho e enriquecê-lo, desde a qualificação;*

*À **Meiryland Melo**, amiga de sempre e todas as horas. Pelo coleguismo nos primeiros períodos nas salas de aula e as madrugadas de trabalho na graduação, por ter entrado junto comigo nessa aventura de fazer Neurociência, pelos trancos e barrancos que passamos juntas na academia, pelo apoio quando nos separamos academicamente, por ser a amiga que dividiu comigo as aulas do mestrado, pela alegria de voltar a trabalhar junto, mesmo que pouco. Acima de tudo, pelo carinho, a sinceridade e as palavras que eu espero continuar carregando comigo a vida toda;*

*À primeira turma do Mestrado em Neurociência Cognitiva e Comportamento da UFPB, foi uma alegria compartilhar esse espaço com vocês. Em especial, à amizade de **Raynero Aquino, Cytia Diógenes e Marcelli Rodrigues**;*

*Aos amigos que adquiri na Psicologia e que faço questão de guardar os sorrisos do passado e esperar mais no futuro: **Taiane, Lalo, (Gabriel) Lins, Roosevelt, Izabela, Arlene, Jayston e Natany**;*

*Aos amigos que escolhi para colorir a vida e que me dão forças para abrir um sorriso que segura qualquer lágrima;*

*Aos que não acreditaram em mim e aos que perdi pelo caminho porque me ensinaram que as perdas, muitas vezes, são ganhos maiores;*

*Aos **ratos** que todos os dias doam suas vidas pela iniciativa científica, principalmente aos que embarcaram comigo em busca de suas memórias episódicas;*

*À **Universidade Federal da Paraíba** e ao **Programa de Pós-Graduação em Neurociência Cognitiva e Comportamento** pela oportunidade, bem como aos docentes do programa pela partilha de conhecimento. À **CAPES**, pelo incentivo financeiro que me proporcionou a maravilhosa experiência de ter tempo e dedicação integral ao meu mestrado, isso fez toda diferença no meu aprendizado.*

*“O que faz a estrada andar? É o sonho. Enquanto a gente sonhar a estrada permanecerá viva” - Mia Couto*

*Que venha o Doutorado!!!*

## SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS .....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
Resumo .....	xii
Abstract .....	xiii
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 Memória .....	1
1.2 O estudo do subtipo episódico .....	3
1.3 Mecanismos neurais da memória do tipo episódica .....	8
1.4 Papel do sistema glutamatérgico na memória .....	15
1.5 Cetamina .....	17
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>25</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>26</b>
3.1 Objetivo Geral .....	26
3.2 Objetivos específicos .....	26
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
4.1 Animais .....	27
4.2 Delineamento experimental .....	27
4.3 Procedimentos experimentais .....	29
4.3.1 Tarefa de memória do tipo episódica desenvolvida por Kart-Teke et al (2006). .....	29
4.3.2 Tratamento farmacológico e Grupos.....	30
4.3.3 Perfusão dos animais e processamento do cérebro .....	31
4.3.4 Imuno-histoquímica para c-Fos .....	32
4.3.5 Contagem de células para c-Fos.....	33
4.4 Procedimentos estatísticos .....	34
4.4.1 Medidas comportamentais .....	34
4.4.2 Medidas histológicas .....	35
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
5.1 Parâmetros comportamentais .....	37
5.1.1 Habituação .....	37
5.1.2 Treinos e teste .....	39
5.1.3 Taxas de exploração para Memória similar à episódica .....	42
5.1.4 Taxas de discriminação à novidade .....	44

<b>5.2 Parâmetros histológicos .....</b>	<b>46</b>
<b>5.2.1 Contagem de células positivas de c-Fos.....</b>	<b>46</b>
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>62</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>63</b>
<b>9. ANEXO.....</b>	<b>88</b>
<b>9.1 Artigo para submissão .....</b>	<b>88</b>
<b>9.2 Certidão do CEUA .....</b>	<b>106</b>

**ÍNDICE DE TABELAS**

<b>TABELA 1.</b> COMPARAÇÕES ENTRE O TEMPO DE PERMANÊNCIA NAS ZONAS EXTERNA X INTERNA NAS TRÊS SESSÕES DE HABITUAÇÃO.....	39
--	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS SISTEMAS DE MEMÓRIA COM SUAS RESPECTIVAS ÁREAS (DESENHO ADAPTADO DE BIZON, & GALLAGHER, 2005) .....	2
<b>FIGURA 2.</b> ESQUEMA DE COMUNICAÇÃO HIPOCAMPAL E DO FUNCIONAMENTO DA REDE ENTRE NEOCÓRTEX E HIPOCAMPO, BASEADO NO MODELO HIERÁRQUICO (ADAPTADO DE KEALY & COMMINS, 2011) .....	10
<b>FIGURA 3.</b> REPRESENTAÇÃO DO CÉREBRO DO RATO MOSTRANDO VIAS PERFURANTE MEDIAL E LATERAL E AS SUB-REGIÕES HIPOCAMPAIS CA1, CA3 (AB) E (C) E GIRO DENTEADO (ADAPTADO DE BIZON, & GALLAGHER, 2005) .....	13
<b>FIGURA 4.</b> REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DOS DOIS ISÔMEROS DA CETAMINA. A) ISÔMERO S-(+)-CETAMINA. B) ISÔMERO R-(-)-CETAMINA .....	18
<b>FIGURA 5.</b> A) DESCRIÇÃO DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL. B) CAMPO ABERTO CIRCULAR COM PISTAS PROXIMAS. C) PISTAS DISTAIS FIXADAS NA PAREDE DA SALA DE EXPERIMENTO COMPORTAMENTAL .....	28
<b>FIGURA 6.</b> CÓPIAS DOS SEIS OBJETOS UTILIZADOS NAS SESSÕES EXPERIMENTAIS .....	29
<b>FIGURA 7.</b> CARACTERIZAÇÃO DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL E DOS GRUPOS UTILIZADOS NO ESTUDO .....	31
<b>FIGURA 8.</b> ESQUEMA DO PROCEDIMENTO HISTOLÓGICO NO CÉREBRO DOS ANIMAIS. A) VISÃO SAGITAL DA REGIÃO UTILIZADA. B) SEQUÊNCIA MÉDIA DE CORTES CORONAIS. C) ORGANIZAÇÃO DOS CORTES EM LÂMINAS .....	33
<b>FIGURA 9.</b> RESULTADOS DA DISTÂNCIA TOTAL PERCORRIDA NAS TRÊS SESSÕES DE HABITUAÇÃO. OS GRÁFICOS MOSTRAM O DESEMPENHO DOS GRUPOS ENTRE AS SESSÕES ATRAVÉS DA MÉDIA $\pm$ ERRO PADRÃO DA MÉDIA .....	37
<b>FIGURA 10.</b> RESULTADOS DA VELOCIDADE MÉDIA PERCORRIDA ENTRE OS GRUPOS TRÊS SESSÕES DE HABITUAÇÃO. OS GRÁFICOS MOSTRAM O DESEMPENHO ATRAVÉS DA MÉDIA $\pm$ EPM .....	38
<b>FIGURA 11.</b> DISTÂNCIA TOTAL PERCORRIDA PARA OS GRUPOS CONTROLE, SALINA E CETAMINA (8 E 15 MG/KG) ENTRE AS SESSÕES DE TREINO E TESTE. OS GRÁFICOS REPRESENTAM A MÉDIA $\pm$ EPM. + COMPARAÇÕES SIGNIFICATIVAS ENTRE AS SESSÕES DE TESTE. * COMPARAÇÕES SIGNIFICATIVAS ENTRE TREINO 1 E TESTE. # COMPARAÇÕES SIGNIFICATIVAS ENTRE TREINO 2 E TESTE .....	40
<b>FIGURA 12.</b> VELOCIDADE MÉDIA (M/S) PARA OS GRUPOS CONTROLE, SALINA E CETAMINA (8 E 15 MG/KG) ENTRE AS SESSÕES DE TREINO E TESTE. OS GRÁFICOS REPRESENTAM A MÉDIA $\pm$ EPM. + COMPARAÇÕES SIGNIFICATIVAS ENTRE AS SESSÕES DE TESTE. * COMPARAÇÕES SIGNIFICATIVAS ENTRE TREINO 1 E TESTE. # COMPARAÇÕES SIGNIFICATIVAS ENTRE TREINO 2 E TESTE .....	40
<b>FIGURA 13.</b> TEMPO TOTAL DE EXPLORAÇÃO NAS SESSÕES DE TREINO E TESTE PARA OS GRUPOS CONTROLE, SALINA E CETAMINA (8 E 15 MG/KG). OS GRÁFICOS REPRESENTAM A MÉDIA $\pm$ EPM. *COMPARAÇÕES SIGNIFICATIVAS ENTRE TREINO 1 E TESTE. # COMPARAÇÕES SIGNIFICATIVAS ENTRE TREINO 2 E TESTE .....	41
<b>FIGURA 14.</b> TAXA DE EXPLORAÇÃO DOS OBJETOS NA SESSÃO DE TESTE PARA OS GRUPOS CONTROLE, SALINA E CETAMINA (8 E 15 MG/KG). OS GRÁFICOS REPRESENTAM A MEDIANA E O INTERVALO INTERQUARTÍLICO. *COMPARAÇÕES SIGNIFICATIVAS ENTRE OS PARES	

A1>A2. # COMPARAÇÕES SIGNIFICATIVAS ENTRE OS PARES B2>B1. ♦ COMPARAÇÕES SIGNIFICATIVAS ENTRE OS PARES A1>B1 .....	43
<b>FIGURA 15.</b> TAXA DE DISCRIMINAÇÃO À NOVIDADE PARA O PARÂMETRO “ONDE” ENTRE OS GRUPOS CONTROLE, SALINA E CETAMINA (8 E 15 MG/KG). O GRÁFICO REPRESENTA A MÉDIA ± EPM. *COMPARAÇÕES SIGNIFICATIVAS EM RELAÇÃO AO ACASO .....	45
<b>FIGURA 16.</b> TAXA DE DISCRIMINAÇÃO À NOVIDADE PARA O PARÂMETRO “QUANDO” ENTRE OS GRUPOS CONTROLE, SALINA E CETAMINA (8 E 15 MG/KG). O GRÁFICO REPRESENTA A MÉDIA ± EPM. *COMPARAÇÕES SIGNIFICATIVAS EM RELAÇÃO AO ACASO .....	45
<b>FIGURA 17.</b> TAXA DE DISCRIMINAÇÃO À NOVIDADE PARA A INTEGRAÇÃO “O QUÊ-ONDE-QUANDO” ENTRE OS GRUPOS CONTROLE, SALINA E CETAMINA (8 E 15 MG/KG). O GRÁFICO REPRESENTA A MÉDIA ± EPM. *COMPARAÇÕES SIGNIFICATIVAS EM RELAÇÃO AO ACASO.....	46
<b>FIGURA 18.</b> EXEMPLOS DA EXPRESSÃO DE CÉLULAS POSITIVAS PARA C-FOS NO HIPOCAMPO E NAS SUAS SUB-REGIÕES DE CA1, CA3 AB, CA3 C E GD DO GRUPO CONTROLE À 40 µM E 100 µM .....	47
<b>FIGURA 19.</b> NÚMERO DE CÉLULAS POSITIVAS PARA C-FOS NAS REGIÕES CA1, CA3(AB), CA3C E GD ENTRE OS GRUPOS HC, CONTROLE, SALINA E CETAMINA (8 E 15 MG/KG). O GRÁFICO REPRESENTA A MÉDIA ± EPM. *COMPARAÇÕES SIGNIFICATIVAS EM RELAÇÃO AO HC. + COMPARAÇÕES SIGNIFICATIVAS EM RELAÇÃO AO GRUPO CONTROLE.....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- LTM** – LOBO TEMPORAL MEDIAL
- DA** – DOENÇA DE ALZHEIMER
- GD** – GIRO DENTEADO
- CA1** – REGIÃO 1 DO CORNO DE AMON
- CA3** - REGIÃO 3 DO CORNO DE AMON
- CE** – CÓRTEX ENTORRINAL
- CEM** – CÓRTEX ENTORRINAL MEDIAL
- CEL** – CÓRTEX ENTORRINAL LATERAL
- CPL** - CÓRTEX PÓS-RINAL LATERAL
- LTP** – POTENCIAÇÃO DE LONGA DURAÇÃO, DO INGLÊS “*LONG-TERM POTENTIATION*”
- LTD** - DEPRESSÃO DE LONGA DURAÇÃO, DO INGLÊS “*LONG-TERM DEPRESSION*”
- SNC** – SISTEMA NERVOSO CENTRAL
- CAMKII** – CÁLCIO-CALMODULINA CINASE TIPO II
- PKA** – PROTEÍNA CINASE A
- CREB** – PROTEÍNA DE LIGAÇÃO AO ELEMENTO DE RESPOSTA DO AMPC, DO INGLÊS “*CAMP RESPONSE ELEMENT-BINDING PROTEIN*”
- c-FOS** – PROTO-ONCOGENE DA FAMÍLIA FOS
- IEGs** – GENES IMEDIATOS, DO INGLÊS “*IMEDIATE-EARLY GENES*”
- NMDA** – N-METIL D-ASPARTATO
- NMDAR** - RECEPTOR N-METIL D-ASPARTATO
- AMPA** – DO INGLÊS “*ÁCIDO AMINO-3-HYDROXY-5-METHYL-4-ISOXAZOLEPROPIONIC*”
- CNQX** – DO INGLÊS “*6-CYANO-7-NITROQUINOXALINE-2,3-DIONE*”, ANTAGONISTA COMPETITIVO AMPA
- AP5** - DO INGLÊS “*((2R)-AMINO-5-PHOSPHONOVALERIC ACID; (2R)-AMINO-5-PHOSPHONOPENTANOATE*”, ANTAGONISTA SELETIVO NMDA.
- MK-801** – DO INGLÊS “[*5R,10S*]-[+]-*5-METHYL-10,11-DIHYDRO-5H-DIBENZO[A,D]CYCLOHEPTEN-5,10-IMINE*”, ANTAGONISTA NÃO-COMPETITIVO NMDA
- DCS** - DO INGLÊS “*D-CYCLOSERINA*”
- BDNF** – FATOR NEUOTRÓFICO DERIVADO DO CÉREBRO, DO INGLÊS “*BRAIN-DERIVED NEUOTROFIC FACTOR*”
- CCDV** – CANAIS DE CÁLCIO DEPENDENTES DE VOLTAGEM
- CPF** – CÓRTEX PRÉ-FRONTAL
- HC** – HOME CAGE
- EPM** – ERRO PADRÃO DA MÉDIA
- ANOVA** – ANÁLISE DE VARIÂNCIA, DO INGLÊS “*ANALYSIS OF VARIANCE*”
- HPA** - HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL
- A1** – OBJETO ANTIGO NÃO DESLOCADO
- A2** – OBJETO ANTIGO DESLOCADO
- B1** – OBJETO NOVO NÃO DESLOCADO
- B2** – OBJETO NOVO DESLOCADO
- CEUA** – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
- UFPB** – UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

## Resumo

A memória similar à episódica é um subtipo de memória declarativa que se refere à recordação, de forma integrada, de onde e quando um determinado evento (o quê) aconteceu. A funcionalidade das sub-regiões do hipocampo dorsal no processo de separação de padrões apresenta-se como mediadora chave da recordação episódica. A neurotransmissão glutamatérgica, em especial dos receptores AMPA e NMDA, caracteriza-se como essencial em processos neuroplásticos. A Cetamina é um dos poucos antagonistas não competitivos NMDA disponíveis na prática clínica com efeitos no desempenho cognitivo e na plasticidade. O objetivo do presente estudo foi avaliar a ação aguda da Cetamina no comportamento da memória do tipo episódica e a funcionalidade das sub-regiões hipocampais (CA1, CA3 (ab e c) e GD), através da expressão do gene imediato (IEG), c-Fos. O procedimento experimental, realizado em uma arena circular, consistiu em duas sessões de treino e uma de teste com duração de cinco minutos cada. No primeiro treino, o animal é colocado em um campo aberto circular para explorar quatro objetos iguais (A), após o intervalo de 1 hora, o rato inicia o segundo treino com outros quatro objetos (B), destes dois aparecem em disposições espaciais não alocadas na primeira sessão. Na etapa do teste são apresentados quatro objetos, sendo dois recentes (B) e dois antigos (A), dois deslocados (A2 e B2) e dois estacionários (A1 e B1). Neste estudo, 46 ratos Wistar machos adultos foram divididos em cinco grupos. O grupo *home cage* foi escolhido como controle para a avaliação basal dos IEGs nas sub-regiões do hipocampo dorsal. Quatro grupos, contendo 10 animais cada, realizaram o procedimento comportamental, sendo um grupo controle e três grupos que passaram por intervenção farmacológica: um grupo que recebeu Salina 0.9% (i.p.) e os outros dois receberam a Cetamina (i.p.), nas doses de 8mg/kg e 15 mg/kg, imediatamente após o segundo treino. As análises do estudo foram duplo-cego e os objetos e suas localizações espaciais foram randomizadas entre os grupos. As medidas comportamentais utilizadas foram a “distância total percorrida”, a “velocidade” e o “tempo de exploração” para todas as sessões. Na sessão de teste também foram calculadas a “taxa de exploração” e a “taxa de discriminação” dos objetos. No teste de Wilcoxon o grupo controle apresentou o desempenho padrão estatisticamente significativo:  $A1 > A2$ ,  $B2 > B1$  e  $A1 > B1$ . Integrando os três elementos da memória episódica, seguido pelo grupo salina que apresentou o mesmo perfil de exploração entre os objetos antigos e recentes,  $A1 > A2$ ,  $B2 > B1$ . A análise do Welch mostrou diferenças neuroquímicas em todas as sub-regiões do hipocampo, destacando um aumento de c-Fos no giro denteado (GD) dos animais controles quando comparado aos outros grupos, sugerindo o papel desta sub-região para a integração da memória tipo episódica. As duas doses sub-anestésicas da Cetamina induziram um déficit para este tipo de memória. A dose mais elevada demonstrou um possível efeito hipolocomotor, caracterizado pela redução na distância total percorrida e na velocidade, em comparação com os outros grupos, na sessão de teste. Em suma, o déficit de memória tipo episódica foi caracterizado tanto pelo efeito amnésico de Cetamina quanto pela redução de c-Fos no GD desses grupos, sugerindo um possível papel deste campo na formação desse tipo de memória.

**Palavras chave:** Memória do tipo episódica; Cetamina; c-Fos

## Abstract

Episodic-like memory is a subtype of declarative memory that refers recall an integration of where and when a certain event (what) happened. The hippocampus –subregions function in pattern separation process are key to mediating of episodic memory recall. Glutamatergic neurotransmission, particularly AMPA and NMDA receptors, have been characterized as essential in neuroplastic processes. Ketamine is a non-competitive NMDA antagonist available at clinical practice with effect on cognitive performance and plasticity. This study's goal was to evaluate the acute action of ketamine on behavioral and neurochemical aspects of episodic-like memory through immediate-early gene expression (IEG), c-Fos. The experimental procedure was done at a circular arena, and consists of two training sessions and a test of five minutes each. In the first training, the animal was placed in a circular open field to explore four similar objects (A), after a 1 hour, the rats start a second sample with four other objects (B), two of those appear in different spatial locations relative for the first sample. In the test, four objects are shown, two recent-familiar (B) and two old-familiar (A), two displaced (A2, B2) and two stationary (A1 and B1). Forty-six 3-month-old male Wistar rats were separated in five groups. The home cage group (n=6; without apparatus exposure) was used to measure IEG basal expression. The other four groups, with 10 rats each, went through the behavioral test. One of them received saline 0.9% and the other two received 8 mg/kg or 15 mg/kg ketamine ip immediately after the second sample, while the control group received no treatment. All objects and spatial location in this protocol were randomized among groups. The analyses were blinded for groups and the behavioral measures were distance, speed and time of exploration in all sessions. The exploration ratio and discrimination ratio of the four objects in the test session were calculated. Wilcoxon test showed statistically significant differences between these pairs of objects in the control group: A1> A2, B2> B1 and A1> B1. The data indicate that these rats could integrate the three elements of episodic-like memory. The saline group demonstrated the same exploration pattern of control group for comparisons between A1>A2 and B2>B1, but statistical differences were not found between A1 and B1. The Welch's analysis showed a difference of c-Fos expression in all hippocampal sub-regions. The control group had the highest c-Fos expression in the dentate gyrus when compared to the other groups, suggesting the role of this sub-region for integration of episodic-like memory. The two sub-anesthetic doses of ketamine induced a deficit for this type of memory. The highest dose demonstrated a possible hypolocomotion effect, characterized by decreasing of total distance traveled and speed, compared to the other groups at the test session. In short, the deficit of episodic-like memory was characterized both as amnesic effect of ketamine and as decrease of c-Fos in the dentate gyrus of those groups, suggesting a possible role of this field in episodic-like memory formation.

**Keywords:** Episodic-like memory; Ketamine; c-Fos.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Memória

A memória é uma função cognitiva adaptativa que permite armazenar e recuperar um material codificado, indicando que a aprendizagem persistiu através do tempo (Pause et al., 2013). Em termos de classificação, ela pode ser caracterizada quanto ao tempo, como uma memória para até poucos minutos, chamada de memória de curto prazo, e como a memória de longo prazo, que dura horas ou a vida toda (Squire & Zola, 1996). Estudos em pacientes amnésicos, como o caso de Henry Molaison<sup>1</sup> (Scoville & Milner, 1957; Corkin, 2002) e o estabelecimento de modelos animais de amnésia (Dickson & Vanderwolf, 1990) permitiram outro olhar sobre o armazenamento de funções no cérebro, ampliando a ideia de um sistema unitário da memória para uma visão do seu funcionamento através de múltiplos sistemas (Nadel & Hardt, 2011).

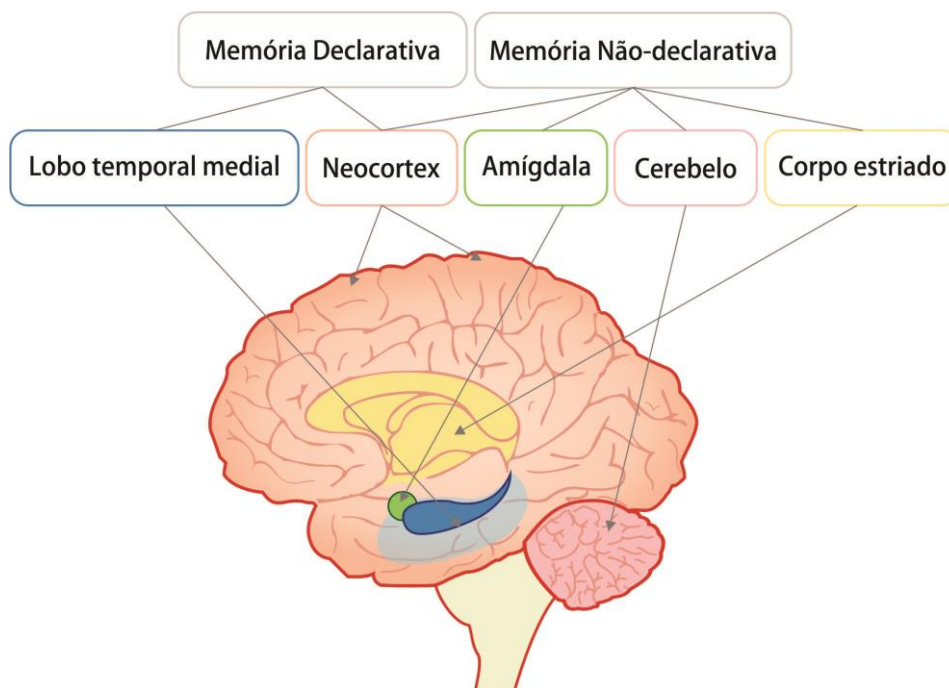
Quanto ao conteúdo, a taxonomia clássica e mais utilizada divide a memória em dois grandes sistemas: a memória não-declarativa ou implícita e a declarativa ou explícita (Squire, Stark, & Clark, 2004). A implícita, conhecida como a memória para procedimentos, é evocada inconscientemente e é expressa através do desempenho de hábitos e de aprendizagem associativa e não associativa. O seu funcionamento é dependente de estruturas neurais como o cerebelo, o neocórtex, a amígdala e o estriado. A memória explícita é consciente, pode ser acessada voluntariamente de forma verbal, e

---

<sup>1</sup> Henry Gustav Molaison: Paciente dos anos 50, conhecido como HM, que sofria de Epilepsia e realizou uma cirurgia para retirada bilateral do lobo temporal medial. Após cirurgia, H.M. conseguia realizar tarefas motoras, relacionadas à memória implícita, mas apresentou-se incapaz de formar novas memórias declarativas (amnésia anterógrada), além uma perda gradual de memórias declarativas já existentes (amnésia retrógrada gradual para os últimos três anos). Até sua morte, em 2008, ele foi permaneceu no hospital e foi estudado, deixando grandes contribuições para o campo da memória (Scoville & Milner, 1957; Corkin; 2002).

apresenta o funcionamento dependente do Lobo Temporal Medial (LTM) (Lombroso, 2004; Squire et al., 2004)

Essa é, ainda, dividida em dois subsistemas: o semântico e o episódico. De maneira geral, eles diferenciam-se pelo tipo e fonte de informação, estando o primeiro relacionado a fatos e o segundo, a eventos (Tulving, 2002). O subtipo semântico funciona como um “dicionário mental” que nos dá a capacidade de acumular informações sobre elementos ou fatos gerais. Já a habilidade de recuperar eventos específicos vivenciados e localizados temporal e espacialmente é conhecida como memória episódica. Assim, ao descrever uma bicicleta como um meio de transporte com duas rodas, pedais e guidão, recorre-se à memória semântica, já para relatar uma perseguição por um cachorro durante passeio de bicicleta ontem em torno de um lago, acessa-se o conteúdo episódico (Greenberg & Verfaellie, 2010).



**Figura 1.** Representação esquemática dos sistemas de memória com suas respectivas áreas (Desenho adaptado de Bizon, & Gallagher, 2005).

O subtipo episódico caracteriza-se por uma lembrança consciente de eventos passados em nossas vidas, remetendo a uma memória autobiográfica, rica em elementos de diferentes aspectos, incluindo pessoas, objetos, datas, localização espacial e ocasiões associadas aos contextos (Tulving & Markowitsch, 1998; Tulving, 2001, 2002; Clayton, Bussey, & Dickinson, 2003; Nadel & Hardt, 2011). Por essa caracterização, esse é subtipo o mais vulnerável e prejudicado em caso de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (DA) (Fouquet, Tobin, & Rondi-Reig, 2010; Palmer & Good, 2011).

Para Tulving (2002), a recordação episódica é uma habilidade unicamente humana, por requerer que o sujeito tenha o conhecimento de si como diferente do mundo (autoconsciência), a consciência auto-noética, que lhes permite uma viagem mental entre as representações no presente e no passado, bem como a capacidade de planejar o futuro através de uma viagem mental no tempo. Apesar de muitos estudos já realizados, esses aspectos fenomenológicos são difíceis de serem mensurados de maneira objetiva na recordação episódica (Pause et al., 2013).

## **1.2 O estudo do subtipo episódico**

Em questionamento à definição de Tulving (2002), as evidências de que os mamíferos não-humanos têm pelo menos algum grau de consciência auto-noética e habilidade de planejar o futuro são crescentes (Dere, Huston, & De Souza Silva, 2005a, 2005b; Inostroza, Brotons-Mas, Laurent, Cid, & Prida, 2013; Palmer & Good, 2011). A memória episódica apresenta um papel fundamental para animais não humanos, como manter o controle de seu próprio comportamento recente e discriminar eventos passados que sejam adaptativos. Neste sentido, pesquisas recentes apontam que esse subtipo não é uma exclusividade do comportamento humano (Fortin, Wright, & Eichenbaum, 2004;

Dere et al., 2005a ; Dere, Kart-Teke, Huston, & De Souza Silva, 2006; Allen & Fortin, 2013; Barbosa et al., 2013; Chao, Nikolaus, Huston, & de Souza Silva, 2014).

Para compreender a capacidade dos animais de declarar a memória episódica, Clayton e colaboradores (2003) estabeleceram as diferenças entre os critérios fenomenológicos, apresentados na definição de Tulving (2001, 2002) e critérios comportamentais. Estes definem a formação de uma memória que é similar à episódica quanto ao seu conteúdo (o que aconteceu), ao local (onde ocorreu) e ao contexto temporal da sequência de eventos (quando ocorreu) (Dere, Pause, & Pietrowsky, 2010). A integração simultânea desses três elementos em uma única experiência, utilizada de forma flexível, caracteriza a validade experimental do tipo episódico (Griffiths, Dickinson, & Clayton, 1999; Clayton et al., 2003; Pause, Jungbluth, Adolph, Pietrowsky, & Dere, 2010) e fornece a oportunidade de estudar seus mecanismos neurais através de modelos animais (Good, Hale, & Staal, 2007; Chang & Huerta, 2012; Davis, Easton, Eacott, & Gigg, 2013).

Os primeiros modelos animais para esse tipo de avaliação foram realizados em aves (Clayton & Dickinson, 1998). Neste protocolo, uma espécie de corvídeo, “*scrub-jays*”, foi submetida a uma tarefa com intervalo de tempo para avaliar se eram capazes de recordar onde foi escondido dois tipos comida, um tipo de larva ou amendoin. Os “*scrub-jays*” preferem as larvas, entretanto, dentro de um intervalo de tempo elas apodrecem e não estão mais palatáveis. Na tarefa, foi permitido aos pássaros procurarem os alimentos em dois intervalos de tempo (4 e 124 horas). Quando o intervalo de tempo dado era maior, eles escolhem os locais onde estavam escondido os amendoins, mesmo preferindo a larva. A mudança de preferência demonstra a capacidade desses animais de saber qual comida (“o quê”) foi armazenada em determinado local (“onde”) e em quanto

tempo (4 ou 124 horas) elas poderiam ficar armazenadas (“quando”), declarando os três critérios comportamentais da memória similar à episódica.

Em 2004, dois estudos relataram a capacidade dos ratos de lembrar, após sucessivos treinos, de uma sequência de odores presentes em diferentes locais de uma arena. Neste caso, usando a combinação do elemento olfativo (o quê) ao elemento espacial (em que local estava determinado odor), diferenciando-os quanto ao momento de apresentação (Ergorul & Eichenbaum, 2004). Fortin e colaboradores (2004) apontam as tarefas de discriminação de odores como hipocampo dependentes e que para resolver esse tipo de tarefa os animais usam estratégias baseadas em recordação.

Com base no estudo de Clayton & Dickinson (1998), foi desenvolvida uma tarefa em labirinto radial de oito braços. Na tarefa, a fase de treino apresentava aos animais quatro braços abertos com recompensa (chocolate) e quatro braços fechados. Na condição de teste, aos braços anteriormente fechados foram adicionados ração, mantendo os outros quatro braços com chocolate. Em resposta, os animais indicaram recordar o primeiro evento ao preferir os braços com chocolate (Babb & Crystal, 2005; Babb & Crystal, 2006a, 2006b).

Apesar de detectarem os elementos episódicos, os protocolos descritos acima necessitam de treinamento intensivo e, assim, não demonstram a resposta espontânea e inata que é requerida na pergunta episódica, tanto em humanos como em animais (Eacott & Easton, 2010). Há uma recente busca por tarefas que acessem os três aspectos comportamentais (“o quê”, “onde” e “quando”) através do desempenho natural dos animais (Barbosa, Pontes, Ribeiro, & Silva, 2010; Wilson, Watanabe, Milner, & Ainge, 2013). A preferência espontânea dos roedores para novidade, como as tarefas de reconhecimento de um novo objeto (Ennaceur & Delacour, 1988), têm sido refinados para

testar componentes espaço-temporais de experiências únicas nos animais (Aggleton & Pearce, 2001; Eacott & Norman, 2004; Dere et al., 2005b; Kart-Teke, De Souza Silva, Huston, & Dere, 2006; DeVito & Eichenbaum, 2010; Langston & Wood, 2010).

Para avaliar a memória episódica nessas condições, foi desenvolvida uma tarefa de um bloco com três sessões. Nesta, os objetos, suas localizações e o revestimento do aparato (contexto) poderiam ser modificados. Na primeira sessão, os ratos foram apresentados aos objetos em um contexto e uma determinada localização espacial. Após o intervalo de tempo, a segunda sessão de treino apresentava aos animais objetos dispostos em contexto e localizações espaciais diferentes. Para a sessão de teste eram escolhidos um dos dois contextos anteriores e um dos objetos estava em disposição espacial não associada ao determinado contexto. Baseado na preferência de exploração para novidade, os ratos exploraram mais o objeto novo em termos de localização-contexto do que o familiar, integrando os elementos de uma memória para “o que”, “onde” e “em que contexto” (Eacott & Norman, 2004; Eacott, Easton, & Zinkivskay, 2005; Eacott & Easton, 2010).

Esse tipo de tarefa é conhecido como paradigma “o quê-onde-em que contexto”, ou seja, em que ocasião o evento aconteceu. Nesse caso, não consideram o aspecto temporal como sendo crucial para integrar as informações e diferenciar dois episódios, ao contrário do que é postulado na teoria clássica para uma memória episódica (Tulving, 2002). O aspecto temporal é importante porque quando se trata de recordações episódicas, dois eventos podem apresentar o mesmo “o que” e o mesmo “onde”, mas não apresentam o mesmo “quando” (Fouquet et al., 2010). Assim, faz-se necessária uma abordagem com protocolos que formem experiências temporais únicas (Clayton et al., 2003).

Dere e colaboradores (2005) adaptaram o teste de reconhecimento de objetos em camundongos, estabelecendo os três critérios comportamentais necessários para o estudo desse subtipo de memória: “o que” (qual objeto), “onde” (qual localização espacial) e “quando” (em que sessão estava o objeto), mas esses critérios não foram vistos de forma integrada nesse protocolo.

Em 2006, Kart-Teke e colaboradores adaptaram esse protocolo para ratos Wistar. A tarefa foi composta por duas sessões de treinos e uma de teste com duração de cinco minutos cada e um intervalo de 50 minutos entre eles. Na primeira sessão, quatro objetos idênticos (A) são dispostos de forma triangular em campo aberto e, na segunda sessão de treino outros quatro objetos (B) são apresentados no campo, dois na mesma disposição espacial onde estavam os objetos A e depois em disposições espaciais diferentes. Na etapa de teste, realizada 50 minutos após o segundo treino, são apresentados quatro objetos, sendo dois recentes (B) e dois antigos (A), dois deslocados (A2 e B2) e dois estacionários (A1 e B1). A representação da figura X, na sessão de métodos, mostra que tanto um objeto antigo quanto um objeto recente foram deslocados para posições espaciais anteriormente ocupadas.

Como esperado, os ratos exploraram mais o objeto recente deslocado do que o não-deslocado, entretanto um padrão inverso foi observado para os objetos antigos, ou seja, o objeto antigo não-deslocado foi mais explorado que o objeto deslocado (Kart-Teke et al., 2006). Esse modelo é uma boa aproximação dos critérios comportamentais propostos, uma vez que os animais declaram, através do comportamento, a localização espacial de apresentação (aspecto “o quê-quando”,  $B2 > B1$ ), a inversão do padrão original, mostrando a preferência de exploração espaço-temporal do objeto antigo mantido fixo em detrimento do deslocado ( $A1 > A2$ ) e a preferência temporal, ou de ordem de aparência entre as sessões (aspecto “o quê-quando”  $A1 > B1$ ).

Neste protocolo, ao deslocar objetos da primeira e da segunda sessão de treino (A2 e B2), há a inversão na preferência entre os objetos antigos como necessária à integração das memórias para “o que”, “onde” e “quando”, padrão não visto na tarefa desenvolvida para camundongos (Dere et al., 2005b). Essa inversão do padrão de exploração entre os objetos antigos não acontece de modo aleatório, mas aparece como integração do conteúdo episódico, excluindo a possibilidade de que as informações espaciais e temporais dos objetos sejam codificadas, armazenadas e recuperadas de forma independente umas das outras (Clayton et al., 2003; Kart-Teke et al., 2006).

Esse é um protocolo promissor porque permite abordar uma avaliação comportamental separada dos diferentes processos mnemônicos (aquisição, consolidação e evocação) em ratos, bem como o estudo dos mecanismos neurobiológicos estruturais e funcionais envolvidos no processamento do subtipo episódico da memória (Barbosa et al., 2013; Inostroza et al., 2013; Chao et al., 2014).

### **1.3 Mecanismos neurais da memória do tipo episódica**

Os múltiplos sistemas de memória envolvem uma arquitetura neural distinta e mudanças a nível celular que levam tempo para surgir e persistir (Nadel & Hardt, 2011). As estruturas do LTM são vistas como essenciais para formação da memória explícita. Em especial, sugere-se que o hipocampo e suas áreas adjacentes estão envolvidos na formação e consolidação de um evento que relaciona ordens temporais e espaciais específicas (Ergorul & Eichenbaum, 2004; DeVito & Eichenbaum, 2011; Barbosa, de Oliveira Pontes, Ribeiro, Ribeiro, & Silva, 2012; Barbosa et al., 2013; Wilson et al., 2013).

A formação da memória tipo episódica necessita de uma maior investigação sobre os mecanismos moleculares que medeiam seus processos (Barbosa et al., 2010). Estudos

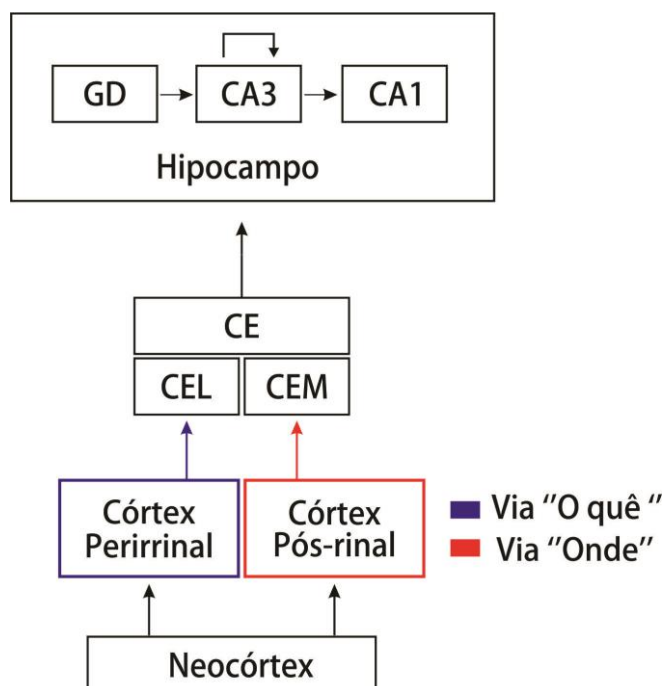
de neuroimagem funcional mostraram que o hipocampo participa do funcionamento de redes corticais para recordação de experiências pessoais passadas e o planejamento de eventos futuros (Schacter, Addis, & Buckner, 2007). Segundo Fyhn, Molden, Witter, Moser, & Moser (2004), o hipocampo é essencial para a codificação rápida e a estocagem de novos episódios, trabalhando em conjunto com o neocórtex através de interações repetidas. Neste sentido, o hipocampo não é o armazém final, mas funciona como integrador capaz de ligar atributos e experiências únicas em uma representação espaço-temporal (Naya & Suzuki, 2011).

O hipocampo possui um circuito particular de funcionamento (Bizon & Gallagher, 2005; Hunsaker, Rosenberg, & Kesner, 2008). De maneira geral, células granulares presentes no Giro Denteado (GD) recebem sinais excitatórios do Córtex Entorrinal (CE) através da via perfurante. O CE projeta parte dos seus axônios para CA2 e CA3 (Steward, 1976). As células granulares do GD também se projetam, via fibras musgosas, formando conexões com CA3. Por sua vez, CA3 possui uma rede de neurônios piramidais que, além de receber informações do GD e possuir reverberações em sua própria estrutura, através dos colaterais de Schaffer, inervam CA1, que representa a maior rede de saída de informações do hipocampo para o CE (figuras 2 e 3). Esse processamento de informações no hipocampo contribui para a formação da memória episódica (Burgess, Maguire, & O'Keefe, 2002; Squire et al., 2004; Kesner, 2007)

O processamento da informação do ambiente é feito através de duas vias paralelas em regiões adjacentes ao hipocampo: a via “o quê”, que é composta pelas porções laterais do córtex entorrinal (CEL) e perirrinal (CPL), recebe informações multimodais de áreas sensoriais, sendo responsável pelas representações características dos objetos ou itens e é essencial para o reconhecimento de objetos. A via “onde”, formada pelas porções mediais do córtex entorrinal (CEM) e pós-rinal, recebe principalmente informações

visuoespaciais, caracterizando-se como funcional para o processamento da localização dos itens ou objetos (Eichenbaum, Sauvage, Fortin, Komorowski, & Lipton, 2012; Allen & Fortin, 2013; Kesner & Rolls, 2015).

Ao revisar diferentes modelos de estudo com animais, incluindo experimentos comportamentais, de lesão e eletrofisiologia, Eichenbaum e colaboradores (2012) destacaram que os diferentes componentes do LTM têm contribuições distintas na recordação episódica e que essa codificação envolve a convergência de informações sobre os eventos e seus contextos espaço-temporais para o hipocampo (figura 2). Em reforço a essa proposta de hierarquia das funções entre áreas para o processamento da memória, alguns estudos apontam que quando o hipocampo é lesionado não há prejuízo para tarefas não associativas, que avaliam de maneira separada os objetos, o aspecto temporal e a localização espacial (Good et al., 2007; Kesner, Taylor, Hoge, & Andy, 2015; Winters, Saksida, & Bussey, 2008). Neste sentido, as informações chegam de córtices associativos para o hipocampo, onde o traço é mantido (Frankland & Bontempi, 2005).



**Figura 2.** Esquema de comunicação hipocampal e do funcionamento da rede entre neocórtex e hipocampo, baseado no modelo hierárquico (Adaptado de Kealy & Commins, 2011).

Há mais de 40 anos existem relatos de que algumas células hipocâmpais disparam mais quando os ratos estão em um local específico de uma arena, conhecidas como “células de lugar” (O’Keefe & Dostrovsky, 1971; Moser, Kropff, & Moser, 2008). Em um ensaio com pequenas alterações na forma do ambiente, ao trocar uma arena circular por uma quadrada, houve mudança no padrão de atividade dessas células hipocâmpais dos roedores. Essas representações discretas do ambiente dependem de um processo de separação de padrões realizado por subáreas do hipocampo (Leutgeb, Leutgeb, Moser, & Moser, 2007).

Outros estudos mostram que além das “células de lugar”, existem células que disparam em um padrão de grade (“células em grade”) no CEM com o papel de segregação de informações espaciais (Allen & Fortin, 2013). De acordo com Eichenbaum e colaboradores (2012), a diferença de papel entre o hipocampo e o CEM na memória episódica se dá porque este, através das “células em grade”, suporta representações espaço-temporais compondo episódios de navegação e fornecendo um mapeamento do ambiente. Já as “células de lugar” no hipocampo representam eventos específicos, sinalizando sequências distintas e sutis de localização que compõe cada episódio.

Modelos computacionais caracterizam as sub-regiões do hipocampo, em sua porção dorsal, como diferentes quanto à funcionalidade no processamento de informações espaço-temporais (Kesner & Rolls, 2015). Em estudos genéticos, de lesão e neurofisiológico a região de CA1 caracteriza-se como mediadora do processamento de informações temporais e funcionalmente envolvida na resolução de tarefas espaço-temporal (Huerta, Sun, Wilson, & Tonegawa, 2000; Hoge & Kesner, 2007; Vago, Bevan, & Kesner, 2007). Barbosa e colaboradores (2012) observaram que após inativar CA3 e GD em uma tarefa de memória similar à episódica houve prejuízo na discriminação

espacial, mas a discriminação temporal foi preservada, mostrando possível mediação de CA1 nesse processo.

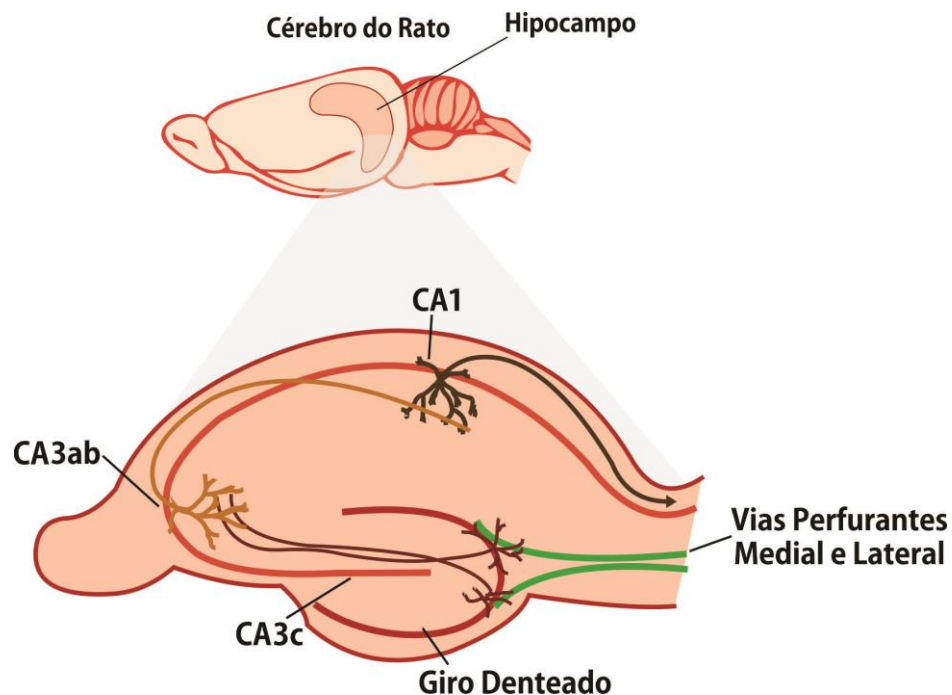
Animais com CA1 lesionado têm um padrão de preferência pela recência espacial do objeto, em detrimento à preferência pela primazia, observada nos animais sem lesão (Hunsaker, Lee, & Kesner, 2008). Sugere-se, assim, que CA1 está particularmente envolvida na estocagem temporal (“quando”) entre episódios semelhantes (Estes, 1985; Rolls & Kesner, 2006; Kesner, Hunsaker, & Ziegler, 2010). De acordo com Agster & Burwell (2013), a porção dorsal de CA1 é a maior via de saída de informações do hipocampo para o neocórtex, além de possuir vias que se ligam à CA3 e GD.

O GD está associado ao processo de separação de padrões, com o importante papel de diferenciar mudanças finas de padrões similares (Dees & Kesner, 2013; Hunsaker & Kesner, 2013). A separação de padrões ocorre quando os padrões de disparo de saída de uma rede diminuem a semelhança entre os disparos de entrada, separando conjuntos de eventos muito similares. A função de separar padrões é atribuída ao giro denteado, inicialmente, por suas características anatômicas. O esquema de codificações esparsas do GD trabalha facilitando a discriminação das informações através da retroalimentação dos mecanismos inibitórios dos interneurônios e, mesmo entradas semelhantes, ativam conjuntos neuronais distintos, conduzindo a codificação de memórias no hipocampo (Deng, Aimone, & Gage, 2010).

CA3 também apresenta um papel na separação de padrões, mas em uma escala um pouco maior, como de mudanças geométricas no ambiente, sendo funcional para o processo de completamento de padrões (Treves et al., 2004; McHugh et al., 2007; Kesner & Rolls, 2015). Essas duas sub-regiões interagem, via fibras musgosas, para o processamento da informação (“o quê”) espacial (“onde”) (Allen & Fortin, 2013). Ratos

com lesões em CA3 mostraram prejuízo em associações relativas de aprendizagem para objeto e lugar (Gilbert & Kesner, 2003).

Atualmente, a sub-região CA3 dorsal não é vista como homogênea e as conexões de suas partes resultam em propriedades neurofisiológicas diferentes (Witter, 2007). A porção de CA3 a,b é a região mais próxima de CA2 e, diferentemente de CA3c, não está funcionalmente envolvida na detecção de mudanças métricas na localização do objeto (Hunsaker, Rosenberg, & Kesner, 2008). Schacter & Addis (2007) e Almeida, Idiart, & Lisman (2007) sugerem que a porção dorsal de CA3c está envolvido na formação e evocação de memórias espaciais, em conjunto com GD.



**Figura 3.** Representação do cérebro do rato mostrando vias perfurante medial e lateral e as sub-regiões hipocampais CA1, CA3 (ab) e (c) e Giro Denteado (Adaptado de Bizon & Gallagher, 2005).

De maneira geral, há uma rede associativa que permite a ligação de múltiplas entradas e desempenha um importante papel não só na codificação, mas também na recuperação de um padrão de atividade entre CA3, principalmente CA3c, e GD (Hunsaker, Rosenberg & Kesner, 2008). Esse padrão acontece porque CA3 recebe

informações do GD, que atua diminuindo a interferência entre padrões similares de entrada nessa rede, ou seja, reduzindo a sobreposição entre os eventos espaciais similares (Palmer & Good, 2011).

O papel da separação de padrões existente entre o GD e CA3 é um processo essencial para a codificação episódica e o seu rompimento é central para déficits observados no envelhecimento patológico. Alterações funcionais e morfológicas observadas no GD são acompanhadas por deficiência de memória espacial e mudanças na plasticidade sináptica (Palmer & Good, 2011).

Os primeiros estudos realizados para a descoberta da Potenciação de Longa Duração (LTP)<sup>2</sup> e Depressão de Longa Duração (LTD)<sup>3</sup> (Bliss & Lømo, 1973) e a ideia de um sistema que trabalha em rede e atua através da reverberação, advinda dos trabalhos de Hebb em 1949, caracterizaram o processamento da memória como mudanças bioquímicas e morfológicas que marcam as transições temporais, de curto e longo prazo (McGaugh, 2000; Roesler et al., 2006).

Essas mudanças acontecem pela eficiência de comunicação entre o hipocampo e as áreas neocorticais e por alterações na liberação de neurotransmissores, em especial, a neurotransmissão glutamatérgica. Quando ativados, os receptores glutamatérgicos estabelecem relações com proteínas quinases, como a Cálcio-Calmodulina (CaMKII) quinase, a proteína quinase A (PKA) e CREB, que podem mediar a fase tardia da LTP e,

---

<sup>2</sup> Potenciação de longa duração (LTP) acontece a partir de estimulações elétricas aferentes repetidas que aumentam a excitabilidade neuronal e está envolvida nos mecanismos funcionais para estocagem de memória (Bliss & Lomo, 1973).

<sup>3</sup> Depressão de longa duração (LTD) é proposta como um mecanismo de esquecimento, envolvendo plasticidade sináptica, através da ativação de aferências a caminhos neurais específicos, produzindo decréscimo na excitabilidade (Bliss & Lomo, 1973).

consequentemente, envolver-se na consolidação da memória (McGaugh, 2000; Nakazawa, McHugh, Wilson, & Tonegawa, 2004; Roesler et al., 2006).

#### **1.4 Papel do sistema glutamatérgico na memória**

O sistema glutamatérgico está envolvido na formação da aprendizagem e da memória, participa dos processos LTP e LTD, da maturação neuronal e da sinaptogênese, exercendo a maior parte da atividade excitatória do Sistema Nervoso Central (SNC) através de dois tipos de receptores: metabotrópicos e ionotrópicos (Marmioli & Cavaletti, 2012; Niciu, Henter, Luckenbaugh, Zarate, & Charney, 2014).

O glutamato apresenta oito tipos de receptores metabotrópicos (mGluR), subdivididos em grupos de acordo com a similaridade na sequência de aminoácidos, a seletividade farmacológica e os mecanismos de transdução do sinal (Obrenovitch & Urenjak, 1997; Obrenovitch, Urenjak, Zilkha, & Jay, 2000). Os receptores ionotrópicos, por sua vez, são farmacologicamente classificados em três subtipos de acordo com a maior seletividade por seus ligantes específicos: o N-metil-D-aspartato (NMDA), o  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol ácido propiônico (AMPA) e o Cainato (KA) (Ahmadian et al., 2004; Marmioli & Cavaletti, 2012).

Os receptores NMDA são primariamente ativados por íons de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e, assim, respondem de maneira lenta ao sistema de correntes pós-sinápticas excitatórias. Esses canais iônicos são formados por proteínas heteroméricas que podem ser divididas nas subunidades NMDAR 1, NMDAR 2A-D e NMDAR 3A-B (Meldrum, 2000). Já o AMPA, subdividido em GLUR1, GLUR2, GLUR3 e GLUR4, e o Cainato apresentam canais permeáveis, inicialmente, aos íons de sódio ( $\text{Na}^+$ ) e potássio ( $\text{K}^+$ ), participando da neurotransmissão excitatória mais rápida do sistema glutamatérgico (Hollmann, Maron, & Heinemann, 1994; Ahmadian et al., 2004). O AMPA e NMDA estão envolvidos na

cognição e na plasticidade sináptica, mas contribuem de maneira diferente no processamento dessa neurotransmissão (Miyamoto, 2006; Rao & Finkbeiner, 2007).

Estudos sugerem que os receptores AMPA apresentam um importante papel na codificação inicial ou na aquisição de representação do objeto. Winters & Bussey (2005) demonstraram que a infusão do CNQX, antagonista AMPA, no perirrinal prejudica as tarefas de reconhecimento de objeto para intervalos curtos ou longos, de 5 minutos ou 3 horas. Antagonistas dos receptores AMPA bloqueiam a codificação e a recuperação do “*object-in-place*” (objeto no lugar) (Barker & Warburton, 2013).

Dentre os três tipos de receptores glutamatérgicos ionotrópicos, o NMDA é mais estudado por implicações em doenças do SNC (Newcomer & Krystal, 2001) e é o que possui maior afinidade pelo glutamato (Waxman & Lynch, 2005). Seu envolvimento na plasticidade sináptica é investigado há mais de 20 anos (Collingridge, Kehl, & McLennan, 1983).

Antagonistas NMDA podem apresentar melhora ou prejudicar uma tarefa de reconhecimento de objetos (Puma & Bizot, 1998; Baker & Kim, 2002). A administração sistêmica de MK-801, antagonista não competitivo NMDA, prejudicou a aquisição e a consolidação no reconhecimento de objetos (de Lima, Laranja, Bromberg, Roesler, & Schröder, 2005). A infusão bilateral de AP5, antagonista clássico NMDA, no córtex perirrinal prejudicou a aquisição do reconhecimento de objetos em intervalos de longa retenção, como 3 ou 24 horas, mas não para intervalos curtos de tempo, de 5 ou 20 minutos (Winters & Bussey, 2005; Barker et al., 2006).

Os receptores NMDA no hipocampo estão envolvidos na codificação de tarefas com novidade espacial, para localização de objetos (Barker & Warburton, 2009), bem

como para tarefas que se apresentam danificadas para pacientes com Alzheimer, como as associativas do tipo “*object-in-place*” (Barker & Warburton, 2013).

A infusão de AP5 bilateral em CA3 prejudicou a realização de uma tarefa de reconhecimento em um novo ambiente (Lee & Kesner, 2002). Possivelmente, informações de localizações espaciais e de itens são projetadas para CA3 pela via perfurante medial e lateral. As informações visuais dos itens chegam pela via lateral e estão relacionadas a ativação de receptores opióides, já as informações espaciais relacionam-se a ativação de receptores NMDA, caracterizando a funcionalidade espacial desses receptores em CA3 (Hargreaves, Rao, Lee, & Knierim, 2005; Hunsaker, Lee & Kesner, 2008; Kesner et al., 2010; Palmer et al., 2014).

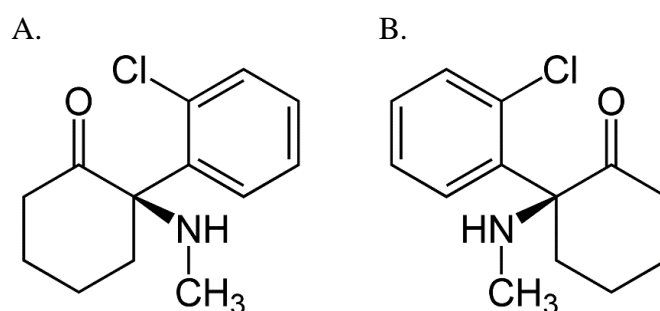
Os NMDAr estão amplamente distribuídos no cérebro, especialmente no neocórtex e hipocampo (Monaghan, Andaloro, & Skifter, 1998; Sakurai, Penney, & Young, 1993), notavelmente, baseando comprometimentos de memória episódica pela administração de baixas doses de seus antagonistas (Chrobak, Hinman, & Sabolek, 2008). Diferentes regiões corticais apresentam mecanismos de plasticidade particulares para os diferentes tipos de reconhecimento de objeto. De maneira geral, a neurotransmissão dos receptores AMPA e NMDA apresenta um papel importante na formação de vários tipos de memória no hipocampo e nas regiões para-hipocámpais (Warburton, Barker, & Brown, 2013).

### **1.5 Cetamina**

A Cetamina (2-[2-clorofenil]-2-[metilamino]-ciclohexanona) é um analgésico com propriedades dissociativas e psicodélicas, é derivada da fenciclidina e foi desenvolvida em 1962, no Laboratório Parke Davis, em busca de diminuir as reações adversas da fenciclidina (Riedel, Platt, & Micheau, 2003; Wolff & Winstock, 2012; Mion

& Villevieille, 2013). Durante os anos 60 e 70 a Cetamina ficou conhecida por seus efeitos anestésicos e por ser usada como droga recreativa (Morgan & Curran, 2012).

A meia vida da Cetamina é pequena, durando até 15 minutos, mas apresenta uma vida média de 1 à 3 horas, dependendo da via de administração (Mion & Villevieille, 2013). O produto comercial e utilizado na clínica é a mistura racêmica, na proporção 1:1, de dois isômeros, a partir de um centro quiral: o levogiro S-(+)-Cetamina e o dextrogiro R-(-)-Cetamina (Wolff & Winstock, 2012; Mion & Villevieille, 2013). A S-(+)-Cetamina é três vezes mais potente como analgésico e hipnótico do que o isômero dextrogiro e a mistura racêmica. O enantiômero R-(-)-Cetamina tem alta afinidade com receptores opioides e muscarínicos, caracterizando-se como mais alucinógeno (Adams, 1997).



**Figura 4.** Representação da estrutura química dos dois isômeros da Cetamina. A) Isômero S-(+)-Cetamina. B) Isômero R-(-)-Cetamina.

A S-(+)-Cetamina apresenta mais eficácia terapêutica, relacionada à anestesia, e menos efeitos adversos, como a redução da quantidade do acúmulo da substância, menos tempo para recuperação da performance cognitiva, comparada a mistura racêmica (Adams & Werner, 1997; Engelhardt, 1997). Esse isômero possui de quatro a cinco vezes mais afinidade ao complexo NMDA, no cérebro humano, do que o R-(-)-Cetamina (Durieux & Nietgen, 1997). Nesse caso, o antagonismo do receptor NMDA possivelmente medeia os efeitos analgésicos, dissociativos e neuroprotetivos

apresentados pela substância (Anis, Berry, Burton, & Lodge, 1983; Wolff & Winstock, 2012)

Quanto à neurofarmacologia, o mecanismo de ação da Cetamina é complexo pela sua estereosseletividade, ou seja, sua interação com vários tipos de receptores. Além do antagonismo NMDA, a Cetamina apresenta ligação com receptores AMPA, opióides, noradrenérgicos, serotonérgicos e colinérgicos muscarínicos (Nishimura & Sato, 1999; Abelson, Goldkuhl, Nylund, & Höglund, 2006; Maeng et al., 2008). Atualmente, ela é um dos poucos antagonistas NMDA disponíveis para sedação e anestesia (Li et al., 2010) e é utilizada para o tratamento da depressão na prática clínica (Liu et al., 2013).

Através do antagonismo não competitivo e obrigatório com o NMDAr, a Cetamina pode interferir na transmissão de aminoácidos excitatórios do SNC, como o glutamato e aspartato (Fagg, 1987; Harrison, Law, & Eastwood, 2003). Essa interferência bloqueia a potenciação de longa duração, que é um mecanismo essencial para a plasticidade sináptica (Harrison et al., 2003), e gera prejuízo cognitivo, como de atenção, fluência verbal, aprendizagem, memória de trabalho e memória episódica, que ainda não foram completamente elucidados (Wolff & Winstock, 2012; Morgan et al., 2014).

A Cetamina causa déficits específicos de memória explícita e implícita. Os danos de manipulação do conteúdo semântico e episódico vistos na condição aguda apresentam-se de maneira mais acentuada após exposição crônica (Honey et al., 2003; Morgan & Curran, 2006). Prejuízos de memória semântica e episódica em usuários de Cetamina permanecem três dias após o último uso comparados aos voluntários que não a usavam frequentemente. Logo, prejuízos cognitivos a longo prazo podem relacionar-se ao uso regular da substância (Adler, Goldberg, Malhotra, Pickar, & Breier, 1998). Ainda são necessários estudos sistematizados incluindo modelos pré-clínicos, para melhor

caracterizar o perfil da substância no desempenho cognitivo, buscando avaliar o comportamento e seus correlatos neuroanatômicos e neuroquímicos (Morgan & Curran, 2006).

Em doses sub-anestésicas a Cetamina não foi capaz de produzir déficits nas tarefas de esquiva passiva ou na recuperação da memória no labirinto em T em camundongos (Wang et al., 2006). Quando testada no labirinto aquático de Morris, a dose de 15 mg/kg da Cetamina não prejudicou a aquisição da navegação espacial em roedores quando a plataforma estava visível (Wesierska, Macias-Gonzalez, & Burešs, 1990). Em uma tarefa de esquiva ativa a Cetamina, em doses baixas, apresentou melhora na aquisição e evocação da memória (Getova & Doncheva, 2011). Outros estudos revelam que a Cetamina pode apresentar diferentes efeitos sobre a formação de aprendizagens e memórias não associativas, como memórias condicionadas ao sabor e ao medo (Aguado, Antonio, Pérez, Valle, & Gómez, 1994; Mickley et al., 1998; Mickley, Remmers-Roeber, Crouse, & Peluso, 2000).

Embora a maioria dos estudos apresentados acima apontem um efeito positivo na Cetamina na memória, e já se saiba seu papel na fase de aquisição (Bannerman, Rawlins, & Good, 2006; Moosavi, Yadollahi Khales, Rastegar, & Zarifkar, 2012), a maior parte dos efeitos da Cetamina é mediada pelo antagonismo NMDAr (Anis et al., 1983) que afeta o desempenho de roedores e primatas não humanos em tarefas que envolvem o hipocampo e o córtex pré-frontal (Newcomer & Krystal, 2001). Essa desregulação da comunicação entre as redes do neocórtex e do hipocampo provocada pela Cetamina (Canolty et al., 2006; Riedel et al., 2003) pode alterar a atividade glutamatérgica nessas áreas essenciais para as representações de eventos específicos com atrasos prolongados (Lee & Kesner, 2003; Chrobak et al., 2008).

Doses sub-anestésicas da Cetamina produzem déficits em tarefas de reconhecimento, de memória espacial e não espacial em roedores (Nikolaos Pitsikas & Boultsadakis, 2009; Boultsadakis & Pitsikas, 2011; Venâncio, Magalhães, Antunes, & Summavielle, 2011) e alteração em níveis moleculares de plasticidade no hipocampo (Garcia et al., 2008; Goulart et al., 2010; Duman, Li, Liu, Duric, & Aghajanian, 2012). De acordo com Pitsikas, Boultsadakis, & Sakellaridis (2008), o prejuízo gerado por doses agudas e sub-anestésicas de Cetamina abrangem a aquisição, a consolidação e evocação de informações espaciais e não espaciais.

No estudo de Goulart e colaboradores (2010), baixas doses de Cetamina (4 e 8 mg/kg) não prejudicaram a detecção de novidade em uma tarefa de reconhecimento de objetos, quatro horas após o treino. Entretanto, a dose mais alta (20 mg/kg) mostrou-se capaz danificar o desempenho na tarefa, possivelmente relacionado a redução dos níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no hipocampo, quando comparada às outras doses. Outro estudo também relacionou o baixo desempenho da aprendizagem e memória à diminuição da expressão dessa neurotrofina (Peng, Zhang, Zhang, Wang, & Ren, 2009; Peng, Zhang, Ren, Zhang, & Wang, 2010).

A administração aguda ou crônica da Cetamina age, principalmente, bloqueando o complexo NMDA (Kegeles et al., 2000) que pode influenciar a neurogênese hipocampal adulta (Nacher & McEwen, 2006). Por outro lado, o tratamento com Cetamina também já se mostrou capaz de aumentar a taxa de densidade do receptor AMPA (Tizabi, Bhatti, Manaye, Das, & Akinfiresoye, 2012). Esse aumento de atividade glutamatérgica através de receptores AMPA pode ser responsável por mediar a potenciação sináptica e a ativação de proteínas quinases que, subsequentemente, produzem genes imediatos e fatores neurotróficos, como o c-Fos e o BDNF, observados após exposição à droga (Niciu et al., 2014).

A expressão de genes imediatos é muito utilizada para avaliar efeitos de experiências sensoriais, como estimulações comportamentais e farmacológicas em diferentes circuitos e regiões cerebrais (Guzowski, Knierim, & Moser, 2004; Kubik, Miyashita, & Guzowski, 2007; Szakacs, Janka, & Kalman, 2012). A liberação de neurotransmissores no interior de um circuito neural pode levar à despolarização da célula e ao influxo de cálcio nos neurônios, desencadeando alterações celulares, como modificações pós transducionais ou a regulação da tradução do RNAm, que podem levar a produção de novas proteínas (Sutton & Schuman, 2006; Flavell & Greenberg, 2008).

Através da imuno-histoquímica, Fos pode ser expressa e revelada em uma marcação nuclear nos neurônios, para avaliar circunstâncias normais ou patológicas (Sagar, Sharp, & Curran, 1988). O proto-oncogene c-Fos é um dos marcadores mais comuns de plasticidade (Sagar et al., 1988; Peng et al., 2010) e pode ser expresso por estimulações externas e/ou internas, dos fatores de crescimento do cérebro ou ativação de neurotransmissores. Neste caso, a estimulação é mediada principalmente pela ação de receptores ionotrópicos glutamatérgicos e canais de membrana dependentes de voltagem (Greenberg, Ziff, & Greene, 1986; Herdegen & Leah, 1998).

A ativação de receptores glutamatérgicos seguida da despolarização da membrana, abertura dos Canais de Cálcio Dependentes de Voltagem (CCDV) e, conseqüentemente, do aumento do influxo de Cálcio na célula, ativam vias de sinalização que formam um complexo de fatores de transcrição entre proteínas, como as quinases, a CaRE e o CREB, controlando a expressão de um grande número de genes, incluindo c-Fos (Flavell & Greenberg, 2008).

A proteína Fos trabalha em conjunto com as proteínas da família Jun, no complexo de transcrição AP-1. Como esse complexo é crítico para respostas adaptativas, sua perda

pode originar déficits comportamentais adicionais (Brown et al., 1996). c-Fos é muito utilizado para marcação de neurônios recentemente ativados, uma vez que o aumento na transcrição não requer síntese de novas proteínas e sua expressão é transitória, começando em um intervalo de 5 minutos após estimulação e com um pico médio de 60 à 90 minutos (Flavell & Greenberg, 2008; Kinnavane, Albasser, & Aggleton, 2015).

Evidências recentes relacionam o armazenamento de informações ao crescimento de novas conexões sinápticas e a transcrição de c-Fos, que é considerado um marcador molecular de memória por apresentar um aumento prolongado após a aprendizagem (Fusi & Abbott, 2007). Estudos mostram um aumento da expressão de c-Fos no córtex pré-frontal (CPF), perirrinal e no hipocampo após tarefas de memória que envolvam medo condicionado, reconhecimento de objetos e de informações espaço-temporais, caracterizadas como episódios, (VanElzakker, Fevurly, Breindel, & Spencer, 2008; Aggleton, Brown, & Albasser, 2012; Albasser et al., 2013; Barbosa et al., 2013) indicando o funcionamento de diferentes redes neuronais na resolução dessas tarefas em roedores (Peng et al., 2009).

Receptores glutamatérgicos, principalmente o NMDA e o AMPA, são capazes de modular a expressão de c-Fos no cérebro de roedores (Greenberg & Ziff, 2001; Szakacs et al., 2012). A cetamina, antagonista não competitivo NMDA, causou diminuição na expressão de c-Fos, no hipocampo e na amígdala, após um protocolo de medo condicionado (Pietersen et al., 2006). A redução do desempenho da aprendizagem e da memória após a administração de Cetamina foi acompanhada pela diminuição da expressão de CREB e c-Fos no hipocampo de ratos. Possivelmente, os prejuízos de aprendizagem e memória estão relacionados à inibição da fosforilação de CREB e da transcrição de c-Fos pela administração da Cetamina (Peng et al., 2009, 2010).

Déficits de memória de trabalho após administração de Cetamina encontraram aumento significativo da expressão de c-Fos para as sub-regiões do hipocampo (CA1, CA3 e DG) de maneira dose-dependente e inversa, quanto maior a dose, menor a expressão de c-Fos (Imre, Fokkema, Boer, & Ter Horst, 2006). Os efeitos da administração da Cetamina no hipocampo ainda não estão bem estabelecidos quanto à relação do aumento ou bloqueio da expressão de IEGs, como c-Fos, e seu efeito na memória. As evidências sobre a ação da Cetamina são conflitantes e dependentes da dose administrada, do tipo de administração (aguda ou crônica) e do tipo de memória estudado (Ribeiro, Valentim, Rodrigues, Olsson, & Antunes, 2012).

Neste sentido, o objetivo desse estudo foi avaliar a administração aguda de doses sub-anestésicas da Cetamina na memória do tipo episódica e a ação tanto da estimulação comportamental como farmacológica na expressão de c-Fos em sub-regiões do hipocampo.

## 2. JUSTIFICATIVA

O hipocampo é uma das estruturas cerebrais envolvidas no processamento da memória episódica, principalmente por ter conexões em redes entre suas sub-regiões que integram elementos e contextos espaço-temporais específicos (DeVito & Eichenbaum, 2011; Eichenbaum et al., 2012; Barbosa et al., 2013; Dees & Kesner, 2013). Há poucos modelos animais descritos na literatura que permitem uma avaliação funcional do hipocampo e dos mecanismos neurais que estão envolvidos no processamento de aspectos cognitivos mais sutis, como a memória similar à episódica (Chrobak et al., 2008; Barbosa et al., 2012).

O sistema glutamatérgico e, especialmente, os receptores NMDA estão envolvidos na plasticidade sináptica e na consolidação de memórias (Riedel et al., 2003; Chrobak et al., 2008; Hunsaker & Kesner, 2013). A Cetamina é um antagonista não seletivo NMDA e tem sido apresentada como uma droga inovadora que induz efeitos plásticos no hipocampo de ratos (Pittenger, Sanacora, & Krystal, 2007; Garcia et al., 2008; Tizabi et al., 2012). Entretanto, essas questões ainda não estão bem estabelecidas (Ribeiro et al., 2012).

Neste sentido, a proposta de avaliar os efeitos comportamentais e neuroquímicos da administração aguda da Cetamina em uma tarefa de memória similar à episódica possibilitará avanços no campo da memória e sua relação plástica com o sistema glutamatérgico, especificamente em um tipo de memória que é bastante afetado em doenças neurodegenerativas, como a DA (Fouquet et al., 2010; Palmer & Good, 2011; Pause et al., 2013).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Investigar a administração aguda da Cetamina no processo de memória do tipo episódica e na plasticidade em ratos Wistar.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar os efeitos da administração aguda de doses subanestésicas da Cetamina em uma tarefa de memória similar à episódica para os parâmetros de distância total percorrida, velocidade, tempo total de exploração, taxa de exploração dos objetos e taxa de discriminação aos aspectos “onde”, “quando” e “integração”;
- Mensurar os aspectos neuroquímicos da administração aguda de doses subanestésicas da Cetamina através da quantificação de IEG (c-Fos) nas sub-regiões hipocâmpais CA1, CA3 (a,b), CA3c e Giro Denteado.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

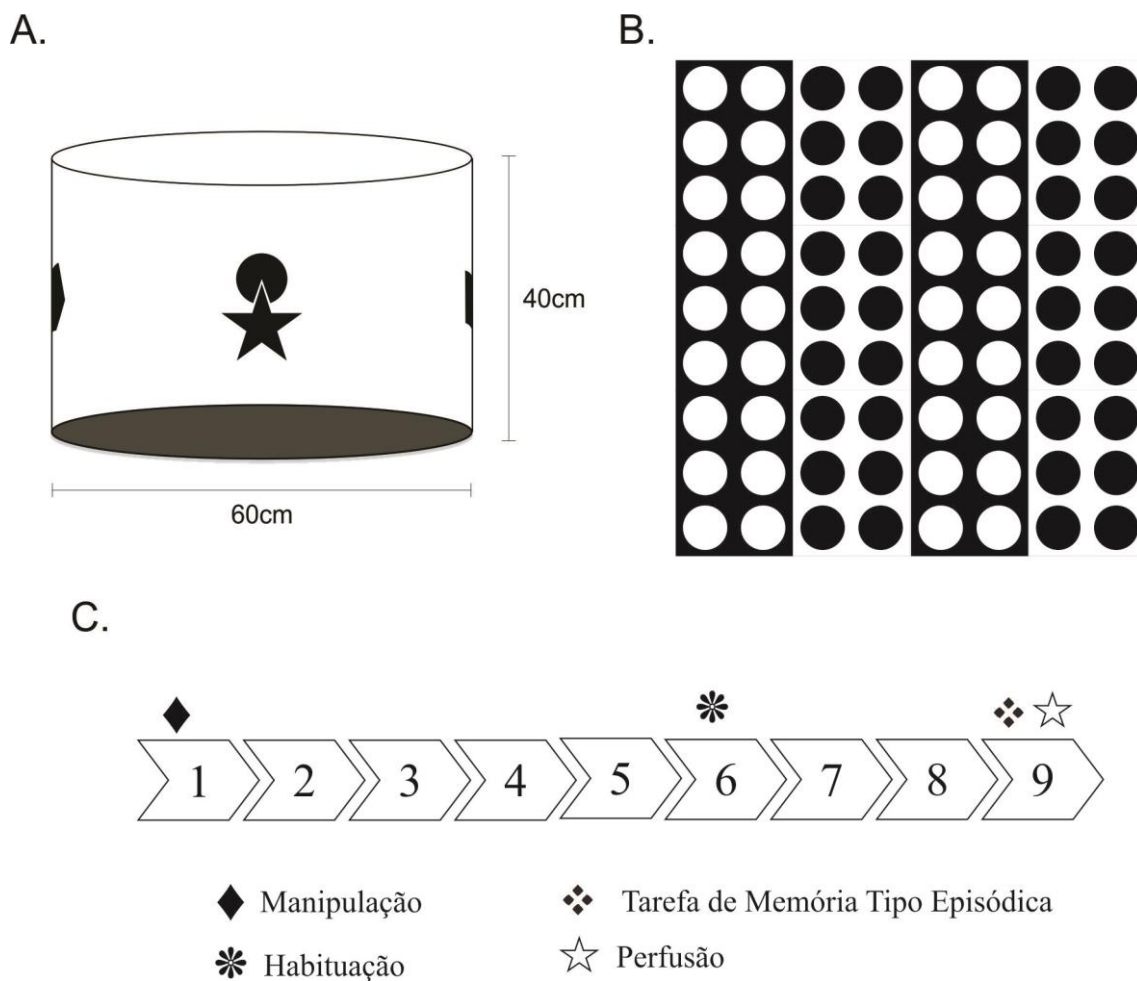
Foram utilizados 46 ratos Wistar machos, entre três e quatro meses, mantidos em uma sala com controle acústico, de umidade e temperatura ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Os ratos foram alojados em gaiolas plásticas que medem 30 cm de comprimento x 37 cm de largura e 16 cm de altura, em grupos de quatro por gaiola. Os animais foram submetidos a um ciclo claro-escuro de 12:12 h (com luzes acesas às 05:00h) e todas as tarefas foram realizadas na fase clara do ciclo, entre 12 h e 17 h. A luminosidade média durante a realização dos procedimentos experimentais foi de 40lux. Água e comida foram fornecidas *ad libitum*.

Os animais foram provenientes e mantidos no Biotério Prof. Dr. Thomas George do Centro de Ciências e Biotecnologia (CBioTec) na Universidade Federal da Paraíba, e todos os protocolos estavam de acordo com os princípios éticos e regidos pela Lei Arouca do uso de animais em pesquisa (nº 11.794/08) que buscam, sobretudo, o não sofrimento. A presente pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – da Universidade Federal da Paraíba (CEUA Nº 0102/14).

### 4.2 Delineamento experimental

Os procedimentos experimentais duraram nove dias (Figura 5C). Após completar os três meses de idade, todos os animais passaram pelo protocolo de manipulação, que os mantinham em contato com o experimentador por 15 minutos, durante cinco dias. Nos três dias seguintes, passaram por habituações ao campo aberto, em sessões diárias de 10 minutos. Nas sessões de habituação os ratos foram expostos a uma arena circular vazia, medindo 60 cm de diâmetro e 40 cm de altura, com pistas proximais localizadas em quatro pontos das paredes da arena (Figura 5A) e pistas distais localizadas na parede da sala, como representado na figura 5B. Essas pistas foram mantidas durante o experimento.

De acordo com procedimentos já realizados, os processos de manipulação e habituação são necessários (Kart-Teke et al., 2006; Barbosa et al., 2010). No nono dia, os animais realizaram a tarefa com baseada no protocolo (Kart-Teke et al., 2006). Todas as sessões foram gravadas através de uma webcam (modelo C270 HD, Logitech) pelo software Debut e os vídeos foram posteriormente analisados por dois softwares de rastreamento, o *Ethowatcher* (UFSC, Brasil) e *ANY-maze* (Stoelting, USA).



**Figura 5.** A. Campo aberto circular com pistas proximais. B. Pistas distais fixadas na parede da sala de experimento comportamental. C. Descrição do delineamento experimental

No experimento foram utilizados 6 modelos de objetos, com quatro cópias cada, sendo todos os modelos do mesmo material (plástico), mas com textura, cores e formas diferentes, mostrado na figura 6. Os objetos mediam de 5 a 15 cm de altura, com largura

de 5 a 10 cm, e estavam preenchidos, em seu interior, com gesso, para que os animais não deslocassem o objeto ao explorá-lo. Estudos pilotos do laboratório, não publicados, revelaram que não houve pré-preferência por nenhum objeto. Ao final de cada sessão, os objetos eram limpos com álcool (5%). O protocolo foi randomizado para os grupos, contrabalanceando as ordens de objetos e posições entre as sessões. Assim, todos os grupos foram apresentados a todos os objetos e todas as disposições espaciais.



**Figura 6:** Cópias dos seis objetos utilizados nas sessões experimentais.

### 4.3 Procedimentos experimentais

#### 4.3.1 Tarefa de memória do tipo episódica desenvolvida por Kart-Teke et al (2006).

A tarefa é composta de dois treinos e um teste em um campo aberto circular, com duração de cinco minutos cada e intervalo de uma hora entre eles. No primeiro treino foram dispostos quatro objetos iguais (A) e após 1 hora de intervalo foi feito o segundo treino com quatro objetos diferentes (B), destes, dois se mantiveram em coordenadas espaciais já ocupadas por objetos As no treino 1 e, dois foram localizados em coordenadas espaciais diferentes. Imediatamente após o treino, os animais receberam injeção (i.p.) de Cetamina ou Salina, de acordo com seus grupos. Na sessão de teste, 1 hora após o segundo treino, o animal foi colocado no campo aberto com quatro objetos, todos já apresentados,

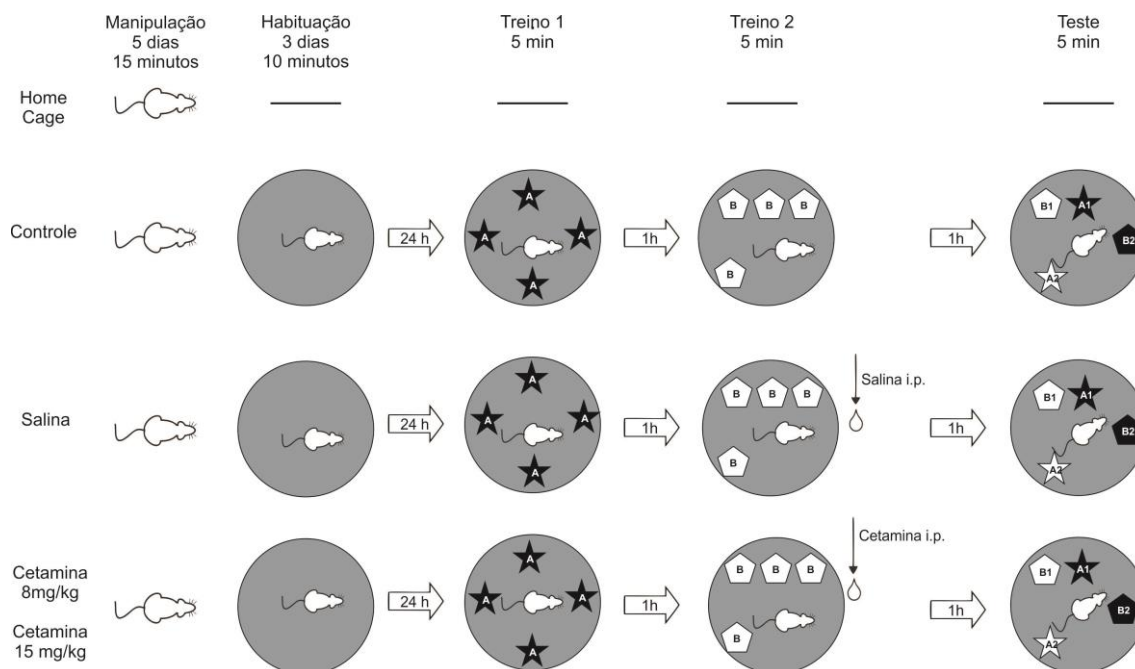
sendo dois recentes (B) e dois antigos (A) e, entre eles, dois foram deslocados (A2 e B2) e dois mantidos em posições estacionários (A1 e B1), apresentada na figura 8.

Como hipótese, esperava-se que os objetos antigos (A) fossem mais explorados em comparação aos recentes (B). Entre os recentes, os animais deveriam explorar mais o deslocado (B2) do que o não deslocado. Entre os antigos, o não-deslocado (A1) deveria ser mais explorado do que o deslocado (A2). A tarefa avalia os critérios comportamentais o quê, quando e onde através da característica natural dos roedores para detectar novidade em protocolos associativos que excluem a possibilidade da exploração dissociada entre os três aspectos (Gilbert, Kesner, & Lee, 2001; Kart-Teke et al., 2006).

#### **4.3.2 Tratamento farmacológico e Grupos**

O tratamento farmacológico foi procedido com Salina (0,9%) e Cetamina (Ketamina®, Anger União), em doses subanestésicas de 8mg/kg ou 15mg/kg, injetadas intraperitonealmente e de forma aguda. As doses utilizadas foram retiradas de protocolos anteriores (Garcia et al., 2008, 2009; Goulart et al., 2010; Moosavi et al., 2012). Todos os animais foram pesados antes da administração farmacológica para um controle da concentração e volume administrados.

Os 46 animais foram divididos em cinco grupos. O grupo *Home Cage* (HC) (n=6) foi escolhido como controle para a avaliação basal dos IEGs nas sub-regiões do hipocampo. O Grupo Controle (n=10) realizou o procedimento comportamental sem intervenção farmacológica, para avaliação da expressão de c-Fos nas sub-regiões do hipocampo apenas pela estimulação comportamental. O Grupo Salina (via i.p.; n=10), o grupo Cetamina 8 mg/kg (via i.p.; n=10) e o Grupo Cetamina 15 mg/kg (via i.p.; n=10), conforme mostra a figura 8.



**Figura 7:** Caracterização do protocolo experimental e dos grupos utilizados no estudo.

### 4.3.3 Perfusão dos animais e processamento do cérebro

Os animais foram anestesiados com tiopental (Thiopentax®, Cristália) (50 mg/kg). Com o animal completamente anestesiado e imobilizado, realizou-se um acesso à cavidade torácica seccionando-se a pele e expondo a cavidade abdominal para exposição do coração. Posteriormente, uma agulha foi inserida no ventrículo esquerdo com posição direcionada à aorta e, em seguida, foi feita uma pequena incisão no átrio direito. Um volume de 300 ml de solução salina 0,9%, em tampão fosfato 0,1 M e pH 7,4, foi injetado com auxílio de uma bomba peristáltica. Ao finalizar a salina, foram injetados 350 ml de solução de paraformaldeído a 4%.

Após a perfusão, os cérebros foram removidos através de craniotomia e mergulhados em uma mistura de solução fixadora de paraformaldeído com sacarose à 30% para a pós fixação. Após 24 horas, os cérebros foram colocados em uma solução de sacarose 30% para crioproteção. As secções foram obtidas por congelamento em um criostato de deslizamento, obtendo-se secções frontais de 30  $\mu$ m, as quais foram distribuídas sequencialmente em 4 compartimentos e armazenados em uma solução

anticongelante, à base de etilenoglicol e tampão fosfato, e conservados nela para posterior análise de reações de imunohistoquímica.

#### **4.3.4 Imunohistoquímica para c-Fos**

As secções de um compartimento de cada animal foram lavadas (4 vezes de 10 minutos) com tampão fosfato (PB) 0,1 M, pH 7,4, sob agitação automática, e pré-tratadas com peróxido de hidrogênio a 0,3% em PB por 20 minutos para inativação da peroxidase endógena. Os cortes foram colocados em contato com um anticorpo primário produzidos em coelho (1:1000; SC-52 - Santa Cruz *Biotechnology*, INC., Texas, USA) diluído em PB contendo Triton-X 100 a (*ICN Biomedicals*) 0,4% e de soro normal (*Sigma Chemical Company*) a 2% do animal em que foi obtido o anticorpo secundário, durante 18 a 24 horas (25°C). Em seguida, as secções foram colocadas em contato com o anticorpo secundário biotilado, cabra anti-coelho na concentração de 1:1000 (BA-1000, VECTASTAIN® ABC kits, *Vector laboratories*, CA, USA), diluído em Triton-X 100 a 0,4%, por 90 minutos.

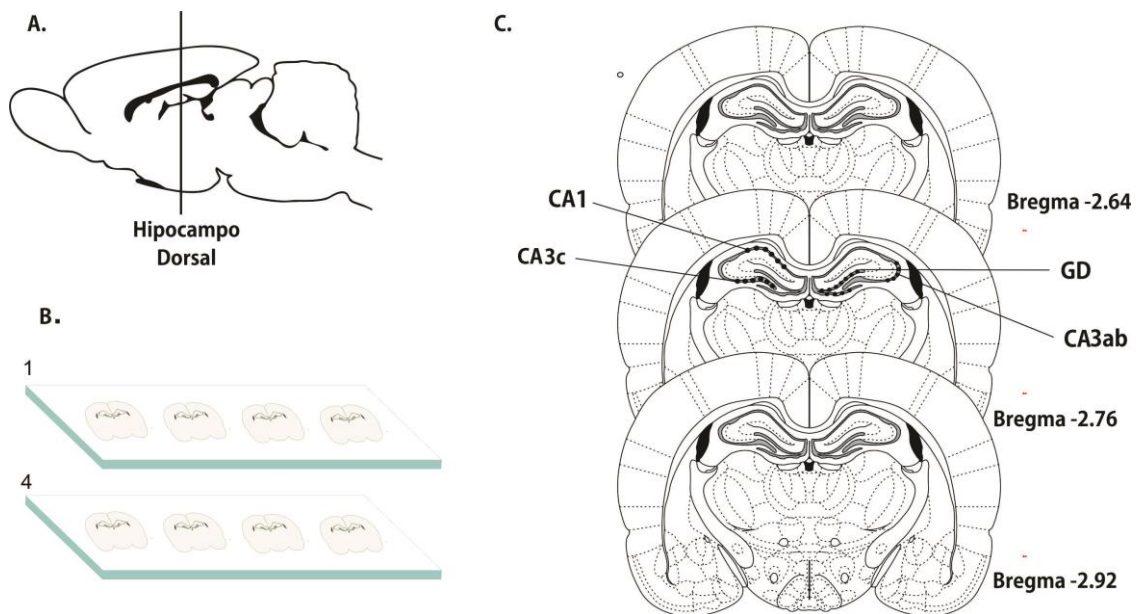
Após esta etapa, os cortes foram incubados numa solução contendo avidina e biotina (2% da solução total) mais Triton-X 100 NaCl, por 90 minutos. Para visualizar a reação, os cortes foram colocados em contato com um cromógeno, a diaminobenzidina (DAB) (*Sigma*, St Louis, MO, USA) a 2,5% diluída em PB (0,1M / pH 7,4). Entre cada uma das etapas foram realizadas cinco lavagens do tecido, de cinco minutos cada, com PB a 0,1 M e pH 7,4. Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas, secadas em temperatura ambiente, e posteriormente mergulhadas em uma solução de tetróxido de ósmio a 0,05%, por 30 segundos, para intensificação da reação.

A avaliação dos resultados imunohistoquímicos foi feita com o auxílio de um microscópio óptico (*Olympus*, BX-41) e as imagens foram digitalizadas utilizando uma câmera (*Nikon*, DXM-1200) acoplada ao microscópio e conectada a um computador.

Todas as imagens foram obtidas sem mudança na iluminação do microscópio. Além disso, não foram realizados ajustes de brilho e contrastes das fotos submetidas à análise.

#### 4.3.5 Contagem de células para c-Fos

Para cada animal analisado foram fotografadas imagens na objetiva de 10x. Nestas era possível ver em detalhes a presença ou a ausência de células nos tecidos. A contagem de célula foi realizada em 4 secções de cada animal e o número de células para cada um deles corresponde à média entre as 4 secções analisadas. As áreas analisadas foram CA1, CA3 (ab e c) e GD, no hipocampo dorsal. A delimitação da área foi realizada com base no atlas de Paxinos e Watson (2009) e está representada na figura 8. Todas as contagens foram realizadas de forma cega. Os valores para cada animal foram normalizados pela média dos valores obtidos nos animais pertencentes ao controle (*home cage*).



**Figura 8:** Esquema do procedimento histológico no cérebro dos animais. A) Visão sagital da região utilizada. B) Sequência média de cortes coronais. C) Organização dos cortes em lâminas.

#### 4.4 Procedimentos estatísticos

Através das saídas do *Ethowatcher* e *ANY-maze* foram coletados dados das análises de vídeo para as três sessões de habituação, as duas fases de treinos e a sessão teste. O uso do programa *Ethowatcher* permitiu que os vídeos fossem analisados de três em três frames. Após análise, os dados foram tabulados no software Excel e os procedimentos estatísticos realizados no programa SPSS para Windows, versão 21.0, considerando diferenças estatisticamente significativas para o valor de  $p < 0,05$ . Os resultados paramétricos foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e os não-paramétricos em mediana com seus intervalos interquartílicos. O programa *GPower 3.1* foi utilizado para calcular o tamanho do efeito e o poder dos testes (Faul, Erdfelder, Lang, & Buchner, 2007). Todos os gráficos foram desenhados no *Graphpad Prisma 6.0*.

##### 4.4.1 Medidas comportamentais

Nas três sessões de habituação os parâmetros observados foram: distância total percorrida, velocidade média e tempo de permanência nas zonas externas e internas. Para as duas primeiras medidas, após teste de normalidade, foi realizada uma ANOVA [3x4] para medidas repetidas. Como forma de comparar o tempo de permanência de todos os grupos para as duas zonas nas três sessões de habituação, foi realizada uma ANOVA [2x3x4] para medidas repetidas.

Entre as sessões de treino e teste foram analisadas a distância total percorrida, velocidade média e o tempo total de exploração dos objetos através de uma ANOVA [3x4] para medidas repetidas. A exploração foi computada quando o animal aproximava-se de um objeto e realizava, ativamente, contato físico com ele. O ato de subir no objeto ou apoiar-se no mesmo não foi computado como exploração, bem como o tocar o objeto sem tê-lo como foco de visão. Também foi realizado o *post hoc* de *Bonferroni* para os dados acima citados que apresentaram diferenças e interações entre os fatores.

Na sessão de teste, além do tempo total de exploração, foi calculada a taxa de exploração para cada objeto (exemplo: tempo de exploração do objeto/ tempo total de exploração dos objetos) e a taxa de discriminação entre os objetos (exemplo: tempo de exploração do objeto antigo não deslocado – tempo de exploração do objeto antigo deslocado/ tempo de exploração do objeto antigo não deslocado + tempo de exploração do objeto antigo deslocado).

De acordo com o *Shapiro-Wilk*, as taxas de exploração na sessão de teste não cumpriram o critério de normalidade e foram analisadas através da estatística não-paramétrica. Para análise da hipótese dos três critérios comportamentais da memória tipo episódica, foi realizada uma análise programada *à priori*, através do *Wilcoxon* que comparou os pares de objetos antigos deslocados e não deslocados (A1 e A2), os recentes deslocados e não deslocados (B1 e B2) e entre o antigo não deslocado e o recente não deslocado (A1xB1).

As taxas de discriminação à novidade calculada para os critérios “quando”, “onde” e de “integração” apresentaram normalidade e foram analisadas através de uma ANOVA de uma via para cada uma das taxas nos quatro grupos, bem como uma comparação das taxas ao acaso, através do Teste-*t* de uma amostra.

#### **4.4.2 Medidas histológicas**

Após separar as fotos para cada sub-região do hipocampo, foi realizada a contagem do número de células marcadas. A amostragem utilizada foi inicialmente normalizada pelo controle HC. A ANOVA de 1 via comparou a quantidade de c-Fos entre os grupos em cada sub-região do hipocampo. O *post hoc Tukey HSD* fez as comparações entre grupos para o número de células positivas para c-Fos dentro de cada região. Apesar dos dados apresentarem normalidade, o critério de homocedasticidade não foi cumprido em todos os casos. Nestes, os resultados apresentados referem-se ao teste de *Welch*, opção

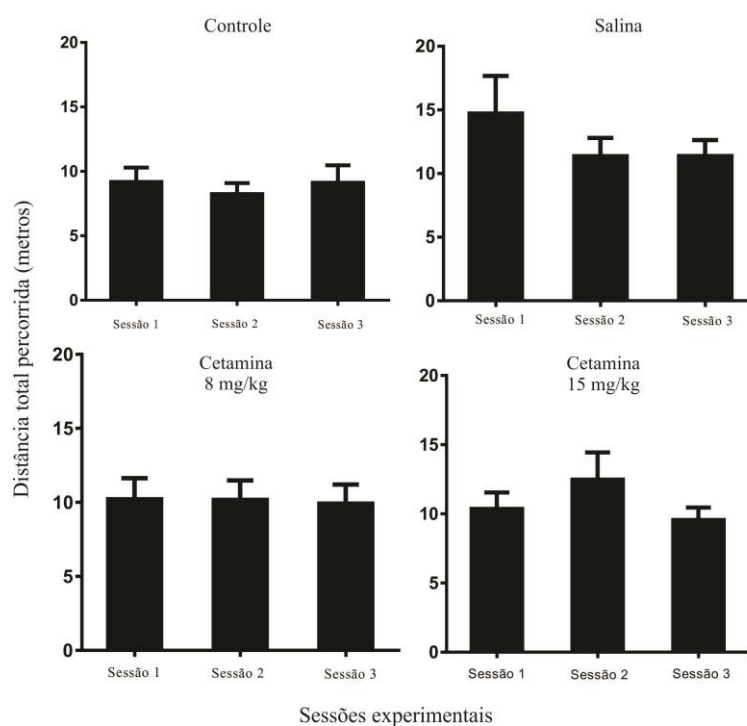
apresentada com menor taxa de erro do tipo II nessas condições. As comparações à posteriori foram realizadas pelo *post hoc Games-Howel*.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Parâmetros comportamentais

#### 5.1.1 Habituação

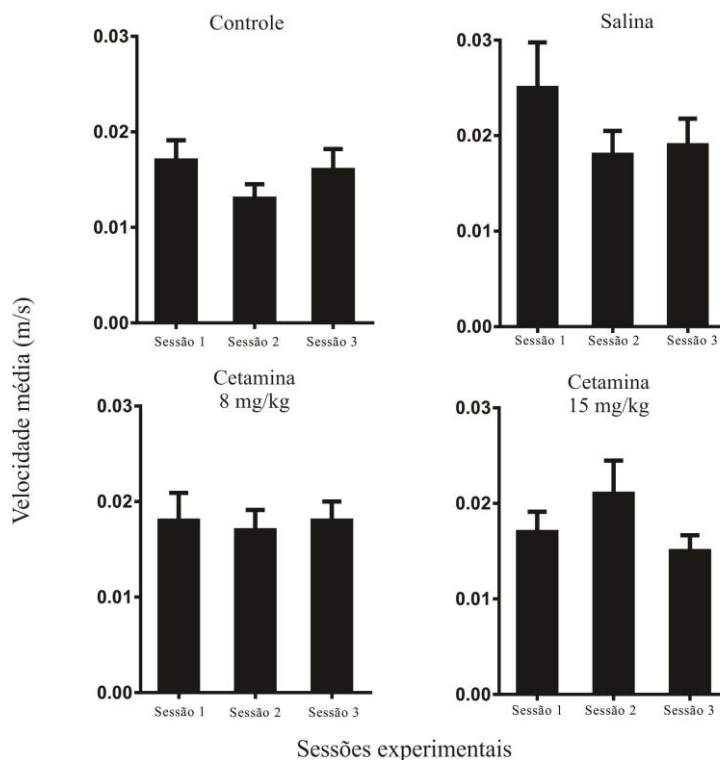
A distância total percorrida pelos animais foi analisada nas três sessões de habituação. A ANOVA [3x4] para medidas repetidas não mostrou diferença na distância percorrida entre as três “sessões” [F(2,72): 0,861;  $p = 0,427$ ]. Como visto na figura 9, não houve diferença entre os “grupos” [F(3,36): 1,728  $p = 0,179$ ], bem como interação entre esses nas sessões [F(6,72): 1,149;  $p = 0,343$ ].



**Figura 9.** Resultados da distância total percorrida nas três sessões de habituação. Os gráficos mostram o desempenho dos grupos entre as sessões através da média  $\pm$  Erro Padrão da Média.

A velocidade percorrida (m/s) também foi analisada nas três sessões de habituação por uma ANOVA [3x4] para medidas repetidas e esses resultados estão representados na figura 10. Não houve diferença significativa da velocidade entre as três sessões de habituação [F(2,72): 0,898;  $p = 0,412$ ;  $\eta = 0,024$ ,  $r=0,2$ ], bem como diferença entre os grupos ou interação entre os fatores “grupo e sessão”, [F(3,36): 1,728  $p = 0,179$ ;  $\eta =$

0,126,  $r=0,4$ ] [ $F(6,72)$ : 1,163;  $p = 0,336$ ;  $\eta = 0,088$ ,  $r=0,4$ ], respectivamente. Esse resultado era esperado, uma vez que as substâncias foram administradas de forma aguda durante a tarefa episódica.



**Figura 10.** Resultados da velocidade média percorrida entre os grupos três sessões de habituação. Os gráficos mostram o desempenho através da média  $\pm$  EPM.

Uma ANOVA [2x3x4] para medidas repetidas revelou as diferenças entre o tempo de permanência nas zonas externa e interna [ $F(1,36) = 46,791$ ,  $p=0,001$ ] entre as três “sessões” [ $F(2,72) = 107,07$ ,  $p= 0,001$ ]. Entretanto, essa relação independe do fator “grupo” [ $F(3,36) = 1,102$ ,  $p=0,361$ ], uma vez que não houve interação entre os fatores “sessões x grupos” [ $F(6,72) = 0,394$   $p=0,880$ ], “zonas x grupos” [ $F(3,36) = 0,466$ ,  $p=0,708$ ] e “zonas x grupos x sessões” [ $F(6,72) = 1,305$ ,  $p=0,266$ ]. As interações significativas entre os fatores “zonas x sessões” [ $F(2,72) = 88,919$ ,  $p=0,001$ ] destacam-se no *post hoc Bonferroni* conforme descrito na tabela 1.

**Tabela 1.** Comparações entre o tempo de permanência nas zonas externa x interna nas três sessões de habituação

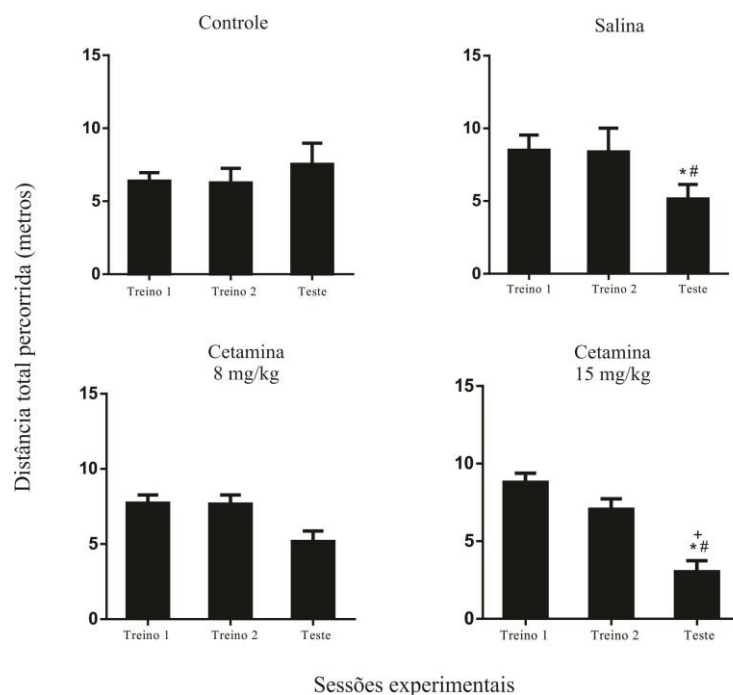
Sessão	Zona	Significância
<b>1</b>	Externa > Interna	P=0,013*
<b>2</b>	Externa > Interna	P=0,001*
<b>3</b>	Externa = Interna	P=0,185

### 5.1.2 Treinos e teste

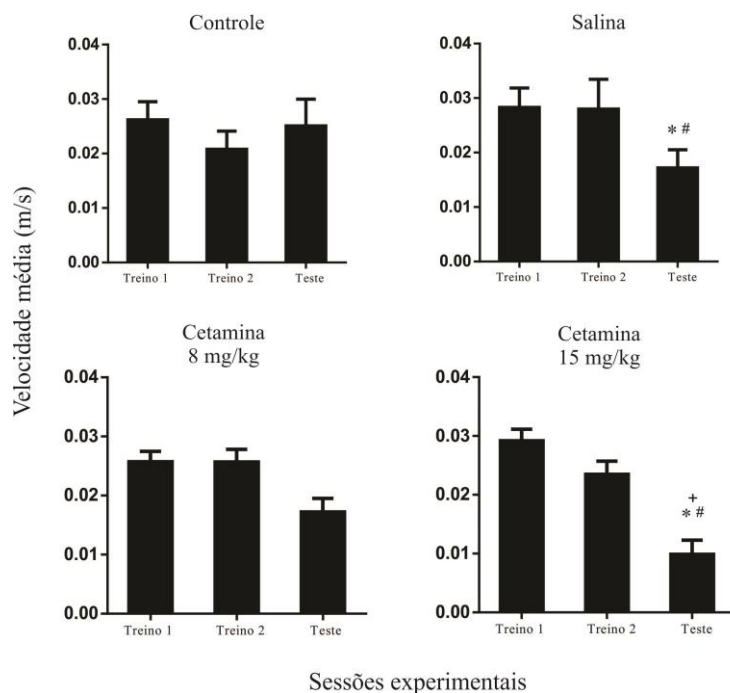
A distância total percorrida pelos animais foi analisada nos dois treinos e no teste através de uma ANOVA [3x4] para medidas repetidas. Para o fator “sessões” houve na diferença na distância percorrida [F(2,72): 11,394; p = 0,001] e apesar do fator “grupo” não caracterizar diferença estatisticamente significativa [F(3,36): 0,416 p = 0,743], houve interação entre os fatores “sessão x grupo”, [F(6,72): 3,524; p = 0,004]. De acordo com o *post hoc* de *Bonferroni*, apresentado na figura 11, a distância total percorrida apresentou-se estatisticamente diferente entre os grupos controle e Cetamina 15 mg/kg [p=0,02], analisando a sessão de teste. As interações estatisticamente significativas foram encontradas no grupo salina que teve uma maior distância percorrida para a sessão de treino 1 e treino 2 comparada à sessão de teste [p=0,017] e [p=0,041], respectivamente. O grupo Cetamina 15 mg/kg também apresentou uma redução na distância total percorrida comparando a sessão de teste aos treinos 1 [p=0,001] e 2 [p=0,008].

No parâmetro velocidade (m/s) entre as sessões, ao realizar a ANOVA [3x4] de medidas repetidas, o fator “sessões” apresentou diferenças estatisticamente significativas [F(2,72): 15,187; p = 0,001]. Ainda que as diferenças entre o fator “grupo” não tenham sido significativas [F(3,36): 0,445 p= 0,722], houve interação entre “sessão x grupo” [F(6,72): 3,070; p = 0,013]. A figura 12 mostra os resultados para o *post hoc* de *Bonferroni*. Na sessão de teste o grupo Cetamina 15 mg/kg apresentou uma redução da velocidade comparado ao grupo controle [p=0,019]. As interações caracterizaram-se para

as sessões de treino 1 e 2 quando comparadas ao teste tanto para o grupo salina [ $p=0,016$ ] [ $p=0,045$ ] quanto para o grupo Cetamina 15 mg/kg [ $p=0,001$ ] [ $p=0,008$ ].



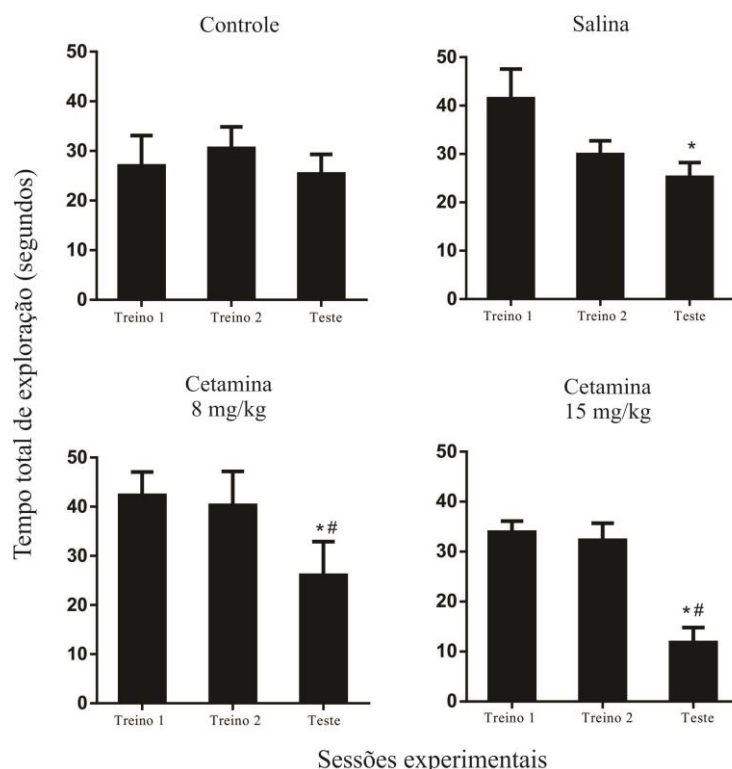
**Figura 11.** Distância total percorrida para os grupos controle, salina e Cetamina (8 e 15 mg/kg) entre as sessões de treino e teste. Os gráficos representam a média  $\pm$  EPM. + Comparações significativas entre as sessões de teste. \*Comparações significativas entre treino 1 e teste. # Comparações significativas entre treino 2 e teste.



**Figura 12.** Velocidade média (m/s) para os grupos controle, salina e Cetamina (8 e 15 mg/kg) entre as sessões de treino e teste. Os gráficos representam a média  $\pm$  EPM. + Comparações significativas entre as

sessões de teste. \*Comparações significativas entre treino 1 e teste. # Comparações significativas entre treino 2 e teste.

A análise do tempo total de exploração entre as sessões e os grupos, calculada pela ANOVA [3x4] para medidas repetidas, apresentou diferença estatisticamente significativa [F(2,72): 18,724;  $p = 0,001$ ], como mostra a figura 13, que não foi caracterizada por diferenças entre os grupos [F(3,36): 1,806  $p = 0,164$ ], mas pela interação entre “sessão x grupo” [F(6,72): 2,462;  $p=0,032$ ]. De acordo com o *post hoc* de *Bonferroni* as interações estatisticamente significativas apresentaram-se ao comparar as sessões de treino 1 e teste no grupo salina [ $p=0,008$ ], as sessões de treino 1 e 2 com a sessão de teste para o grupo Cetamina 8mg/kg [ $p=0,008$ ] [ $p=0,005$ ] e para o grupo Cetamina 15 mg/kg [ $p=0,001$ ]; [ $p=0,001$ ], respectivamente.



**Figura 13.** Tempo total de exploração nas sessões de treino e teste para os grupos controle, salina e Cetamina (8 e 15 mg/kg). Os gráficos representam a média  $\pm$  EPM. \*Comparações significativas entre treino 1 e teste. # Comparações significativas entre treino 2 e teste.

Os três parâmetros são caracterizados por interações entre as sessões e os grupos.

Há uma diminuição da distância total percorrida e da velocidade entre os grupos e as

sessões, especialmente entre a sessão de teste e os grupos que receberam administração farmacológica, de Cetamina ou de salina, mostrando uma possível influência da injeção e da substância. Para o tempo total de exploração, quando analisada a sessão de teste, os grupos com intervenção farmacológica não se distanciaram estatisticamente da média do grupo controle. Entretanto, as interações entre as sessões e os grupos mostraram que comparados ao controle, todos os outros grupos apresentaram uma redução na taxa de exploração dos objetos entre as fases de estudo e a fase de teste.

### 5.1.3 Taxas de exploração para Memória similar à episódica

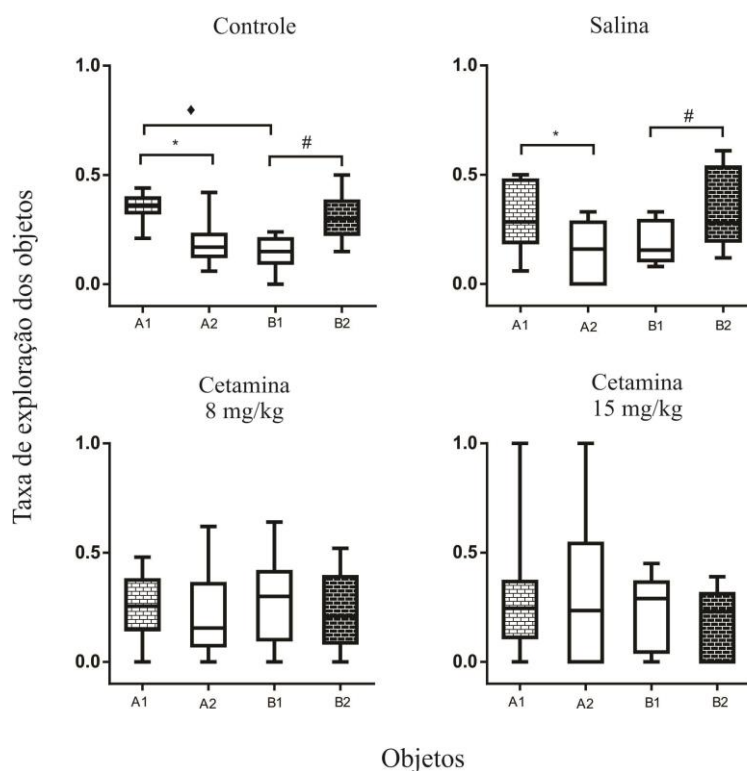
Para a análise da memória similar à episódica, foram calculadas taxas de exploração dos quatro objetos a partir do tempo total de exploração durante a sessão teste. Por exemplo, para calcular a taxa de exploração para o objeto antigo não deslocado,  $A1 = (\text{Tempo de exploração do objeto } A1) / (\text{Tempo total de exploração dos quatro objetos})$ .

De acordo com Kart-Teke e colaboradores (2006), o padrão de resultados para memória episódica acontece quando  $B2 > B1$  (aspecto espacial),  $A1 > B1$  (aspecto temporal) e  $A1 > A2$  (padrão invertido, aspecto integrador). Ao contrário dos outros parâmetros já apresentados, as taxas de exploração dos objetos na sessão de teste entre os grupos não cumpriram a normalidade. Assim, os dados foram analisados com testes não-paramétricos através da mediana e seus intervalos interquartílicos e apresentados como *box-plot* na figura 16. Comparações pareadas planejadas *à priori* foram realizadas pelo Wilcoxon entre os objetos ( $A1 \times A2$ ), ( $B1 \times B2$ ) e ( $A1 \times B1$ ) para cada grupo.

O grupo controle apresentou diferenças estatisticamente significativas para as três comparações,  $A1 \times A2$  [ $T = -2,807$ ;  $p=0,005$ ;  $d=1,8$ ;  $r=0,99$ ]  $B1 \times B2$  [ $T = -2,803$ ;  $p=0,005$ ;  $d=1,6$ ;  $r=0,99$ ]  $A1 \times B1$  [ $T = -2,810$ ;  $p=0,005$ ;  $d=3$ ;  $r=0,99$ ], declarando, assim, os três aspectos comportamentais requeridos para memória tipo episódica de maneira integrada.

O grupo salina manteve o mesmo padrão de resposta entre as comparações A1xA2 [T = -2,191; p=0,028; d=1,0; r=0,82] e B1xB2 [T = -2,191; p=0,028; d=0,9; r=0,74], mas apresentou apenas uma tendência estatística para o par de comparação temporal A1XB1 [T = -1,530; p=0,126; d=0,9; r=0,70].

Os grupos que receberam a Cetamina não seguiram o padrão de exploração requerido na memória tipo episódica. De acordo com o resultado do Wilcoxon, apresentados na figura 14, o grupo Cetamina 8 mg/kg não mostrou diferença para nenhuma das comparações pareadas A1xA2 [T = -0,612; p=0,541; d=0,1; r=0,05] B1xB2 [T = -0,561; p=0,575; d=0,1; r=0,07] A1XB1 [T = -0,357; p=0,721; d=0,1; r=0,06], bem como o grupo Cetamina 15 mg/kg, A1xA2 [T = -0,204; p=0,838; d=0,06; r=0,05] B1xB2 [T = -0,845; p=0,398; d=0,3; r=0,17] A1XB1 [T = -0,533; p=0,594; d=0,16; r=0,07], explorando os objetos ao acaso.

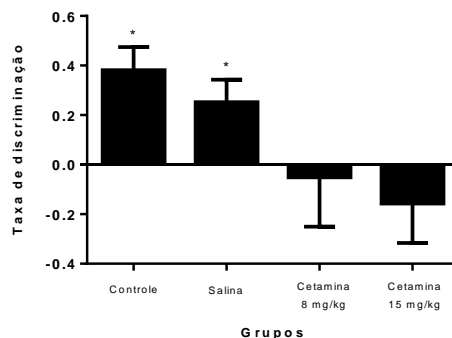


**Figura 14.** Taxa de exploração dos objetos na sessão de teste para os grupos controle, salina e Cetamina (8 e 15 mg/kg). Os gráficos representam a mediana e o intervalo interquartil. \*Comparações significativas entre os pares A1>A2. # Comparações significativas entre os pares B2>B1. ♦ Comparações significativas entre os pares A1>B1.

#### 5.1.4 Taxas de discriminação à novidade

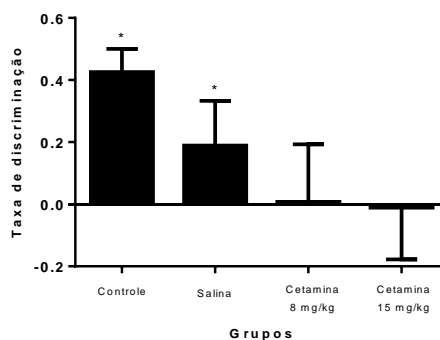
Também foram calculadas taxas de discriminação à novidade para os padrões temporal, espacial e de integração. Essas taxas apresentam relações entre o tempo de exploração de cada grupo e podem variar de -1 a +1, indicando se a exploração aconteceu ao acaso (quando se situa próximo de zero) ou se houve discriminação entre os objetos (quando o valor se afasta do zero). A análise do padrão espacial foi calculada pela relação entre a diferença da taxa de exploração do objeto recente deslocado e não deslocado dividido pela soma entre eles ( $B2-B1/B2+B1$ ). Para a análise do padrão temporal, a relação foi calculada entre a diferença da taxa de exploração do objeto antigo não deslocado e do recente não deslocado dividido pela soma entre eles ( $A1-B1/A1+B1$ ). A análise da interação entre os padrões se deu através da diferença da taxa de exploração do objeto antigo não deslocado e deslocado, dividido pela soma entre eles ( $A1-A2/A1+A2$ ) (Chao et al., 2014).

Pela ANOVA de uma via os grupos apresentaram diferença estatisticamente significativa na taxa de discriminação para o padrão espacial “onde” [ $F(3,36) = 3,075, p=0,04$ ]. O post hoc Bonferroni, mostrou apenas uma tendência do controle do grupo controle ser diferente do grupo Cetamina 15 mg/kg [ $p=0,072$ ]. As análises do Teste-*t* de uma amostra, comparando as taxas ao acaso, mostraram essas diferenças tanto no grupo controle quanto no grupo salina que se distanciaram do zero e, assim, discriminaram o padrão espacial requerido [ $t= -4,056, p=0,003$ ] e [ $t= -2,756, p=0,022$ ], respectivamente. O que não aconteceu para os grupos Cetamina 8 mg/kg [ $t= 0,256, p=0,804$ ] e 15 mg/kg [ $t= 0,979, p=0,353$ ], como mostra a figura 15.



**Figura 15.** Taxa de discriminação à novidade para o parâmetro “onde” entre os grupos controle, salina e Cetamina (8 e 15 mg/kg). O gráfico representa a média ± EPM. \*Comparações significativas em relação ao acaso.

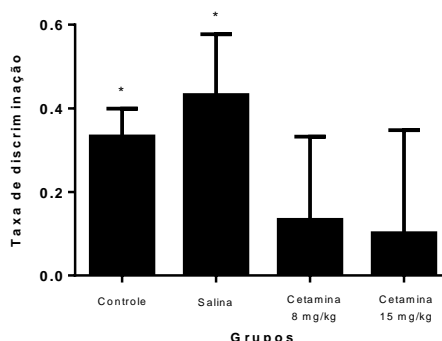
ANOVA de uma via para o padrão temporal “quando” não mostrou diferença entre os grupos [ $F(3,36) = 1,855, p = 0,155$ ]. As análises do Teste-*t* de uma amostra, comparando as taxas ao acaso, mostraram que o padrão espacial requerido na tarefa foi discriminado apenas pelo grupo controle [ $t = 5,657, p = 0,001$ ], figura 16. O grupo salina e os grupos Cetamina nas doses de 8 mg/kg e 15 mg/kg não apresentaram diferença [ $t = 1,321, p = 0,219$ ], [ $t = 0,038, p = 0,971$ ] e [ $t = -0,066, p = 0,949$ ], respectivamente.



**Figura 16.** Taxa de discriminação à novidade para o parâmetro “quando” entre os grupos controle, salina e Cetamina (8 e 15 mg/kg). O gráfico representa a média ± EPM. \*Comparações significativas em relação ao acaso.

A figura 17 mostra a taxa de integração (“o quê-onde-quando”), que foi comparada pela ANOVA de uma via entre os grupos e não apresentou diferença estatisticamente significativa [ $F(3,36) = 0,802, p = 0,501$ ]. As análises do Teste *t* de uma amostra apontaram que o grupo controle e o grupo salina discriminaram a integração entre os três elementos [ $t = 5,024, p = 0,001$ ] e [ $t = 2,966, p = 0,016$ ]. Entretanto, esse padrão de

integração não foi discriminado pelo grupo Cetamina 8 mg/kg [ $t= 0,674$ ,  $p=0,517$ ] e Cetamina 15 mg/kg [ $t= 0,410$ ,  $p=0,691$ ].



**Figura 17.** Taxa de discriminação à novidade para a integração “o quê-onde-quando” entre os grupos controle, salina e Cetamina (8 e 15 mg/kg). O gráfico representa a média  $\pm$  EPM. \*Comparações significativas em relação ao acaso.

## 5.2 Parâmetros histológicos

### 5.2.1 Contagem de células positivas de c-Fos

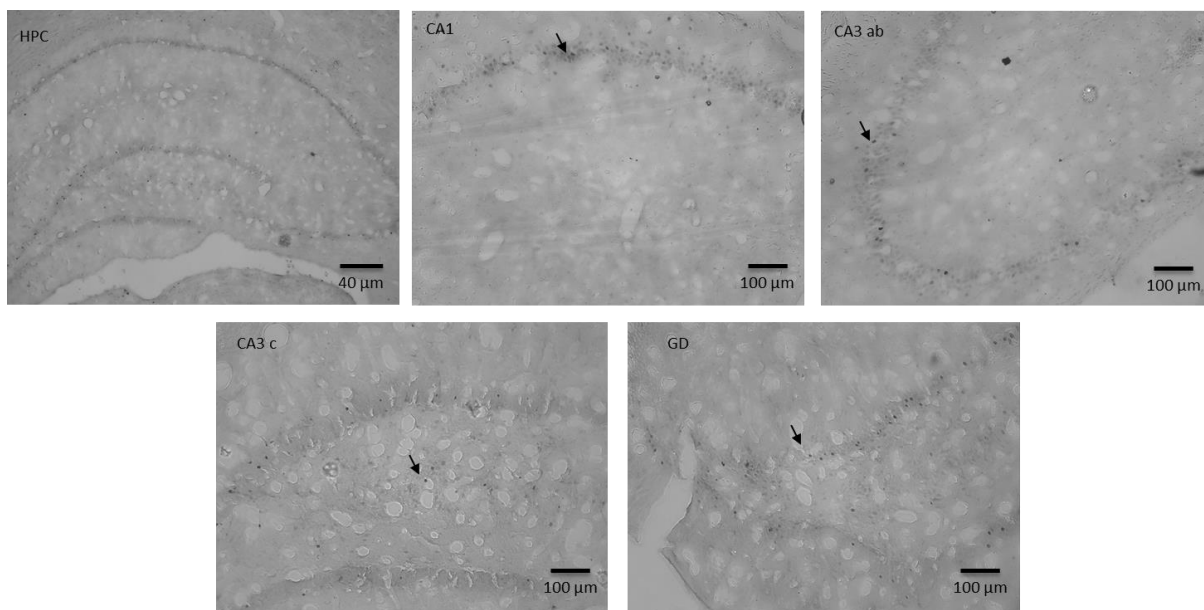
Foram realizadas quantificações do número de células marcadas para c-Fos nas áreas de CA1, CA3 (a, b e c) e GD em todos os grupos (Figura 18). Os dados nas regiões de CA1 e CA3(a,b) não cumpriram a premissa da homocedasticidade, assim, as comparações foram feitas através do Welch e o Games-Howel foi utilizado como teste *à posteriori*.

Na região de CA1 houve aumento estatisticamente significativo da expressão de c-Fos [Welch (33,936);  $p=0,002$ ] para os grupos que passaram pelo protocolo comportamental quando comparados ao *home cage* (Controle [ $p=0,05$ ], Salina [ $p=0,016$ ], Cetamina 8 mg/kg [ $p=0,019$ ], Cetamina 15 mg/kg [ $p=0,014$ ]). CA3 (a,b) apresentou diferença na expressão de c-Fos [Welch (89,466);  $p=0,001$ ], entretanto, o aumento de células de c-Fos apareceu apenas para os grupos Salina ( $p=0,04$ ) e Cetamina 15 mg/kg ( $p=0,001$ ) comparados ao *home cage*.

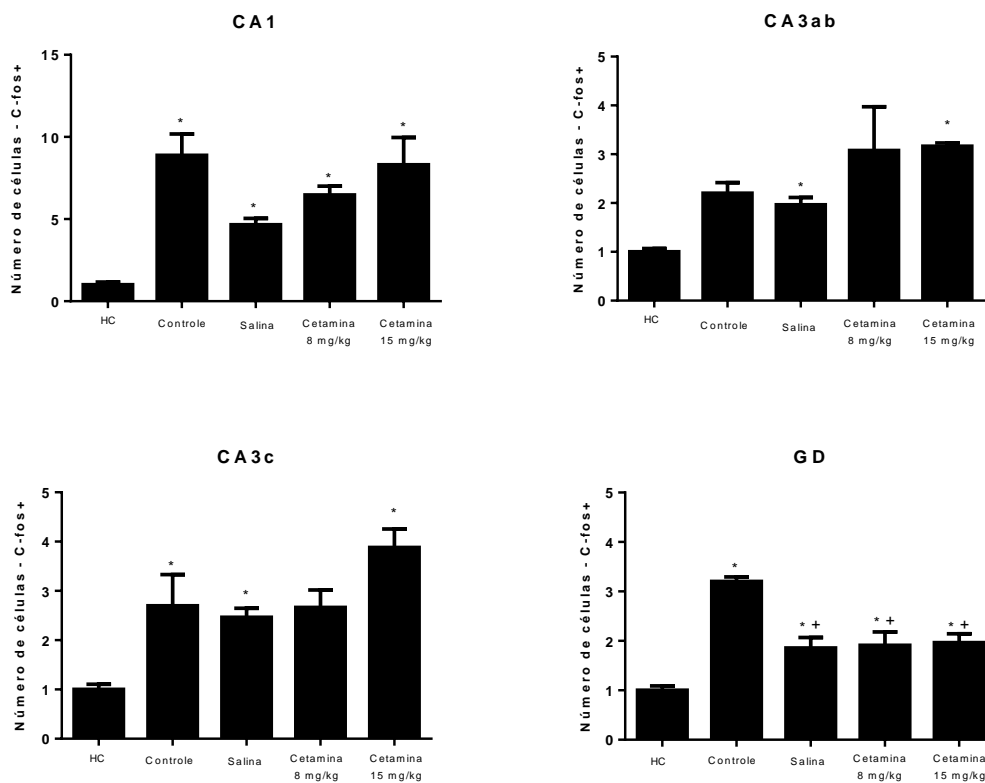
Para as regiões de CA3 c e GD, a ANOVA de uma via fez a comparação entre os grupos e foi utilizado o Tukey HSD como *post-hoc*. Houve um aumento do número de c-

Fos em CA3c [ $F=(4,14) = 7,369$ ,  $p=0,005$ ]. De acordo com o Tukey HSD, esse aumento mostrou-se estatisticamente significativo para comparações dos grupos controle [ $p = 0,05$ ], Cetamina 8 mg/kg [ $p=0,065$ ] e Cetamina 15 mg/kg [ $p=0,002$ ] com o HC.

Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos quanto ao número total de células c-Fos no GD [ $F(4,14) = 18,127$ ,  $p= 0,001$ ]. O Tukey HSD caracterizou um aumento estatisticamente significativo de c-Fos para todos os grupos comparados ao *home cage* (Controle [ $p = 0,001$ ], Salina [ $p=0,005$ ], Cetamina 8 mg/kg [ $p=0,037$ ] e Cetamina 15mg/kg [ $p=0,027$ ]). Dentre esses resultados, destaca-se o aumento da expressão de c-Fos para o grupo controle em relação ao Salina ( $p=0,003$ ), Cetamina 8 mg/kg ( $p=0,004$ ) e Cetamina 15 mg/kg ( $p = 0,005$ ), como representadas na figura 19.



**Figura 18:** Exemplos da expressão de células positivas para c-Fos no Hipocampo e nas suas sub-regiões de CA1, Ca3 ab, CA3 c e GD do grupo controle à 40  $\mu\text{m}$  e 100  $\mu\text{m}$ .



**Figura 19.** Número de células positivas para c-Fos nas regiões CA1, CA3(ab), CA3c e GD entre os grupos HC, controle, salina e Cetamina (8 e 15 mg/kg). O gráfico representa a média  $\pm$  EPM. \*Comparações significativas em relação ao HC. + Comparações significativas em relação ao grupo controle.

## 6. DISCUSSÃO

O subtipo episódico da memória refere-se à informação de contextos espaço-temporais de eventos específicos (Dere, Huston, & De Souza Silva, 2007; Barbosa et al., 2010; Fouquet et al., 2010; Davis et al., 2013). Estudos sugerem que os animais não apresentam evocação episódica (Tulving, 2001, 2002). Entretanto, baseado na hipótese de que os animais são naturalmente predispostos a explorar novidade (Barker, Bird, Alexander, & Warburton, 2007; Winters et al., 2008) foram desenvolvidos paradigmas que preenchem os critérios comportamentais para “o quê-onde-quando” através do reconhecimento de objetos (Dere et al., 2006; Kart-Teke et al., 2006; Dere et al., 2007). Esses, por sua vez, são mais rigorosos e adequados para determinar se uma espécie tem memória episódica, em comparação aos paradigmas associativos do tipo “o quê-onde” e “o quê-quando” (Eacott et al., 2005; Dere et al., 2006; Dere et al., 2007; Allen & Fortin, 2013)

Neste estudo, medimos a capacidade dos roedores de responder a uma tarefa que envolve o reconhecimento ao item em contextos espaço-temporais únicos. Por ser uma tarefa hipocampo dependente (Dere et al., 2007; Inostroza et al., 2013), apresenta-se como um dos melhores modelos pré-clínicos para se avaliar déficits comportamentais e propriedades neuroquímicas relacionados ao desenvolvimento normal ou patológico, como a Doença de Alzheimer (Kart-Teke et al., 2006; Palmer & Good, 2011). De acordo com Barbosa e colaboradores (2010), a administração pós-treino de uma droga amnésica, como a escopolamina, prejudica a discriminação espaço-temporal nessa tarefa episódica. Neste sentido, também avaliamos o efeito do tratamento agudo com doses sub-anestésicas de Cetamina pós-treino na memória similar à episódica.

No protocolo utilizado, a comparação A1 vs. A2 reflete a preferência baseada na mudança de lugar entre objetos antigos. Já a comparação entre os objetos B1 vs. B2

caracteriza uma mudança para novas informações espaciais e a comparação entre A1 e B1 reflete a preferência baseada na primazia e recência de ordem temporal (Kart-Teke et al., 2006; Dere et al., 2007; Li & Chao, 2008).

Nos nossos resultados, os animais do grupo controle atenderam aos critérios comportamentais, apresentando diferenças significativas na taxa de exploração de objetos antigos e novos, deslocados e não deslocados ( $A1 > A2$ ;  $B2 > B1$  e  $A1 > B1$ ). Os animais conseguiram distinguir temporalmente dois eventos similares, dois treinos que apresentam quatro cópias de dois tipos de objetos em seis localizações espaciais. Esses resultados corroboram estudos anteriores ao replicar a tarefa de memória similar à episódica, realizando o padrão de integração entre os pares de objetos (Chao et al., 2014; Inostroza et al., 2013). A integração dos três elementos episódicos não é aleatória, mas é vista de forma não linear, pois é representada pela inversão na preferência entre os objetos antigos, não deslocado e deslocado. Esse padrão só acontece quando os objetos das duas sessões são deslocados (Dere et al., 2005a; Kart-Teke et al., 2006).

É importante destacar que nosso protocolo replicou a tarefa episódica de Kart-Teke e colaboradores (2006) com pequenas modificações. O intervalo de tempo utilizado entre os treinos e teste foi modificado de 50 minutos para 1 hora. A arena utilizada no estudo original era quadrada, nosso estudo modificou para um campo circular, uma vez que roedores apresentam preferência por cantos, que poderia gerar uma interferência espacial (Eilam & Golani, 1989; Yaski & Eilam, 2007).

O grupo salina integrou os critérios comportamentais episódicos com diferenças significativas nas taxas de exploração e discriminação entre os pares de objetos antigos ( $A1 > A2$ ) e recentes ( $B2 > B1$ ). Entretanto, diferente do controle, apresentou apenas uma tendência para discriminar o aspecto temporal, comparando a ordem de apresentação dos objetos (A1 e B1). Essas diferenças comportamentais descritas podem relacionar-se à

administração do veículo imediatamente após o segundo treino. De fato, a injeção aguda de salina pode gerar estresse (Nagel & Huston, 1988) e ocasionar déficits de memória (Baker & Kim, 2002).

Uma injeção aguda pré-treino foi capaz de prejudicar o desempenho dos animais para todos os componentes da tarefa episódica. Essa administração pré-treino possivelmente causou interferência na aquisição e não favoreceu a memória (Dere et al., 2007; Kart-Teke et al., 2006). Quando foi administrado a DCS, agonista NMDA houve uma melhora da memória do tipo episódica, alterando o padrão apresentado pelos animais estressados pela injeção (Kart-Teke et al., 2006). Possivelmente, houve a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) associando o estímulo estressor, injeção do veículo, à liberação de hormônios do estresse (Roozendaal, 2002, p. 200).

No presente estudo, a administração do veículo pós-treino ocasionou um pequeno déficit apenas no componente temporal da tarefa, que não foi capaz de prejudicar a integração desse grupo para os outros elementos. Esse grupo também apresentou uma redução no tempo total de exploração na sessão de teste comparada ao primeiro treino. Há uma hipótese de que o estresse agudo modula a consolidação de memória nos animais (Czakoff, Johnson, & Howland, 2010) e pode determinar a força do traço de uma memória para o reconhecimento de objetos (Okuda, Roozendaal, & McGaugh, 2004; Roozendaal, McEwen, & Chattarji, 2009).

Nos dados apresentados, o evento estressor pós-treino pode ter influenciado no traço de memória que ainda estava sendo formado para a segunda sessão de treinamento e, assim, ter influenciado na tendência natural exploratória dos roedores na sessão de teste e, conseqüentemente, no reconhecimento do aspecto temporal. Entretanto, cabe ressaltar que existem poucos estudos sobre a influência direta do estresse agudo na consolidação

da memória que envolve o reconhecimento de objetos (Cazakoff et al., 2010) principalmente o episódico

A ação aguda da Cetamina pode afetar a função cognitiva, principalmente a aprendizagem e memória (Riedel et al., 2003; Chrobak et al., 2008; Pitsikas et al., 2008; Bouladakis & Pitsikas, 2011; Venâncio et al., 2011; Moosavi et al., 2012). No presente estudo, ratos Wistar que receberam doses sub-anestésicas e agudas da Cetamina pós-treino não apresentaram reconhecimento episódico. As taxas de exploração mostraram que nas duas doses os animais exploraram os objetos ao acaso (Figura 14). Possivelmente, a Cetamina bloqueou os processos de consolidação e evocação para item, espaço e contexto de forma integrada.

Nas duas doses testadas, a Cetamina reduziu o tempo total de exploração na sessão de teste. Essa redução do tempo de exploração, provavelmente, acarretou uma menor discriminação à novidade dos parâmetros “onde”, “quando” e para a integração (Figuras 15,16 e 17). O grupo da dose mais alta de Cetamina (15 mg/kg) também apresentou uma redução da distância total percorrida e da velocidade, na sessão de teste, que não foi apresentada por nenhum outro grupo. A redução da locomoção total é um parâmetro que pode ser alterado por fármacos (Prut & Belzung, 2003). Como não foi visto efeito de grupo durante as sessões de habituação para o tempo de permanência nas zonas, a redução dos parâmetros locomotores está presumivelmente ligada à administração da Cetamina pós-treino, de forma dose-dependente (Imre et al., 2006), e não à falta de habituação dos animais à arena, que poderia ser um fator ansiogênico e reduzir a exploração.

Cabe ressaltar que a Cetamina possui diferentes efeitos advindos da sua estereosseletividade, ou seja, da relação de seus isômeros com diferentes sistemas de neurotransmissão (Mion & Villeveille, 2013). De acordo com Prut et al (2003), a diminuição na atividade tanto vertical quanto horizontal dos animais no campo aberto

relaciona-se à sedação. Nos nossos dados, a Cetamina na dose de 15 mg/kg apresentou hipolocomoção e redução da velocidade média, caracterizando sedação. Esse efeito sedativo pode ser mediado pela capacidade analgésica da substância, fortemente relacionado ao isômero S-(+)- Cetamina (Oye, Paulsen, & Maurset, 1992).

O efeito inibidor demonstrado nos nossos dados está de acordo com estudos anteriores que mostram uma redução nos níveis extracelulares de glutamato após uma dose de Cetamina (Moghaddam & Bolinao, 1994). Entretanto, a hipolocomoção na dose mais alta que testamos vai de encontro a grande maioria dos estudos que classificam a atividade locomotora após administração da Cetamina como dose-dependente, sendo quanto maior a dose, maior a locomoção. Esses estudos apresentam a Cetamina como possível modelo que mimetiza a esquizofrenia através de um parâmetro clássico, a hiperlocomção (Lahti, Koffel, LaPorte, & Tamminga, 1995; Kegeles et al., 2000; Umbricht D et al., 2000; Nikiforuk et al., 2013). Além de levantar uma hipótese sobre o papel dos receptores NMDA na esquizofrenia (Akbarian et al., 1996; Coyle, 1996).

A Cetamina também é conhecida por apresentar um efeito neuroprotetor (Gonzales, Loeb, Reichard, & Irvine, 1995; Himmelseher, Pfenninger, & Georgieff, 1996; Himmelseher, Pfenninger, Kochs, & Auchter, 2000; Kose, Bakar, Ayva, Kilinc, & Apan, 2012). Entretanto, estudos ainda se contrapõem em relação aos efeitos causado por seus enantiômeros de forma separada ou pela mistura racêmica (Reich & Silvay, 1989; Yan & Jiang, 2014). Possivelmente, os efeitos neuroprotetores acontecem pela administração da S(+) e da mistura racêmica através da inibição da síntese de óxido nítrico, que quando ativo poderia levar a uma maior ativação glutamatérgica. A hiperestimulação de NMDAr aumenta o influxo de cálcio, gerando uma atividade excitotóxica da substância (Di Maio, Mastroberardino, Hu, Montero, & Greenamyre, 2011; Kose et al., 2012). Segundo(Yan & Jiang, 2014), os efeitos neuroprotetores e

neurotóxicos da Cetamina variam em função da frequência de exposição e da dose administrada.

Sabe-se que o aumento de glutamato pode levar à excitotoxicidade e a morte celular (Choi, 1988; Pittenger et al., 2007). Outros estudos já caracterizaram a Cetamina como capaz de causar neurotoxicidade em cachorros (Gomes, Garcia, Ribamar Jr, & Nascimento, 2011), coelhos (Vranken et al., 2006), no hipocampo de ratos (Lees, 1987), além induzir morte celular em macacos (Slikker et al., 2007) e danos neurais em roedores (F. Liu et al., 2013). Esses danos podem acarretar neurodenegação e várias patologias neurológicas, como o Parkinson, Huntington e a DA, que deixam sequelas cognitivas (Jansen, Faull, Dragunow, & Synek, 1990; Mion & Villeveille, 2013).

O isômero R(-) possui alta afinidade com receptores opióides e muscarínicos (Kienbaum, Heuter, Pavlakovic, Michel, & Peters, 2001). A Cetamina presumivelmente envolve-se de maneira direta com o sistema neurotransmissão colinérgica para mimetizar modelos de esquizofrenia, uma vez que esse sistema é um alvo potencial para o tratamento de sintomas negativos da doença (Shekhar et al., 2008; Smith et al., 2009). Neste sentido, a Cetamina pode interagir de maneira indireta com o sistema colinérgico e interferir na modulação funções cognitivas, incluindo atenção e processamento de aprendizagem e memória (Everitt & Robbins, 1997).

Cabe ressaltar uma importante vantagem de o nosso protocolo ter utilizado administração aguda. De forma crônica, dose sub-anestésicas de Cetamina causou prejuízo no armazenamento e na recuperação de reconhecimento de objetos (Boultadakis & Pitsikas, 2011). Em doses sub-anestésicas (10mg/kg) administrada de maneira crônica, a Cetamina mostrou-se capaz de reduzir a habituação dos roedores além de prejudicar a capacidade da utilização de pistas espaciais (Venâncio et al., 2011). Já se sabe que ratos são sensíveis à mudança de localização espacial de objetos (Legutko, Li, & Skolnick,

2001; Jourdi et al., 2009). Assim, esse prejuízo visual pode estar relacionado à modulação de receptores opióides pela Cetamina.

Esse tipo de receptor encontra-se presente no hipocampo (Derrick, Weinberger, & Martinez, 1991; Wimpey & Chavkin, 1991; McGaugh, 2000) e pode modular a memória pela entrada de informações no GD através da via perfurante. O processamento de entrada na via perfurante é dividido em duas porções: a porção medial que processa informações espaciais e está relacionada à ativação de receptores NMDA e a porção lateral, que é responsável pela entrada de informações sensoriais visuais através da ativação de receptores opióides (Dees & Kesner, 2013).

Neste sentido, a ação da Cetamina nos receptores opióides pode ter prejudicado a habilidade dos ratos de localizar-se espacialmente através das pistas distais e proximais nas duas doses do nosso estudo (8 e 15 mg/kg), rompendo o aspecto espacial da memória episódica. Entretanto, essa perda de localização espacial não foi vista quando a dose de 15 mg/kg administrada de forma aguda foi testada para a consolidação de uma memória no labirinto aquático de Morris em ratos (Moosavi et al., 2012). Sugere-se que essa modulação da memória espacial pela Cetamina também depende do tipo de protocolo utilizado (Ribeiro et al., 2012).

A alta afinidade do enantiômero S(+) pelo complexo NMDA (Durieux & Nietgen, 1997; Vollenweider, Leenders, Øye, Hell, & Angst, 1997) aponta que o antagonismo não seletivo ao NMDAr está associado não só aos efeitos analgésicos, dissociativos e neuroprotetivos apresentados pela substância, como também medeia os efeitos cognitivos (Anis et al., 1983; Chrobak et al., 2008; Wolff & Winstock, 2012). Doses sub-anestésicas (4, 8 e 20 mg/kg) de Cetamina foram testadas em uma tarefa de reconhecimento de objetos e o desempenho dos animais foi dose-dependente, apresentando baixa discriminação entre os objetos para a dose mais alta (Goulart et al., 2010). Os nossos

dados comportamentais mostram que mesmo na dose de 8 mg/kg a Cetamina é amnésica para uma tarefa episódica. É importante destacar que esses resultados diferenciam-se de resultados anteriores porque requerem dos animais reconhecimento mais sutil e detalhado do que a simples recordação de um item.

A tarefa episódica também requer a participação do córtex pré-frontal (DeVito & Eichenbaum, 2010; Barbosa et al., 2013). Há muito tempo já se sabe que tarefas que são sensíveis à integridade do CPF geralmente são prejudicadas em doses sub-anestésicas de antagonistas NMDAr, incluindo a Cetamina (Hauber, 1993; Heale & Harley, 1990; Parada-Turska & Turski, 1990; Wesierska et al., 1990; Verma & Moghaddam, 1996). O aumento dos níveis excitatórios de glutamato e aspartato podem ativar a neurotransmissão glutamatérgica em receptores não-NMDA, o cainato e o AMPA (J. Liu & Moghaddam, 1995).

Alguns estudos apontam semelhanças de ação entre Cetamina e os agonistas AMPA (Legutko et al., 2001; Jourdi et al., 2009), confirmando uma possível ativação indireta dos receptores AMPA modulada pelo bloqueio não específico ao NMDA. Neste caso, a despolarização de receptores AMPA provocada pela Cetamina abre os CCDV desencadeando uma cascata de sinalização intracelular que inclui ativação de proteínas quinases e a transcrição de fatores neurotróficos (Niciu et al., 2014).

NMDAr são amplamente distribuídos no SNC, principalmente no hipocampo (Monaghan & Cotman, 1985). Como já foi destacado, o hipocampo é essencial para evitar interferências entre episódios com padrões similares (Holdstock et al., 2002; Malkova & Mishkin, 2003; Rolls & Kesner, 2006; Rolls, 2010; Barbosa et al., 2012), adquirindo e armazenando informações semelhantes de forma separada (Norman & O'Reilly, 2003) e suas sub-regiões desempenham diferentes funções para processar novas informações (Hunsaker & Kesner, 2013; Kesner et al., 2015).

Além de lesões (Kesner et al., 2015) e inativações (Barbosa et al., 2012), a avaliação funcional das áreas e de suas redes podem ser feitas através da expressão de genes imediatos (Kubik et al., 2007; Aggleton et al., 2012; Szakacs et al., 2012). Nosso estudo quantificou a expressão de c-Fos em sub-regiões do hipocampo dorsal (CA1, CA3ab, CA3c e GD) 1 hora após a realização da tarefa episódica. A análise dos IEGs, como c-Fos, apresenta o funcionamento de áreas do cérebro após ativação de um evento, em diferentes regiões neurais, buscando entender o perfil de estimulação (Guzowski et al., 2004; Kubik et al., 2007). Em tarefas de memória, o c-Fos é um marcador muito utilizado de plasticidade neuronal (Albasser et al., 2013; Albasser, Poirier, & Aggleton, 2010; Kinnavane et al., 2015).

Castilla-Ortega e colaboradores (2012) detectaram um aumento de c-Fos em CA1 após uma tarefa de memória episódica. Nos nossos dados, todos os grupos apresentaram aumento de células positivas para c-Fos na região de CA1 quando comparados ao grupo *home cage*. Possivelmente, o aumento observado no grupo controle corrobora estudos que apresentam essa sub-região como essencial para separação temporal de eventos sequenciais (Hoge & Kesner, 2007).

O grupo salina deste estudo apresentou uma quebra sutil no aspecto temporal da tarefa que possivelmente reduziu o número de células positivas para c-Fos nessa região. CA1 está envolvido na formação de um traço de memória forte para uma localização temporalmente mais antiga (Lee & Kesner, 2003; Hoge & Kesner, 2007). Lesões nessa região prejudicam a preferência pela primazia (V & Kesner, 1984; Brown & Aggleton, 2001). É importante destacar que essa redução da expressão de c-Fos, mesmo de maneira não significativa, pode ter relação ao evento estressor anterior à sessão de teste. Destacou-se também um aumento da expressão de c-Fos nos grupos Cetamina, entretanto, como esses grupos não apresentaram desempenho comportamental esperado, o aumento pode

estar mais relacionado ao amplo número de receptores NMDA nessa região do hipocampo (Monaghan & Cotman, 1985) do que a tarefa em si. O bloqueio NMDA realizado pela Cetamina pode, ao mesmo tempo, levar à ativação dos CCDV e de receptores AMPA, gerando influxo de cálcio necessário para transcrição de c-Fos (Flavell & Greenberg, 2008; Niciu et al., 2014).

Estimulações ambientais por si só podem causar o aumento de c-Fos no hipocampo (VanElzakker et al., 2008). Buscando controlar esse efeito, Barbosa e colaboradores (2013) avaliaram a expressão de c-Fos em dois grupos de ratos que passaram apenas pelo campo aberto circular e por um objeto comparados à dois outros grupos, que realizaram o reconhecimento padrão de objetos e a tarefa episódica. Esses resultados mostraram que ativação de c-Fos no hipocampo dorsal, córtex pré-frontal medial e no perirrinal não apresentam-se como consequência da exploração da arena e do objeto, mas sim dos itens, espaços e contextos requeridos nas tarefas. Como utilizamos o mesmo protocolo episódico, não fez-se necessário montar esse tipo de controle.

CA3 é caracterizado por ser uma estrutura chave no armazenamento da memória episódica (Vazdarjanova & Guzowski, 2004), sendo essencial para aprendizagem de rápidas associações arbitrárias entre pares (por exemplo: objeto e lugar) (Eichenbaum & Cohen, 2001). Entretanto, a maioria dos estudos avalia o papel de CA3 de forma e homogênea, seja por inativações, lesões ou pela a expressão de IEGs. Nestes casos, foi relatado aumento de c-Fos após tarefa com mudanças na localização de objetos, bem como para exploração de novidade (Albasser et al., 2010, 2013; Aggleton et al., 2012). Entretanto, esse aumento não foi visto 24 horas após a realização da tarefa episódica (Barbosa et al., 2013).

Alguns estudos caracterizam CA3 como uma estrutura heterogênea, baseada nas matrizes de conexões distintas que existem nessa região e que podem gerar diferentes

propriedades neurofisiológicas (Scharfman, 1997, 2007; Witter, 2007). Assim, a avaliação da região de CA3 foi feita com base em sua funcionalidade, separando a região de CA3ab de CA3c, uma vez que CA3c está aparentemente mais envolvido no processo de separação de padrões para detecção de mudanças espaciais (Hunsaker, Rosenberg, et al., 2008).

De fato, nossos dados apoiam a hipótese de modelos computacionais quanto à importância de CA3 na mediação de associações entre pares de estímulos arbitrários (Gilbert & Kesner, 2003; Rolls & Kesner, 2006), mas também indicam que CA3 é uma região heterogênea. O grupo controle não mostrou expressão significativa de c-Fos na região de CA3ab, reforçando a ideia de que essa região não é essencial para o processo de separação de padrões (Hunsaker, Rosenberg & Kesner, 2008) na integração episódica. Já para a região de CA3c tanto o grupo controle quanto o salina apresentaram aumento significativo de c-Fos. Neste caso, CA3c dorsal deve apresentar um papel no processamento da memória similar à episódica, possivelmente mediando a separação de padrões para mudanças geométricas no ambiente, mudanças métricas de distância entre objetos e mudanças de ordem temporal de apresentação dos objetos, uma vez a região de CA3 também processa informações temporais (Li & Chao, 2008).

Lesões eletrolíticas bilaterais na região de CA3 geram prejuízo na integração episódica, mas não em tarefas não associativas dos mesmos componentes (Li & Chao, 2008). De maneira geral, o aumento da expressão de c-Fos em CA3 ab e CA3 c para os grupos que receberam a Cetamina provavelmente deve-se à ação da substância com receptores opióides e NMDA na via perfurante. Um estudo anterior com infusão direta do antagonista NMDA APV em CA3 dorsal alterou os processos plásticos pela via perfurante medial e, quando um antagonista opióide, a naxazolona, foi infundida da mesma região, houve quebra de detecção à novidade para localização do objeto

relacionada à alteração dos processos mediados pela via perfurante lateral (Hunsaker, Moay, Swift & Kesner, 2007).

Seguindo os resultados de estudos de lesões em CA3 e no GD, que impediram roedores de detectar um objeto deslocado em uma arena familiar (Lee, Hunsaker, & Kesner, 2005) e danificaram a evocação de uma memória tipo episódica (Barbosa et al., 2012). A Cetamina agudamente nas duas doses foi capaz de prejudicar a memória tipo episódica e, ao mesmo tempo, causar um aumento da expressão de c-Fos nessas áreas comparada ao grupo *home cage*. Esse aumento não seletivo de c-Fos possivelmente prejudicou as projeções de células piramidais em CA3 para as células granulares no GD via fibras musgosas. Uma vez que essas células granulares não foram, em partes, inibidas não houve modulação da atividade do GD, que ortogonaliza a entrada de informações e, assim, reduz a interferência de padrões similares (Hunsaker, Rosenberg & Kesner, 2008).

A figura 18 B apresenta um exemplo do GD do grupo controle. 1 hora após a tarefa episódica houve um aumento de expressão de c-Fos nessa sub-região para todos os grupos comparado ao grupo *home cage* (Figura 19). Mas, cabe ressaltar que o grupo controle apresentou um maior número de células c-Fos, diferenciando-se dos demais grupos. A partir desses dados, reforçamos a hipótese de que o GD, e particularmente sua porção dorsal, é essencial para o processo de separação de padrões espaciais (Xavier, Oliveira-Filho, & Santos, 1999; Gilbert et al., 2001; Leutgeb et al., 2007; A. Treves, Tashiro, Witter, & Moser, 2008), estando, assim, envolvido na formação rápida da memória episódica (Lassalle, Bataille, & Halley, 2000; Barbosa et al., 2013)

O GD dorsal usa uma codificação espacial conjunta dominante da visão do objeto e de sua informação espacial, e um processo de codificação conjunta para, assim, diminuir a interferência no processo de separação de padrões. Essa codificação conjunta de informações no GD dorsal é o que permite ao GD conseguir realizar distinções métricas

(Dees & Kesner, 2013). O estudo de Hunsaker, Rosenberg & Kesner (2008), mostrou a importância dessa estrutura para distinções métricas de altas (54cm) e baixas (108 cm) interferências. Nosso grupo controle foi capaz de realiza distinções métricas ainda mais finas, uma vez que os pares de objetos diferentes, deslocados ou não, apareciam a grande maioria das vezes com uma distância de 15 cm entre eles. Neste caso, destaca-se um papel não só da relação métrica, mas também por serem dois tipos objetos apresentados em ordem temporal distinta.

Os resultados obtidos com o grupo controle corroboram os resultados encontrados por Barbosa e colaboradores (2013) quanto ao aumento de c-Fos em no GD após a realização da tarefa episódica. Esse padrão mostra-se importante na tarefa episódica porque lesões nessa sub-região podem alterar a capacidade de ratos de detectar alterações finais e métricas na localização dos objetos (Leutgeb et al., 2007; Hunsaker, Rosenberg, et al., 2008; Dees & Kesner, 2013; Kesner et al., 2015).

Dessa maneira, nossos dados indicam um possível padrão de redes neuronais na tarefa episódica que envolvem, principalmente a ativação do GD dorsal na capacidade de detecção fina à novidade, que foi danificada pela administração aguda da Cetamina. Essa substância possivelmente amnésica causou interferência com outros sistemas de neurotransmissores que podem ter influenciado tanto na resposta comportamental quanto nas características neuroquímicas avaliadas. Entretanto, nosso estudo limita-se pelo fato de não apresentar um grupo controle que tenha recebido apenas a substância para que fosse avaliada unicamente a sua ação no nível de expressão de c-Fos, bem como grupos que utilizassem as mesmas doses da Cetamina e realizassem os protocolos comportamentais não associativos para “o quê”, “onde” e “quando”.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ratos Wistar são capazes de lembrar episódios, associando um evento ou item ao tempo e a localização espacial;

Houve um aumento da expressão de c-Fos no grupo controle, principalmente no GD. Neste sentido, há possivelmente um papel de comunicação entre as sub-regiões hipocâmpais, como CA3c e GD, na separação de padrões entre episódios similares;

A Cetamina em doses sub-anestésicas apresentou um efeito amnésico que prejudicou a integração dos componentes episódicos. Na dose mais alta foi observado um possível efeito sedativo relacionado à hipolocomoção. Esses efeitos podem ser mediados tanto pelo bloqueio do receptor NMDA, quanto pela estereosseletividade da Cetamina para receptores muscarínicos e opióides;

Nos grupos que receberam a Cetamina, o aumento de c-Fos nas sub-regiões hipocâmpais possivelmente está relacionado à ação da substância e não do protocolo comportamental.

## 8. REFERÊNCIAS

- A, M., Barnes, P., Staal, V., McGregor, A., & C, R. (2007). Context- but not familiarity-dependent forms of object recognition are impaired following excitotoxic hippocampal lesions in rats. *Behavioral Neuroscience*, *121*(1), 218–223. <http://doi.org/10.1037/0735-7044.121.1.218>
- Abelson, K. S. P., Goldkuhl, R. R., Nylund, A., & Höglund, A. U. (2006). The effect of ketamine on intraspinal acetylcholine release: Involvement of spinal nicotinic receptors. *European Journal of Pharmacology*, *534*(1–3), 122–128. <http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.01.044>
- Adams, H. A. (1997). S-(+)-Ketamin. *Der Anaesthetist*, *46*(12), 1081–1087. <http://doi.org/10.1007/s001010050510>
- Adams, H. A., & Werner, C. (1997). Vom Razemat zum Eutomer: (S)-Ketamin Renaissance einer Substanz? *Der Anaesthetist*, *46*(12), 1026–1042. <http://doi.org/10.1007/s001010050503>
- Adler, C., Goldberg, T., Malhotra, A., Pickar, D., & Breier, A. (1998). Effects of Ketamine on Thought Disorder, Working Memory, and Semantic Memory in Healthy Volunteers. *Biological Psychiatry*, *43*(11), 811–816. [http://doi.org/10.1016/S0006-3223\(97\)00556-8](http://doi.org/10.1016/S0006-3223(97)00556-8)
- Aggleton, J. P., Brown, M. W., & Albasser, M. M. (2012). Contrasting brain activity patterns for item recognition memory and associative recognition memory: Insights from immediate-early gene functional imaging. *Neuropsychologia*, *50*(13), 3141–3155. <http://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2012.05.018>
- Aggleton, J. P., & Pearce, J. M. (2001). Neural systems underlying episodic memory: insights from animal research. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, *356*(1413), 1467–1482. <http://doi.org/10.1098/rstb.2001.0946>
- Agster, K. L., & Burwell, R. D. (2013). Hippocampal and subicular efferents and afferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *Behavioural Brain Research*, *254*, 50–64. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.07.005>
- Aguado, L., Antonio, A. S., Pérez, L., Valle, R. del, & Gómez, J. (1994). Effects of the NMDA receptor antagonist ketamine on flavor memory: Conditioned aversion, latent inhibition, and habituation of neophobia. *Behavioral and Neural Biology*, *61*(3), 271–281. [http://doi.org/10.1016/S0163-1047\(05\)80010-X](http://doi.org/10.1016/S0163-1047(05)80010-X)

- Ahmadian, G., Ju, W., Liu, L., Wyszynski, M., Lee, S. H., Dunah, A. W., ... Wang, Y. T. (2004). Tyrosine phosphorylation of GluR2 is required for insulin-stimulated AMPA receptor endocytosis and LTD. *The EMBO Journal*, *23*(5), 1040–1050. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600126>
- Akbarian, S., Sucher, N. J., Bradley, D., Tafazzoli, A., Trinh, D., Hetrick, W. P., ... Jones, E. G. (1996). Selective alterations in gene expression for NMDA receptor subunits in prefrontal cortex of schizophrenics. *The Journal of Neuroscience*, *16*(1), 19–30.
- Albasser, M. M., Olarte-Sánchez, C. M., Amin, E., Horne, M. R., Newton, M. J., Clea, E., & Aggleton, J. P. (2013). The neural basis of nonvisual object recognition memory in the rat. *Behavioral Neuroscience*, *127*(1), 70–85. <http://doi.org/10.1037/a0031216>
- Albasser, M. M., Poirier, G. L., & Aggleton, J. P. (2010). Qualitatively different modes of perirhinal–hippocampal engagement when rats explore novel vs. familiar objects as revealed by c-Fos imaging. *European Journal of Neuroscience*, *31*(1), 134–147. <http://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.07042.x>
- Allen, T. A., & Fortin, N. J. (2013). The evolution of episodic memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(Supplement 2), 10379–10386. <http://doi.org/10.1073/pnas.1301199110>
- Almeida, L. de, Idiart, M., & Lisman, J. E. (2007). Memory retrieval time and memory capacity of the CA3 network: Role of gamma frequency oscillations. *Learning & Memory*, *14*(11), 795–806. <http://doi.org/10.1101/lm.730207>
- Anis, N. a., Berry, S. c., Burton, N. r., & Lodge, D. (1983). The dissociative anaesthetics, ketamine and phencyclidine, selectively reduce excitation of central mammalian neurones by N-methyl-aspartate. *British Journal of Pharmacology*, *79*(2), 565–575. <http://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1983.tb11031.x>
- Babb, S. J., & Crystal, J. D. (2005). Discrimination of what, when, and where: Implications for episodic-like memory in rats. *Learning and Motivation*, *36*(2), 177–189. <http://doi.org/10.1016/j.lmot.2005.02.009>
- Babb, S. J., & Crystal, J. D. (2006a). Discrimination of what, when, and where is not based on time of day. *Learning & Behavior*, *34*(2), 124–130. <http://doi.org/10.3758/BF03193188>
- Babb, S. J., & Crystal, J. D. (2006b). Episodic-like Memory in the Rat. *Current Biology*, *16*(13), 1317–1321. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2006.05.025>

- Baker, K. B., & Kim, J. J. (2002). Effects of Stress and Hippocampal NMDA Receptor Antagonism on Recognition Memory in Rats. *Learning & Memory*, *9*(2), 58–65. <http://doi.org/10.1101/lm.46102>
- Bannerman, D. M., Rawlins, J. N. P., & Good, M. A. (2006). The drugs don't work—or do they? Pharmacological and transgenic studies of the contribution of NMDA and GluR-A-containing AMPA receptors to hippocampal-dependent memory. *Psychopharmacology*, *188*(4), 552–566. <http://doi.org/10.1007/s00213-006-0403-6>
- Barbosa, F. F., de Oliveira Pontes, I. M., Ribeiro, S., Ribeiro, A. M., & Silva, R. H. (2012). Differential roles of the dorsal hippocampal regions in the acquisition of spatial and temporal aspects of episodic-like memory. *Behavioural Brain Research*, *232*(1), 269–277. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.04.022>
- Barbosa, F. F., Pontes, I. M. de O., Ribeiro, A. M., & Silva, R. H. (2010). Extending possible applications of an episodic-like memory task in rats. *Behavioural Brain Research*, *215*(2), 326–331.
- Barbosa, F. F., Santos, J. R., Meurer, Y. S. R., Macêdo, P. T., Ferreira, L. M. S., Pontes, I. M. O., ... Silva, R. H. (2013). Differential Cortical c-Fos and Zif-268 Expression after Object and Spatial Memory Processing in a Standard or Episodic-Like Object Recognition Task. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *7*. <http://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00112>
- Barker, G. R. I., Bird, F., Alexander, V., & Warburton, E. C. (2007). Recognition Memory for Objects, Place, and Temporal Order: A Disconnection Analysis of the Role of the Medial Prefrontal Cortex and Perirhinal Cortex. *The Journal of Neuroscience*, *27*(11), 2948–2957. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5289-06.2007>
- Barker, G. R. I., & Warburton, E. C. (2009). Critical role of the cholinergic system for object-in-place associative recognition memory. *Learning & Memory*, *16*(1), 8–11. <http://doi.org/10.1101/lm.1121309>
- Barker, G. R. I., & Warburton, E. C. (2013). Object-in-Place Associative Recognition Memory Depends on Glutamate Receptor Neurotransmission Within Two Defined Hippocampal-Cortical Circuits: A Critical Role for AMPA and NMDA Receptors in the Hippocampus, Perirhinal, and Prefrontal Cortices. *Cerebral Cortex*, bht245. <http://doi.org/10.1093/cercor/bht245>
- Barker, G. R. I., Warburton, E. C., Koder, T., Dolman, N. P., More, J. C. A., Aggleton, J. P., ... Brown, M. W. (2006). The Different Effects on Recognition Memory of

- Perirhinal Kainate and NMDA Glutamate Receptor Antagonism: Implications for Underlying Plasticity Mechanisms. *The Journal of Neuroscience*, 26(13), 3561–3566. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3154-05.2006>
- Bizon, J. L., & Gallagher, M. (2005). More Is Less: Neurogenesis and Age-Related Cognitive Decline in Long-Evans Rats. *Science of Aging Knowledge Environment*, 2005(7), re2. <http://doi.org/10.1126/sageke.2005.7.re2>
- Bliss, T. V. P., & Lømo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of Physiology*, 232(2), 331–356. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.1973.sp010273>
- Boultadakis, A., & Pitsikas, N. (2011). Anesthetic Ketamine Impairs Rats' Recall of Previous Information: The Nitric Oxide Synthase Inhibitor N-nitro-l-arginine Methyl ester Antagonizes This Ketamine-induced Recognition Memory Deficit. *Anesthesiology*, 114(6), 1345–1353. <http://doi.org/10.1097/ALN.0b013e318219524e>
- Brown, M. W., & Aggleton, J. P. (2001). Recognition memory: What are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nature Reviews Neuroscience*, 2(1), 51–61. <http://doi.org/10.1038/35049064>
- Brown, S. M., Hopkins, M. S., Mitchell, S. E., Senior, M. L., Wang, T. Y., Duncan, R. R., ... Kresovich, S. (1996). Multiple methods for the identification of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Theoretical and Applied Genetics*, 93(1-2), 190–198. <http://doi.org/10.1007/BF00225745>
- Burgess, N., Maguire, E. A., & O'Keefe, J. (2002). The Human Hippocampus and Spatial and Episodic Memory. *Neuron*, 35(4), 625–641. [http://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00830-9](http://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00830-9)
- Canolty, R. T., Edwards, E., Dalal, S. S., Soltani, M., Nagarajan, S. S., Kirsch, H. E., ... Knight, R. T. (2006). High Gamma Power Is Phase-Locked to Theta Oscillations in Human Neocortex. *Science*, 313(5793), 1626–1628. <http://doi.org/10.1126/science.1128115>
- Castilla-Ortega, E., Pedraza, C., Chun, J., Fonseca, F. R. de, Estivill-Torrús, G., & Santín, L. J. (2012). Hippocampal c-Fos activation in normal and LPA1-null mice after two object recognition tasks with different memory demands. *Behavioural Brain Research*, 232(2), 400–405. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.04.018>

- Cazakoff, B. N., Johnson, K. J., & Howland, J. G. (2010). Converging effects of acute stress on spatial and recognition memory in rodents: A review of recent behavioural and pharmacological findings. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *34*(5), 733–741. <http://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.04.002>
- Chang, E. H., & Huerta, P. T. (2012). Neurophysiological correlates of object recognition in the dorsal subiculum. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *6*. <http://doi.org/10.3389/fnbeh.2012.00046>
- Chao, O. Y., Nikolaus, S., Huston, J. P., & de Souza Silva, M. A. (2014). The neurokinin-3 receptor agonist senktide facilitates the integration of memories for object, place and temporal order into episodic memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, *114*, 178–185. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.06.009>
- Choi, D. W. (1988). Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*, *1*(8), 623–634. [http://doi.org/10.1016/0896-6273\(88\)90162-6](http://doi.org/10.1016/0896-6273(88)90162-6)
- Chrobak, J. J., Hinman, J. R., & Sabolek, H. R. (2008). Revealing Past Memories: Proactive Interference and Ketamine-Induced Memory Deficits. *The Journal of Neuroscience*, *28*(17), 4512–4520. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0742-07.2008>
- Clayton, N. S., Bussey, T. J., & Dickinson, A. (2003). Can animals recall the past and plan for the future? *Nature Reviews Neuroscience*, *4*(8), 685–691. <http://doi.org/10.1038/nrn1180>
- Clayton, N. S., & Dickinson, A. (1998). Episodic-like memory during cache recovery by scrub jays. *Nature*, *395*(6699), 272–274. <http://doi.org/10.1038/26216>
- Collingridge, G. L., Kehl, S. J., & McLennan, H. (1983). Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *The Journal of Physiology*, *334*(1), 33–46. <http://doi.org/10.1113/jphysiol.1983.sp014478>
- Corkin, S. (2002). What's new with the amnesic patient H.M.? *Nature Reviews Neuroscience*, *3*(2), 153–160. <http://doi.org/10.1038/nrn726>
- Coyle, J. T. (1996). The Glutamatergic Dysfunction Hypothesis for Schizophrenia. *Harvard Review of Psychiatry*, *3*(5), 241–253. <http://doi.org/10.3109/10673229609017192>
- Davis, K. E., Easton, A., Eacott, M. J., & Gigg, J. (2013). Episodic-Like Memory for What-Where-Which Occasion is Selectively Impaired in the 3xTgAD Mouse

- Model of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 33(3), 681–698. <http://doi.org/10.3233/JAD-2012-121543>
- De Lima, M. N. M., Laranja, D. C., Bromberg, E., Roesler, R., & Schröder, N. (2005). Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. *Behavioural Brain Research*, 156(1), 139–143. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.05.016>
- Dees, R. L., & Kesner, R. P. (2013). The role of the dorsal dentate gyrus in object and object-context recognition. *Neurobiology of Learning and Memory*, 106, 112–117. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.07.013>
- Deng, W., Aimone, J. B., & Gage, F. H. (2010). New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nature Reviews Neuroscience*, 11(5), 339–350. <http://doi.org/10.1038/nrn2822>
- Dere, E., Huston, J. P., & De Souza Silva, M. A. (2005a). Episodic-like memory in mice: Simultaneous assessment of object, place and temporal order memory. *Brain Research Protocols*, 16(1–3), 10–19. <http://doi.org/10.1016/j.brainresprot.2005.08.001>
- Dere, E., Huston, J. P., & De Souza Silva, M. A. (2005b). Integrated memory for objects, places, and temporal order: Evidence for episodic-like memory in mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, 84(3), 214–221. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2005.07.002>
- Dere, E., Huston, J. P., & De Souza Silva, M. A. (2007). The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 31(5), 673–704. <http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2007.01.005>
- Dere, E., Kart-Teke, E., Huston, J. P., & De Souza Silva, M. A. (2006). The case for episodic memory in animals. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 30(8), 1206–1224. <http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2006.09.005>
- Dere, E., Pause, B. M., & Pietrowsky, R. (2010). Emotion and episodic memory in neuropsychiatric disorders. *Behavioural Brain Research*, 215(2), 162–171. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.03.017>
- Derrick, B. E., Weinberger, S. B., & Martinez Jr., J. L. (1991). Opioid receptors are involved in an NMDA receptor-independent mechanism of LTP induction at hippocampal mossy fiber-CA3 synapses. *Brain Research Bulletin*, 27(2), 219–223. [http://doi.org/10.1016/0361-9230\(91\)90071-Q](http://doi.org/10.1016/0361-9230(91)90071-Q)

- DeVito, L. M., & Eichenbaum, H. (2010). Distinct contributions of the hippocampus and medial prefrontal cortex to the “what–where–when” components of episodic-like memory in mice. *Behavioural Brain Research*, *215*(2), 318–325. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.09.014>
- DeVito, L. M., & Eichenbaum, H. (2011). Memory for the Order of Events in Specific Sequences: Contributions of the Hippocampus and Medial Prefrontal Cortex. *The Journal of Neuroscience*, *31*(9), 3169–3175. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4202-10.2011>
- Di Maio, R., Mastroberardino, P. G., Hu, X., Montero, L., & Greenamyre, J. T. (2011). Pilocarpine alters NMDA receptor expression and function in hippocampal neurons: NADPH oxidase and ERK1/2 mechanisms. *Neurobiology of Disease*, *42*(3), 482–495. <http://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.02.012>
- Dickson, C. T., & Vanderwolf, C. H. (1990). Animal models of human amnesia and dementia: Hippocampal and amygdala ablation compared with serotonergic and cholinergic blockade in the rat. *Behavioural Brain Research*, *41*(3), 215–227. [http://doi.org/10.1016/0166-4328\(90\)90109-R](http://doi.org/10.1016/0166-4328(90)90109-R)
- Duman, R. S., Li, N., Liu, R.-J., Duric, V., & Aghajanian, G. (2012). Signaling pathways underlying the rapid antidepressant actions of ketamine. *Neuropharmacology*, *62*(1), 35–41. <http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.08.044>
- Durieux, M. E., & Nietgen, G. W. (1997). Synergistic Inhibition of Muscarinic Signaling by Ketamine Stereoisomers and the Preservative Benzethonium Chloride: *Anesthesiology*, *86*(6), 1326–1333. <http://doi.org/10.1097/00000542-199706000-00014>
- Eacott, M. J., & Easton, A. (2010). Episodic memory in animals: Remembering which occasion. *Neuropsychologia*, *48*(8), 2273–2280. <http://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2009.11.002>
- Eacott, M. J., Easton, A., & Zinkivskay, A. (2005). Recollection in an episodic-like memory task in the rat. *Learning & Memory*, *12*(3), 221–223. <http://doi.org/10.1101/lm.92505>
- Eacott, M. J., & Norman, G. (2004). Integrated Memory for Object, Place, and Context in Rats: A Possible Model of Episodic-Like Memory? *The Journal of Neuroscience*, *24*(8), 1948–1953. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2975-03.2004>

- Eichenbaum, H., & Cohen, N. J. (2001). *From conditioning to conscious recollection: Memory systems of the brain* (Vol. x). New York, NY, US: Oxford University Press.
- Eichenbaum, H., Sauvage, M., Fortin, N., Komorowski, R., & Lipton, P. (2012). Towards a functional organization of episodic memory in the medial temporal lobe. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *36*(7), 1597–1608. <http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.07.006>
- Eilam, D., & Golani, I. (1989). Home base behavior of rats (*Rattus norvegicus*) exploring a novel environment. *Behavioural Brain Research*, *34*(3), 199–211. [http://doi.org/10.1016/S0166-4328\(89\)80102-0](http://doi.org/10.1016/S0166-4328(89)80102-0)
- Engelhardt, W. (1997). Aufwachverhalten und psychomimetische Reaktionen nach S-(+)-Ketamin: *Der Anaesthetist*, *46*(S1), S38–S42. <http://doi.org/10.1007/PL00002463>
- Ennaceur, A., & Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural Brain Research*, *31*(1), 47–59. [http://doi.org/10.1016/0166-4328\(88\)90157-X](http://doi.org/10.1016/0166-4328(88)90157-X)
- Ergorul, C., & Eichenbaum, H. (2004). The Hippocampus and Memory for “What,” “Where,” and “When.” *Learning & Memory*, *11*(4), 397–405. <http://doi.org/10.1101/lm.73304>
- Estes, W. K. (1985). Memory for Temporal Information. In P. D. J. A. Michon & D. J. L. Jackson (Eds.), *Time, Mind, and Behavior* (pp. 151–168). Springer Berlin Heidelberg. Retrieved from [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-70491-8\\_10](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-70491-8_10)
- Everitt, B. J., & Robbins, T. W. (1997). Central Cholinergic Systems and Cognition. *Annual Review of Psychology*, *48*(1), 649–684. <http://doi.org/10.1146/annurev.psych.48.1.649>
- Fagg, G. E. (1987). Phencyclidine and related drugs bind to the activated N-methyl-D-aspartate receptor-channel complex in rat brain membranes. *Neuroscience Letters*, *76*(2), 221–227. [http://doi.org/10.1016/0304-3940\(87\)90719-1](http://doi.org/10.1016/0304-3940(87)90719-1)
- Faul, F., Erdfelder, E., Lang, A.-G., & Buchner, A. (2007). G\*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior Research Methods*, *39*(2), 175–191. <http://doi.org/10.3758/BF03193146>

- Flavell, S. W., & Greenberg, M. E. (2008). Signaling Mechanisms Linking Neuronal Activity to Gene Expression and Plasticity of the Nervous System. *Annual Review of Neuroscience*, 31(1), 563–590. <http://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.060407.125631>
- Fortin, N. J., Wright, S. P., & Eichenbaum, H. (2004). Recollection-like memory retrieval in rats is dependent on the hippocampus. *Nature*, 431(7005), 188–191. <http://doi.org/10.1038/nature02853>
- Fouquet, C., Tobin, C., & Rondi-Reig, L. (2010). A new approach for modeling episodic memory from rodents to humans: The temporal order memory. *Behavioural Brain Research*, 215(2), 172–179. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.05.054>
- Frankland, P. W., & Bontempi, B. (2005). The organization of recent and remote memories. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(2), 119–130. <http://doi.org/10.1038/nrn1607>
- Fusi, S., & Abbott, L. F. (2007). Limits on the memory storage capacity of bounded synapses. *Nature Neuroscience*, 10(4), 485–493. <http://doi.org/10.1038/nn1859>
- Fyhn, M., Molden, S., Witter, M. P., Moser, E. I., & Moser, M.-B. (2004). Spatial Representation in the Entorhinal Cortex. *Science*, 305(5688), 1258–1264. <http://doi.org/10.1126/science.1099901>
- Garcia, L. S. B., Comim, C. M., Valvassori, S. S., Réus, G. Z., Barbosa, L. M., Andreazza, A. C., ... Quevedo, J. (2008). Acute administration of ketamine induces antidepressant-like effects in the forced swimming test and increases BDNF levels in the rat hippocampus. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 32(1), 140–144. <http://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2007.07.027>
- Garcia, L. S. B., Comim, C. M., Valvassori, S. S., Réus, G. Z., Stertz, L., Kapczinski, F., ... Quevedo, J. (2009). Ketamine treatment reverses behavioral and physiological alterations induced by chronic mild stress in rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 33(3), 450–455. <http://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2009.01.004>
- Getova, D., & Doncheva, N. (2011). Effects of Ketamine on Memory and Nociception in Rats. *Folia Medica*, 53(1), 53–59.
- Gilbert, P. E., & Kesner, R. P. (2003). Recognition Memory for Complex Visual Discriminations Is Influenced by Stimulus Interference in Rodents With Perirhinal Cortex Damage. *Learning & Memory*, 10(6), 525–530. <http://doi.org/10.1101/lm.64503>

- Gilbert, P. E., Kesner, R. P., & Lee, I. (2001). Dissociating hippocampal subregions: A double dissociation between dentate gyrus and CA1. *Hippocampus*, *11*(6), 626–636. <http://doi.org/10.1002/hipo.1077>
- Gomes, L. M., Garcia, J. B., Ribamar Jr, J. S., & Nascimento, A. G. (2011). Neurotoxicity of subarachnoid preservative-free S (+)-ketamine in dogs. *Pain Physician*, *14*(1), 83–90.
- Gonzales, J. M., Loeb, A. L., Reichard, P. S., & Irvine, S. (1995). Ketamine Inhibits Glutamate-, N-Methyl-D-Aspartate-, and Quisqualate-stimulated cGMP Production in Cultured Cerebral Neurons: *Anesthesiology*, *82*(1), 205–213. <http://doi.org/10.1097/00000542-199501000-00025>
- Good, M. A., Hale, G., & Staal, V. (2007). Impaired “episodic-like” object memory in adult APPswe transgenic mice. *Behavioral Neuroscience*, *121*(2), 443–448. <http://doi.org/10.1037/0735-7044.121.2.443>
- Goulart, B. K., de Lima, M. N. M., de Farias, C. B., Reolon, G. K., Almeida, V. R., Quevedo, J., ... Roesler, R. (2010). Ketamine impairs recognition memory consolidation and prevents learning-induced increase in hippocampal brain-derived neurotrophic factor levels. *Neuroscience*, *167*(4), 969–973. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.03.032>
- Greenberg, D. L., & Verfaellie, M. (2010). Interdependence of episodic and semantic memory: Evidence from neuropsychology. *Journal of the International Neuropsychological Society*, *16*(05), 748–753. <http://doi.org/10.1017/S1355617710000676>
- Greenberg, M. E., & Ziff, E. B. (2001). Signal transduction in the postsynaptic neuron. Activity-dependent regulation of gene expression. *Synapses. The Johns Hopkins University Press, Baltimore*, 357–391.
- Greenberg, M. E., Ziff, E. B., & Greene, L. A. (1986). Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription. *Science*, *234*(4772), 80–83. <http://doi.org/10.1126/science.3749894>
- Griffiths, D., Dickinson, A., & Clayton, N. (1999). Episodic memory: what can animals remember about their past? *Trends in Cognitive Sciences*, *3*(2), 74–80. [http://doi.org/10.1016/S1364-6613\(98\)01272-8](http://doi.org/10.1016/S1364-6613(98)01272-8)
- Guzowski, J. F., Knierim, J. J., & Moser, E. I. (2004). Ensemble Dynamics of Hippocampal Regions CA3 and CA1. *Neuron*, *44*(4), 581–584. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.11.003>

- Hargreaves, E. L., Rao, G., Lee, I., & Knierim, J. J. (2005). Major Dissociation Between Medial and Lateral Entorhinal Input to Dorsal Hippocampus. *Science*, *308*(5729), 1792–1794. <http://doi.org/10.1126/science.1110449>
- Harrison, P. J., Law, A. J., & Eastwood, S. L. (2003). Glutamate Receptors and Transporters in the Hippocampus in Schizophrenia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1003*(1), 94–101. <http://doi.org/10.1196/annals.1300.006>
- Hauber, W. (1993). Clozapine improves dizocilpine-induced delayed alternation impairment in rats. *Journal of Neural Transmission / General Section JNT*, *94*(3), 223–233. <http://doi.org/10.1007/BF01277027>
- Heale, V., & Harley, C. (1990). MK-801 and AP5 impair acquisition, but not retention, of the Morris milk maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *36*(1), 145–149. [http://doi.org/10.1016/0091-3057\(90\)90140-D](http://doi.org/10.1016/0091-3057(90)90140-D)
- Herdegen, T., & Leah, J. D. (1998). Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Research. Brain Research Reviews*, *28*(3), 370–490.
- Himmelseher, S., Pfenninger, E., & Georgieff, M. (1996). The effects of ketamine-isomers on neuronal injury and regeneration in rat hippocampal neurons. *Anesthesia & Analgesia*, *83*(3), 505–512.
- Himmelseher, S., Pfenninger, E., Kochs, E., & Aucter, M. (2000). S (+)-ketamine up-regulates neuronal regeneration associated proteins following glutamate injury in cultured rat hippocampal neurons. *Journal of Neurosurgical Anesthesiology*, *12*(2), 84–94.
- Hoge, J., & Kesner, R. P. (2007). Role of CA3 and CA1 subregions of the dorsal hippocampus on temporal processing of objects. *Neurobiology of Learning and Memory*, *88*(2), 225–231. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2007.04.013>
- Holdstock, J. s., Mayes, A. r., Roberts, N., Cezayirli, E., Isaac, C. l., O'Reilly, R. c., & Norman, K. a. (2002). Under what conditions is recognition spared relative to recall after selective hippocampal damage in humans? *Hippocampus*, *12*(3), 341–351. <http://doi.org/10.1002/hipo.10011>
- Hollmann, M., Maron, C., & Heinemann, S. (1994). N-glycosylation site tagging suggests a three transmembrane domain topology for the glutamate receptor GluR1. *Neuron*, *13*(6), 1331–1343. [http://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90419-7](http://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90419-7)

- Honey, R. A., Turner, D. C., Honey, G. D., Sharar, S. R., Kumaran, D., Pomarol-Clotet, E., ... Fletcher, P. (2003). Subdissociative Dose Ketamine Produces a Deficit in Manipulation but not Maintenance of the Contents of Working Memory. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 28(11). <http://doi.org/10.1038/sj.npp.1300272>
- Huerta, P. T., Sun, L. D., Wilson, M. A., & Tonegawa, S. (2000). Formation of Temporal Memory Requires NMDA Receptors within CA1 Pyramidal Neurons. *Neuron*, 25(2), 473–480. [http://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80909-5](http://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80909-5)
- Hunsaker, M. R., & Kesner, R. P. (2013). The operation of pattern separation and pattern completion processes associated with different attributes or domains of memory. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 37(1), 36–58. <http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.09.014>
- Hunsaker, M. R., Lee, B., & Kesner, R. P. (2008). Evaluating the temporal context of episodic memory: The role of CA3 and CA1. *Behavioural Brain Research*, 188(2), 310–315. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.11.015>
- Hunsaker, M. R., Rosenberg, J. S., & Kesner, R. P. (2008). The role of the dentate gyrus, CA3a,b, and CA3c for detecting spatial and environmental novelty. *Hippocampus*, 18(10), 1064–1073. <http://doi.org/10.1002/hipo.20464>
- Imre, G., Fokkema, D. S., Boer, J. A. D., & Ter Horst, G. J. (2006). Dose–response characteristics of ketamine effect on locomotion, cognitive function and central neuronal activity. *Brain Research Bulletin*, 69(3), 338–345. <http://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2006.01.010>
- Inostroza, M., Brotons-Mas, J. R., Laurent, F., Cid, E., & Prida, L. M. de la. (2013). Specific Impairment of “What-Where-When” Episodic-Like Memory in Experimental Models of Temporal Lobe Epilepsy. *The Journal of Neuroscience*, 33(45), 17749–17762. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0957-13.2013>
- Jansen, K. L. R., Faull, R. L. M., Dragunow, M., & Synek, B. L. (1990). Alzheimer’s disease: Changes in hippocampal N-methyl-d-aspartate, quisqualate, neurotensin, adenosine, benzodiazepine, serotonin and opioid receptors—an autoradiographic study. *Neuroscience*, 39(3), 613–627. [http://doi.org/10.1016/0306-4522\(90\)90246-Z](http://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90246-Z)
- Jourdi, H., Hsu, Y.-T., Zhou, M., Qin, Q., Bi, X., & Baudry, M. (2009). Positive AMPA Receptor Modulation Rapidly Stimulates BDNF Release and Increases Dendritic

- mRNA Translation. *The Journal of Neuroscience*, 29(27), 8688–8697. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6078-08.2009>
- Kart-Teke, E., De Souza Silva, M. A., Huston, J. P., & Dere, E. (2006). Wistar rats show episodic-like memory for unique experiences. *Neurobiology of Learning and Memory*, 85(2), 173–182. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2005.10.002>
- Kealy, J., & Commins, S. (2011). The rat perirhinal cortex: A review of anatomy, physiology, plasticity, and function. *Progress in Neurobiology*, 93(4), 522–548. <http://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.03.002>
- Kegeles, L. S., Abi-Dargham, A., Zea-Ponce, Y., Rodenhiser-Hill, J., Mann, J. J., Van Heertum, R. L., ... Laruelle, M. (2000). Modulation of amphetamine-induced striatal dopamine release by ketamine in humans: implications for schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 48(7), 627–640. [http://doi.org/10.1016/S0006-3223\(00\)00976-8](http://doi.org/10.1016/S0006-3223(00)00976-8)
- Kesner, R. P. (2007). A behavioral analysis of dentate gyrus function. In H. E. Scharfman (Ed.), *Progress in Brain Research* (Vol. 163, pp. 567–576). Elsevier. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079612307630301>
- Kesner, R. P., Hunsaker, M. R., & Ziegler, W. (2010). The role of the dorsal CA1 and ventral CA1 in memory for the temporal order of a sequence of odors. *Neurobiology of Learning and Memory*, 93(1), 111–116. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2009.08.010>
- Kesner, R. P., & Rolls, E. T. (2015). A computational theory of hippocampal function, and tests of the theory: New developments. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 48, 92–147. <http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.11.009>
- Kesner, R. P., Taylor, J. O., Hoge, J., & Andy, F. (2015). Role of the dentate gyrus in mediating object-spatial configuration recognition. *Neurobiology of Learning and Memory*, 118, 42–48. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.11.004>
- Kienbaum, P., Heuter, T., Pavlakovic, G., Michel, M. C., & Peters, J. (2001). S (+)-Ketamine Increases Muscle Sympathetic Activity and Maintains the Neural Response to Hypotensive Challenges in Humans: *Anesthesiology*, 94(2), 252–258. <http://doi.org/10.1097/00000542-200102000-00014>
- Kinnavane, L., Albasser, M. M., & Aggleton, J. P. (2015). Advances in the behavioural testing and network imaging of rodent recognition memory. *Behavioural Brain Research*, 285, 67–78. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.07.049>

- Kose, E. A., Bakar, B., Ayva, S. K., Kilinc, K., & Apan, A. (2012). Neuroprotective effects of racemic ketamine and (S)-ketamine on spinal cord injury in rat. *Injury*, *43*(7), 1124–1130. <http://doi.org/10.1016/j.injury.2012.02.022>
- Kubik, S., Miyashita, T., & Guzowski, J. F. (2007). Using immediate-early genes to map hippocampal subregional functions. *Learning & Memory*, *14*(11), 758–770. <http://doi.org/10.1101/lm.698107>
- Lahti, A. C., Koffel, B., LaPorte, D., & Tamminga, C. A. (1995). Subanesthetic doses of ketamine stimulate psychosis in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, *13*(1), 9–19. [http://doi.org/10.1016/0893-133X\(94\)00131-I](http://doi.org/10.1016/0893-133X(94)00131-I)
- Langston, R. F., & Wood, E. R. (2010). Associative recognition and the hippocampus: Differential effects of hippocampal lesions on object-place, object-context and object-place-context memory. *Hippocampus*, *20*(10), 1139–1153. <http://doi.org/10.1002/hipo.20714>
- Lassalle, J. M., Bataille, T., & Halley, H. (2000). Reversible inactivation of the hippocampal mossy fiber synapses in mice impairs spatial learning, but neither consolidation nor memory retrieval, in the Morris navigation task. *Neurobiology of Learning and Memory*, *73*(3), 243–257. <http://doi.org/10.1006/nlme.1999.3931>
- Lee, I., Hunsaker, M. R., & Kesner, R. P. (2005). The Role of Hippocampal Subregions in Detecting Spatial Novelty. *Behavioral Neuroscience*, *119*(1), 145–153. <http://doi.org/10.1037/0735-7044.119.1.145>
- Lee, I., & Kesner, R. P. (2002). Differential contribution of NMDA receptors in hippocampal subregions to spatial working memory. *Nature Neuroscience*, *5*(2), 162–168. <http://doi.org/10.1038/nn790>
- Lee, I., & Kesner, R. P. (2003). Time-Dependent Relationship between the Dorsal Hippocampus and the Prefrontal Cortex in Spatial Memory. *The Journal of Neuroscience*, *23*(4), 1517–1523.
- Lees, G. J. (1987). Effects of ketamine on the in vivo toxicity of quinolinate and N-methyl-d-aspartate in the rat hippocampus. *Neuroscience Letters*, *78*(2), 180–186. [http://doi.org/10.1016/0304-3940\(87\)90630-6](http://doi.org/10.1016/0304-3940(87)90630-6)
- Legutko, B., Li, X., & Skolnick, P. (2001). Regulation of BDNF expression in primary neuron culture by LY392098, a novel AMPA receptor potentiator. *Neuropharmacology*, *40*(8), 1019–1027. [http://doi.org/10.1016/S0028-3908\(01\)00006-5](http://doi.org/10.1016/S0028-3908(01)00006-5)

- Leutgeb, J. K., Leutgeb, S., Moser, M.-B., & Moser, E. I. (2007). Pattern Separation in the Dentate Gyrus and CA3 of the Hippocampus. *Science*, *315*(5814), 961–966. <http://doi.org/10.1126/science.1135801>
- Li, N., Lee, B., Liu, R.-J., Banasr, M., Dwyer, J. M., Iwata, M., ... Duman, R. S. (2010). mTOR-Dependent Synapse Formation Underlies the Rapid Antidepressant Effects of NMDA Antagonists. *Science*, *329*(5994), 959–964. <http://doi.org/10.1126/science.1190287>
- Liu, F., Patterson, T. A., Sadovova, N., Zhang, X., Liu, S., Zou, X., ... Wang, C. (2013). Ketamine-Induced Neuronal Damage and Altered N-Methyl-d-Aspartate Receptor Function in Rat Primary Forebrain Culture. *Toxicological Sciences*, *131*(2), 548–557. <http://doi.org/10.1093/toxsci/kfs296>
- Liu, J., & Moghaddam, B. (1995). Regulation of glutamate efflux by excitatory amino acid receptors: evidence for tonic inhibitory and phasic excitatory regulation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *274*(3), 1209–1215.
- Lombroso, P. (2004). Learning and memory. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, *26*(3), 207–210. <http://doi.org/10.1590/S1516-44462004000300011>
- Maeng, S., Zarate Jr, C. A., Du, J., Schloesser, R. J., McCammon, J., Chen, G., & Manji, H. K. (2008). Cellular Mechanisms Underlying the Antidepressant Effects of Ketamine: Role of  $\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methylisoxazole-4-Propionic Acid Receptors. *Biological Psychiatry*, *63*(4), 349–352. <http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2007.05.028>
- Malkova, L., & Mishkin, M. (2003). One-Trial Memory for Object-Place Associations after Separate Lesions of Hippocampus and Posterior Parahippocampal Region in the Monkey. *The Journal of Neuroscience*, *23*(5), 1956–1965.
- Marmioli, P., & Cavaletti, G. (2012). The Glutamatergic Neurotransmission in the Central Nervous System. *Current Medicinal Chemistry*, *19*(9), 1269–1276. <http://doi.org/10.2174/092986712799462711>
- McGaugh, J. L. (2000). Memory--a Century of Consolidation. *Science*, *287*(5451), 248–251. <http://doi.org/10.1126/science.287.5451.248>
- McHugh, T. J., Jones, M. W., Quinn, J. J., Balthasar, N., Coppari, R., Elmquist, J. K., ... Tonegawa, S. (2007). Dentate Gyrus NMDA Receptors Mediate Rapid Pattern Separation in the Hippocampal Network. *Science*, *317*(5834), 94–99. <http://doi.org/10.1126/science.1140263>

- Meldrum, B. S. (2000). Glutamate as a Neurotransmitter in the Brain: Review of Physiology and Pathology. *The Journal of Nutrition*, 130(4), 1007S–1015S.
- Mickley, G. A., Remmers-Roeber, D. R., Crouse, C., & Peluso, R. (2000). Ketamine blocks a taste recognition memory in fetal rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 67(3), 575–581. [http://doi.org/10.1016/S0091-3057\(00\)00391-9](http://doi.org/10.1016/S0091-3057(00)00391-9)
- Mickley, G. A., Schaldach, M. A., Snyder, K. J., Balogh, S. A., Len, T., Neimanis, K., ... Yamamoto, B. K. (1998). Ketamine blocks a conditioned taste aversion (CTA) in neonatal rats. *Physiology & Behavior*, 64(3), 381–390. [http://doi.org/10.1016/S0031-9384\(98\)00097-3](http://doi.org/10.1016/S0031-9384(98)00097-3)
- Mion, G., & Villeveille, T. (2013). Ketamine Pharmacology: An Update (Pharmacodynamics and Molecular Aspects, Recent Findings). *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 19(6), 370–380. <http://doi.org/10.1111/cns.12099>
- Miyamoto, E. (2006). Molecular Mechanism of Neuronal Plasticity: Induction and Maintenance of Long-Term Potentiation in the Hippocampus. *Journal of Pharmacological Sciences*, 100(5), 433–442. <http://doi.org/10.1254/jphs.CPJ06007X>
- Moghaddam, B., & Bolinao, M. L. (1994). Biphasic effect of ethanol on extracellular accumulation of glutamate in the hippocampus and the nucleus accumbens. *Neuroscience Letters*, 178(1), 99–102. [http://doi.org/10.1016/0304-3940\(94\)90299-2](http://doi.org/10.1016/0304-3940(94)90299-2)
- Monaghan, D. T., Andaloro, V. J., & Skifter, D. A. (1998). Chapter 12 Molecular determinants of NMDA receptor pharmacological diversity. In I. A. L. and L. G. O.P. Ottersen (Ed.), *Progress in Brain Research* (Vol. 116, pp. 171–190). Elsevier. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079612308604379>
- Monaghan, D. T., & Cotman, C. W. (1985). Distribution of N-methyl-D-aspartate-sensitive L-[3H]glutamate-binding sites in rat brain. *The Journal of Neuroscience*, 5(11), 2909–2919.
- Moosavi, M., Yadollahi Khales, G., Rastegar, K., & Zarifkar, A. (2012). The effect of sub-anesthetic and anesthetic ketamine on water maze memory acquisition, consolidation and retrieval. *European Journal of Pharmacology*, 677(1–3), 107–110. <http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.12.021>

- Morgan, C. J. A., & Curran, H. V. (2006). Acute and chronic effects of ketamine upon human memory: a review. *Psychopharmacology*, *188*(4), 408–424. <http://doi.org/10.1007/s00213-006-0572-3>
- Morgan, C. J. A., Curran, H. V., & the Independent Scientific Committee on Drugs (ISCD). (2012). Ketamine use: a review. *Addiction*, *107*(1), 27–38. <http://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2011.03576.x>
- Morgan, C. J. A., Dodds, C. M., Furby, H., Pepper, F., Fam, J., Freeman, T. P., ... Stone, J. M. (2014). Long-Term Heavy Ketamine Use is Associated with Spatial Memory Impairment and Altered Hippocampal Activation. *Frontiers in Psychiatry*, *5*. <http://doi.org/10.3389/fpsyt.2014.00149>
- Moser, E. I., Kropff, E., & Moser, M.-B. (2008). Place Cells, Grid Cells, and the Brain's Spatial Representation System. *Annual Review of Neuroscience*, *31*(1), 69–89. <http://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.061307.090723>
- Nacher, J., & McEwen, B. S. (2006). The role of N-methyl-D-aspartate receptors in neurogenesis. *Hippocampus*, *16*(3), 267–270. <http://doi.org/10.1002/hipo.20160>
- Nadel, L., & Hardt, O. (2011). Update on Memory Systems and Processes. *Neuropsychopharmacology*, *36*(1), 251–273. <http://doi.org/10.1038/npp.2010.169>
- Nagel, J. A., & Huston, J. P. (1988). Enhanced inhibitory avoidance learning produced by post-trial injections of substance P into the basal forebrain. *Behavioral and Neural Biology*, *49*(3), 374–385. [http://doi.org/10.1016/S0163-1047\(88\)90386-X](http://doi.org/10.1016/S0163-1047(88)90386-X)
- Nakazawa, K., McHugh, T. J., Wilson, M. A., & Tonegawa, S. (2004). NMDA receptors, place cells and hippocampal spatial memory. *Nature Reviews Neuroscience*, *5*(5), 361–372. <http://doi.org/10.1038/nrn1385>
- Naya, Y., & Suzuki, W. A. (2011). Integrating What and When Across the Primate Medial Temporal Lobe. *Science*, *333*(6043), 773–776. <http://doi.org/10.1126/science.1206773>
- Newcomer, J. W., & Krystal, J. H. (2001). NMDA receptor regulation of memory and behavior in humans. *Hippocampus*, *11*(5), 529–542. <http://doi.org/10.1002/hipo.1069>
- Niciu, M. J., Henter, I. D., Luckenbaugh, D. A., Zarate, C. A., & Charney, D. S. (2014). Glutamate Receptor Antagonists as Fast-Acting Therapeutic Alternatives for the Treatment of Depression: Ketamine and Other Compounds. *Annual Review of*

- Pharmacology and Toxicology*, 54, 119–139. <http://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011613-135950>
- Nikiforuk, A., Kos, T., Fijał, K., Hołuj, M., Rafa, D., & Popik, P. (2013). Effects of the Selective 5-HT<sub>7</sub> Receptor Antagonist SB-269970 and Amisulpride on Ketamine-Induced Schizophrenia-like Deficits in Rats. *PLoS ONE*, 8(6), e66695. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0066695>
- Norman, K. A., & O'Reilly, R. C. (2003). Modeling hippocampal and neocortical contributions to recognition memory: A complementary-learning-systems approach. *Psychological Review*, 110(4), 611–646. <http://doi.org/10.1037/0033-295X.110.4.611>
- O'Keefe, J., & Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research*, 34(1), 171–175. [http://doi.org/10.1016/0006-8993\(71\)90358-1](http://doi.org/10.1016/0006-8993(71)90358-1)
- Obrenovitch, T. P., & Urenjak, J. (1997). Is High Extracellular Glutamate the Key to Excitotoxicity in Traumatic Brain Injury? *Journal of Neurotrauma*, 14(10), 677–698. <http://doi.org/10.1089/neu.1997.14.677>
- Obrenovitch, T. P., Urenjak, J., Zilkha, E., & Jay, T. M. (2000). Excitotoxicity in neurological disorders — the glutamate paradox. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 18(2–3), 281–287. [http://doi.org/10.1016/S0736-5748\(99\)00096-9](http://doi.org/10.1016/S0736-5748(99)00096-9)
- Okuda, S., Roozendaal, B., & McGaugh, J. L. (2004). Glucocorticoid effects on object recognition memory require training-associated emotional arousal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(3), 853–858. <http://doi.org/10.1073/pnas.0307803100>
- Oye, I., Paulsen, O., & Maurset, A. (1992). Effects of ketamine on sensory perception: evidence for a role of N-methyl-D-aspartate receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 260(3), 1209–1213.
- Palmer, A., & Good, M. (2011). Hippocampal synaptic activity, pattern separation and episodic-like memory: implications for mouse models of Alzheimer's disease pathology. *Biochemical Society Transactions*, 39(4), 902.
- Palmer, L. M., Shai, A. S., Reeve, J. E., Anderson, H. L., Paulsen, O., & Larkum, M. E. (2014). NMDA spikes enhance action potential generation during sensory input. *Nature Neuroscience*, 17(3), 383–390. <http://doi.org/10.1038/nn.3646>

- Parada-Turska, J., & Turski, W. A. (1990). Excitatory amino acid antagonists and memory: Effect of drugs acting at N- methyl-D-aspartate receptors in learning and memory tasks. In G. Lubec & G. A. Rosenthal (Eds.), *Amino Acids* (pp. 745–753). Springer Netherlands. Retrieved from [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-011-2262-7\\_90](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-011-2262-7_90)
- Pause, B. M., Jungbluth, C., Adolph, D., Pietrowsky, R., & Dere, E. (2010). Induction and measurement of episodic memories in healthy adults. *Journal of Neuroscience Methods*, 189(1), 88–96. <http://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.03.016>
- Pause, B. M., Zlomuzica, A., Kinugawa, K., Mariani, J., Pietrowsky, R., & Dere, E. (2013). Perspectives on Episodic-Like and Episodic Memory. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 7. <http://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00033>
- Paxinos, G. Watson, C. (2009). *The rat brain in stereotaxic coordinates*: Elsevier, 400 p.
- Peng, S., Zhang, Y., Ren, B., Zhang, J., & Wang, H. (2010). Effect of ketamine administration on memory consolidation, p-CREB and c-fos expression in the hippocampal slices of minor rats. *Molecular Biology Reports*, 38(4), 2401–2407. <http://doi.org/10.1007/s11033-010-0374-x>
- Peng, S., Zhang, Y., Zhang, J., Wang, H., & Ren, B. (2009). Effect of ketamine on ERK expression in hippocampal neural cell and the ability of learning behavior in minor rats. *Molecular Biology Reports*, 37(7), 3137–3142. <http://doi.org/10.1007/s11033-009-9892-9>
- Pietersen, C. Y., Bosker, F. J., Postema, F., Fokkema, D. S., Korf, J., & den Boer, J. A. (2006). Ketamine administration disturbs behavioural and distributed neural correlates of fear conditioning in the rat. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 30(7), 1209–1218. <http://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2006.02.019>
- Pitsikas, N., & Boultadakis, A. (2009). Pre-training administration of anesthetic ketamine differentially affects rats' spatial and non-spatial recognition memory. *Neuropharmacology*, 57(1), 1–7. <http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.03.015>
- Pitsikas, N., Boultadakis, A., & Sakellaridis, N. (2008). Effects of sub-anesthetic doses of ketamine on rats' spatial and non-spatial recognition memory. *Neuroscience*, 154(2), 454–460. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.04.001>

- Pittenger, C., Sanacora, G., & Krystal, J. H. (2007). The NMDA Receptor as a Therapeutic Target in Major Depressive Disorder. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets (Formerly Current Drug Targets)*, 6(2), 101–115. <http://doi.org/10.2174/187152707780363267>
- Prut, L., & Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*, 463(1–3), 3–33. [http://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01272-X](http://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01272-X)
- Puma, C., & Bizot, J.-C. (1998). Intraseptal infusions of a low dose of AP5, a NMDA receptor antagonist, improves memory in an object recognition task in rats. *Neuroscience Letters*, 248(3), 183–186. [http://doi.org/10.1016/S0304-3940\(98\)00358-9](http://doi.org/10.1016/S0304-3940(98)00358-9)
- Rao, V. R., & Finkbeiner, S. (2007). NMDA and AMPA receptors: old channels, new tricks. *Trends in Neurosciences*, 30(6), 284–291. <http://doi.org/10.1016/j.tins.2007.03.012>
- Reich, D. L., & Silvey, G. (1989). Ketamine: an update on the first twenty-five years of clinical experience. *Canadian Journal of Anaesthesia*, 36(2), 186–197. <http://doi.org/10.1007/BF03011442>
- Ribeiro, P. O., Valentim, A. M., Rodrigues, P., Olsson, I. A., & Antunes, L. M. (2012). Apoptotic neurodegeneration and spatial memory are not affected by sedative and anaesthetics doses of ketamine/medetomidine combinations in adult mice. *British Journal of Anaesthesia*, 108(5), 807–814.
- Riedel, G., Platt, B., & Micheau, J. (2003). Glutamate receptor function in learning and memory. *Behavioural Brain Research*, 140(1–2), 1–47. [http://doi.org/10.1016/S0166-4328\(02\)00272-3](http://doi.org/10.1016/S0166-4328(02)00272-3)
- Roesler, R., Luft, T., Oliveira, S. H. S., Farias, C. B., Almeida, V. R., Quevedo, J., ... Schwartsmann, G. (2006). Molecular mechanisms mediating gastrin-releasing peptide receptor modulation of memory consolidation in the hippocampus. *Neuropharmacology*, 51(2), 350–357. <http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.03.033>
- Rolls, E. T. (2010). A computational theory of episodic memory formation in the hippocampus. *Behavioural Brain Research*, 215(2), 180–196. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.03.027>

- Rolls, E. T., & Kesner, R. P. (2006). A computational theory of hippocampal function, and empirical tests of the theory. *Progress in Neurobiology*, *79*(1), 1–48. <http://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2006.04.005>
- Roozendaal, B. (2002). Stress and Memory: Opposing Effects of Glucocorticoids on Memory Consolidation and Memory Retrieval. *Neurobiology of Learning and Memory*, *78*(3), 578–595. <http://doi.org/10.1006/nlme.2002.4080>
- Roozendaal, B., McEwen, B. S., & Chattarji, S. (2009). Stress, memory and the amygdala. *Nature Reviews Neuroscience*, *10*(6), 423–433. <http://doi.org/10.1038/nrn2651>
- Sagar, S. M., Sharp, F. R., & Curran, T. (1988). Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science*, *240*(4857), 1328–1331. <http://doi.org/10.1126/science.3131879>
- Sakurai, S. Y., Penney, J. B., & Young, A. B. (1993). Regionally Distinct N-Methyl-D-Aspartate Receptors Distinguished by Quantitative Autoradiography of [3H]MK-801 Binding in Rat Brain. *Journal of Neurochemistry*, *60*(4), 1344–1353. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb03295.x>
- Schacter, D. L., & Addis, D. R. (2007). The cognitive neuroscience of constructive memory: remembering the past and imagining the future. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *362*(1481), 773–786. <http://doi.org/10.1098/rstb.2007.2087>
- Schacter, D. L., Addis, D. R., & Buckner, R. L. (2007). Remembering the past to imagine the future: the prospective brain. *Nature Reviews Neuroscience*, *8*(9), 657–661. <http://doi.org/10.1038/nrn2213>
- Scharfman, H. E. (1997). Hyperexcitability in Combined Entorhinal/Hippocampal Slices of Adult Rat After Exposure to Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Journal of Neurophysiology*, *78*(2), 1082–1095.
- Scharfman, H. E. (2007). The CA3 “backprojection” to the dentate gyrus. In H. E. Scharfman (Ed.), *Progress in Brain Research* (Vol. 163, pp. 627–637). Elsevier. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079612307630349>
- Scoville, W. B., & Milner, B. (1957). LOSS OF RECENT MEMORY AFTER BILATERAL HIPPOCAMPAL LESIONS. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, *20*(1), 11–21.
- Shekhar, A., Potter, W. Z., Lightfoot, J., Lienemann, J., Dubé, S., Mallinckrodt, C., ... Felder, C. C. (2008). Selective Muscarinic Receptor Agonist Xanomeline as a

- Novel Treatment Approach for Schizophrenia. *American Journal of Psychiatry*, 165(8), 1033–1039. <http://doi.org/10.1176/appi.ajp.2008.06091591>
- Slikker, W., Zou, X., Hotchkiss, C. E., Divine, R. L., Sadovova, N., Twaddle, N. C., ... Wang, C. (2007). Ketamine-Induced Neuronal Cell Death in the Perinatal Rhesus Monkey. *Toxicological Sciences*, 98(1), 145–158. <http://doi.org/10.1093/toxsci/kfm084>
- Smith, R. C., Lindenmayer, J.-P., Davis, J. M., Cornwell, J., Noth, K., Gupta, S., ... Lajtha, A. (2009). Cognitive and antismoking effects of varenicline in patients with schizophrenia or schizoaffective disorder. *Schizophrenia Research*, 110(1–3), 149–155. <http://doi.org/10.1016/j.schres.2009.02.001>
- Squire, L. R., Stark, C. E. L., & Clark, R. E. (2004). The Medial Temporal Lobe\*. *Annual Review of Neuroscience*, 27(1), 279–306. <http://doi.org/10.1146/annurev.neuro.27.070203.144130>
- Squire, L. R., & Zola, S. M. (1996). Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(24), 13515–13522.
- Steward, O. (1976). Topographic organization of the projections from the entorhinal area to the hippocampal formation of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 167(3), 285–314. <http://doi.org/10.1002/cne.901670303>
- Sutton, M. A., & Schuman, E. M. (2006). Dendritic Protein Synthesis, Synaptic Plasticity, and Memory. *Cell*, 127(1), 49–58. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.014>
- Szakacs, R., Janka, Z., & Kalman, J. (2012). The “blue” side of glutamatergic neurotransmission: NMDA receptor antagonists as possible novel therapeutics for major depression. *Neuropsychopharmacol Hung*, 14(1), 29–40.
- Tizabi, Y., Bhatti, B. H., Manaye, K. F., Das, J. R., & Akinfiresoye, L. (2012). Antidepressant-like effects of low ketamine dose is associated with increased hippocampal AMPA/NMDA receptor density ratio in female Wistar–Kyoto rats. *Neuroscience*, 213, 72–80. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.03.052>
- Treves, A., Naughton-Treves, L., Harper, E. K., Mladenoff, D. J., Rose, R. A., Sickley, T. A., & Wydeven, A. P. (2004). Predicting Human-Carnivore Conflict: a Spatial Model Derived from 25 Years of Data on Wolf Predation on Livestock. *Conservation Biology*, 18(1), 114–125. <http://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2004.00189.x>

- Treves, A., Tashiro, A., Witter, M. P., & Moser, E. I. (2008). What is the mammalian dentate gyrus good for? *Neuroscience*, *154*(4), 1155–1172. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.04.073>
- Tulving, E. (2001). Episodic memory and common sense: how far apart? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, *356*(1413), 1505–1515. <http://doi.org/10.1098/rstb.2001.0937>
- Tulving, E. (2002). Episodic Memory: From Mind to Brain. *Annual Review of Psychology*, *53*(1), 1–25. <http://doi.org/10.1146/annurev.psych.53.100901.135114>
- Tulving, E., & Markowitsch, H. J. (1998). Episodic and declarative memory: Role of the hippocampus. *Hippocampus*, *8*(3), 198–204. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1998\)8:3<198::AID-HIPO2>3.0.CO;2-G](http://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1998)8:3<198::AID-HIPO2>3.0.CO;2-G)
- Umbricht D, Schmid L, Koller R, Vollenweider FX, Hell D, & Javitt DC. (2000). Ketamine-induced deficits in auditory and visual context-dependent processing in healthy volunteers: Implications for models of cognitive deficits in schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*, *57*(12), 1139–1147. <http://doi.org/10.1001/archpsyc.57.12.1139>
- V, B., & Kesner, R. P. (1984). Serial position curves in rats: Automatic versus effortful information processing. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, *10*(4), 557–563. <http://doi.org/10.1037/0097-7403.10.4.557>
- Vago, D. R., Bevan, A., & Kesner, R. P. (2007). The role of the direct perforant path input to the CA1 subregion of the dorsal hippocampus in memory retention and retrieval. *Hippocampus*, *17*(10), 977–987. <http://doi.org/10.1002/hipo.20329>
- VanElzakker, M., Fevurly, R. D., Breindel, T., & Spencer, R. L. (2008). Environmental novelty is associated with a selective increase in Fos expression in the output elements of the hippocampal formation and the perirhinal cortex. *Learning & Memory*, *15*(12), 899–908. <http://doi.org/10.1101/lm.1196508>
- Vazdarjanova, A., & Guzowski, J. F. (2004). Differences in hippocampal neuronal population responses to modifications of an environmental context: evidence for distinct, yet complementary, functions of CA3 and CA1 ensembles. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *24*(29), 6489–6496. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0350-04.2004>
- Venâncio, C., Magalhães, A., Antunes, L., & Summavielle, T. (2011). Impaired spatial memory after ketamine administration in chronic low doses. *Current*

- Neuropharmacology*, 9(1), 251–255.  
<http://doi.org/10.2174/157015911795016912>
- Verma, A., & Moghaddam, B. (1996). NMDA receptor antagonists impair prefrontal cortex function as assessed via spatial delayed alternation performance in rats: modulation by dopamine. *The Journal of Neuroscience*, 16(1), 373–379.
- Vollenweider, F. X., Leenders, K. L., Øye, I., Hell, D., & Angst, J. (1997). Differential psychopathology and patterns of cerebral glucose utilisation produced by (S)- and (R)-ketamine in healthy volunteers using positron emission tomography (PET). *European Neuropsychopharmacology*, 7(1), 25–38.  
[http://doi.org/10.1016/S0924-977X\(96\)00042-9](http://doi.org/10.1016/S0924-977X(96)00042-9)
- Vranken, J. H., Troost, D., de Haan, P., Pennings, F. A., van der Vegt, M. H., Dijkgraaf, M. G. W., & Hollmann, M. W. (2006). Severe Toxic Damage to the Rabbit Spinal Cord after Intrathecal Administration of Preservative-free S(+)-Ketamine: *Anesthesiology*, 105(4), 813–818. <http://doi.org/10.1097/00000542-200610000-00028>
- Wang, C., Sadovova, N., Hotchkiss, C., Fu, X., Scallet, A. C., Patterson, T. A., ... Slikker, W. (2006). Blockade of N-Methyl-D-Aspartate Receptors by Ketamine Produces Loss of Postnatal Day 3 Monkey Frontal Cortical Neurons in Culture. *Toxicological Sciences*, 91(1), 192–201. <http://doi.org/10.1093/toxsci/kfj144>
- Warburton, E. C., Barker, G. R. I., & Brown, M. W. (2013). Investigations into the involvement of NMDA mechanisms in recognition memory. *Neuropharmacology*, 74, 41–47.  
<http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.04.013>
- Waxman, E. A., & Lynch, D. R. (2005). N-methyl-D-aspartate Receptor Subtypes: Multiple Roles in Excitotoxicity and Neurological Disease. *The Neuroscientist*, 11(1), 37–49. <http://doi.org/10.1177/1073858404269012>
- Wesierska, M., Macias-Gonzalez, R., & Bureš, J. (1990). Differential effect of ketamine on the reference and working memory versions of the Morris water maze task. *Behavioral Neuroscience*, 104(1), 74–83. <http://doi.org/10.1037/0735-7044.104.1.74>
- Wilson, D. I. G., Watanabe, S., Milner, H., & Ainge, J. A. (2013). Lateral entorhinal cortex is necessary for associative but not nonassociative recognition memory. *Hippocampus*, 23(12), 1280–1290. <http://doi.org/10.1002/hipo.22165>

- Wimpey, T. L., & Chavkin, C. (1991). Opioids activate both an inward rectifier and a novel voltage-gated potassium conductance in the hippocampal formation. *Neuron*, *6*(2), 281–289. [http://doi.org/10.1016/0896-6273\(91\)90363-5](http://doi.org/10.1016/0896-6273(91)90363-5)
- Winters, B. D., & Bussey, T. J. (2005). Glutamate Receptors in Perirhinal Cortex Mediate Encoding, Retrieval, and Consolidation of Object Recognition Memory. *The Journal of Neuroscience*, *25*(17), 4243–4251. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0480-05.2005>
- Winters, B. D., Saksida, L. M., & Bussey, T. J. (2008). Object recognition memory: Neurobiological mechanisms of encoding, consolidation and retrieval. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *32*(5), 1055–1070. <http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.04.004>
- Witter, M. P. (2007). Intrinsic and extrinsic wiring of CA3: Indications for connectional heterogeneity. *Learning & Memory*, *14*(11), 705–713. <http://doi.org/10.1101/lm.725207>
- Wolff, D. K., & Winstock, A. R. (2012). Ketamine. *CNS Drugs*, *20*(3), 199–218. <http://doi.org/10.2165/00023210-200620030-00003>
- Xavier, G. F., Oliveira-Filho, F. J. B., & Santos, A. M. G. (1999). Dentate gyrus-selective colchicine lesion and disruption of performance in spatial tasks: Difficulties in “place strategy” because of a lack of flexibility in the use of environmental cues? *Hippocampus*, *9*(6), 668–681. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1999\)9:6<668::AID-HIPO8>3.0.CO;2-9](http://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1999)9:6<668::AID-HIPO8>3.0.CO;2-9)
- Yan, J., & Jiang, H. (2014). Dual Effects of Ketamine: Neurotoxicity Versus Neuroprotection in Anesthesia for the Developing Brain. *Journal of Neurosurgical Anesthesiology*, *26*(2), 155–160. <http://doi.org/10.1097/ANA.0000000000000027>
- Yaski, O., & Eilam, D. (2007). The impact of landmark properties in shaping exploration and navigation. *Animal Cognition*, *10*(4), 415–428. <http://doi.org/10.1007/s10071-007-0073-8>

## 9. ANEXO

### 9.1 Artigo para submissão

Revista *Neurobiology of Learning and Memory* (Classificação Qualis CAPES A1 e Fator de Impacto 4.035, Abril de 2015).

#### **Episodic-like memory impairment induced by Ketamine: distinct c-Fos expression as a functional marker in dorsal hippocampus subregions**

Ingrid Brasilino Montenegro Bento de Souza; Priscila Tavares Macêdo; Ywilliane da Silva Rodrigues Meurer; Regina Helena da Silva; Flávio Freitas Barbosa.

#### **Abstract**

Episodic-like memory refers to integration of where and when a certain event (what) happened. The dorsal hippocampal mediates episodic recall and depends on glutamatergic neurotransmission, particularly AMPA and NMDA receptors (NMDAr). Ketamine is a non-competitive NMDA antagonist with effect on cognitive performance and plasticity. The goal of this study was to evaluate the acute action of Ketamine on behavioral and neurochemical aspects of episodic-like memory through immediate-early gene expression (IEG), c-Fos, in dorsal hippocampus. We applied the episodic-like memory task by Kart-Teke et al., 2006. Forty-six 3-month-old male Wistar rats were separated in five groups. The home cage group was used to measure IEG basal expression. The remaining four groups went through the behavioral test. One of them received saline 0.9% and the other two received 8 mg/kg or 15 mg/kg ketamine ip immediately after the second sample, while the control group received no treatment. The data indicate that control rats could integrate the three elements of episodic-like memory. The control group had the highest c-Fos expression in the dentate gyrus when compared to the other groups, suggesting the role of this sub-region for integration of episodic-like memory. The two sub-anesthetic doses of ketamine induced a deficit for this type of memory. The highest dose demonstrated a possible hypolocomotion effect, characterized by decreasing of total distance traveled and speed, compared to the other groups at the test session. In short, the deficit of episodic-like memory was characterized both as amnesic effect of ketamine and as decrease of c-Fos in the dentate gyrus of those groups, suggesting a possible role of this field in episodic-like memory formation.

#### **Introduction**

Episodic-like memory is a subtype of declarative memory and it refers to features of when and where a unique episode happened in an integrative manner (Clayton, Bussey, & Dickinson, 2003). Rats have ability to use this type of memory by associations of place, temporal order and objects in a unique task using their natural exploratory behavior (Ekrem Dere, Huston, & De Souza Silva, 2005a, 2005b; Kart-Teke, De Souza Silva, Huston, & Dere, 2006). A variation of object recognition test (Ekrem Dere, Huston, & De Souza Silva, 2007; Kart-Teke et al., 2006) was developed to assess the episodic

content in rodents. Acquisition and encoding of an event with associations between temporal order and specific spatial locations is mediated by hippocampal networks with neocortical areas (Ergorul & Eichenbaum, 2004; Schacter, Addis, & Buckner, 2007; Addis, Wong, & Schacter, 2008; DeVito & Eichenbaum, 2011; Barbosa, de Oliveira Pontes, Ribeiro, Ribeiro, & Silva, 2012; Barbosa et al., 2013; Wilson, Watanabe, Milner, & Ainge, 2013). According to computational models, dorsal hippocampal subregions have different functions in spatial-temporal processing (Kesner, Taylor, Hoge, & Andy, 2015)

NMDAR are widely distributed in the brain, especially in the hippocampus and neocortex (Sakurai, Penney, & Young, 1993; Monaghan, Andaloro, & Skifter, 1998; Riedel, Platt, & Micheau, 2003), taking part in episodic memory processing (Chrobak, Hinman & Sabolek, 2008). Ketamine [(2-(2-Chlorophenyl)-2-(methylamino)cyclohexanone)] is a noncompetitive antagonist of NMDA receptor and, although the stereoselectivity, its effects on memory performance could be mediated by NMDA antagonism (Riedel et al., 2003; Canolty et al., 2006; Mion & Villeveille, 2013). Subanesthetic and acute doses of Ketamine showed deficits in recognition tasks and may impair acquisition, encoding and retrieval of spatial and non-spatial memory tasks for rodents (N. Pitsikas, Bouladakis, & Sakellaridis, 2008; Nikolaos Pitsikas & Bouladakis, 2009; Bouladakis & Pitsikas, 2011; Venâncio, Magalhães, Antunes, & Summavielle, 2011). Thus, might alters the plastic levels in the hippocampus (Pietersen et al., 2006; Garcia et al., 2008, 2009; Goulart et al., 2010; Duman, Li, Liu, Duric, & Aghajanian, 2012).

c-Fos is a type of immediate early genes and for this reason has a temporal advantage for do not require previous protein synthesis to be activated (Herrera & Robertson, 1996). This particular group of IEGs, characterized by regulatory transcription factor, had a role in long-term plasticity, including learning and memory. Frequently, c-Fos is used to a marker for neural activity because it had a rapidly increase and then a peak in 60min until 90min (Guzowski, 2002; Countryman, Orłowski, Brightwell, Oskowitz, & Colombo, 2005; Katche et al., 2010). Behavioral, environmental or pharmacological stimulus, including Ketamine (Imre, Fokkema, Boer, & Ter Horst, 2006) might be sufficient to alter the c-Fos expression (Kubik, Miyashita, & Guzowski, 2007). Environmental novelty can induce increase in c-Fos expression in the hippocampal formation (VanElzakker, Fevurly, Breindel, & Spencer, 2008) and this changes in hippocampal activity were seen when novelty stimulus were rearranged in a spatial configurations (Aggleton, Brown, & Albasser, 2012; Seoane, Tinsley, & Brown, 2012; Kinnavane, Albasser, & Aggleton, 2015). However, it is not known how ketamine can influence the integration of episodic-like memory aspects as well as how can it affect dorsal hippocampal plasticity. Once NMDAR has a role on mnemonic consolidation process, we hypothesize that ketamine would impair episodic-like memory formation in addition to alter dorsal hippocampal activity. Thus, the aim of this study was to measure the acute action of Ketamine in an episodic-like memory task and how the dorsal hippocampus are involved in this process through immediate-early gene expression (IEG), specifically c-Fos.

## 1. Methods

### 2.1. Animals

Forty-six 3-month-old male Wistar rats (280-400 g) were housed four per cage with controlled temperature ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ) and a 12:12 h light/dark cycle (lights on at 5.00 a.m.). The water and food were available ad libitum. Before the experiments starts, the animals were handled for 5 days/10min each day. During the behavioral procedure, the open-field was lit by 40 lux. All procedures were approved by the local ethics committee (protocol number 0102/2014) accordingly to Brazilian law (Number 11.794) to minimize animal's suffering or discomfort.

### 2.2. Apparatus and objects

Episodic-like memory task was conducted in a circular open-field (60 cm in diameter x 40cm height wall, made by acrylic). There were proximal and external visual cues that rats could use for spatial learning. Six types of objects were randomized among the experiments. All these were made of plastic and had a different shape, texture, color and size (height: 5 - 15 cm, width: 5 - 10 cm). They had a sufficient weight to ensure the animals could not displace them. After each behavioral session, the apparatus and objects were cleaned with a 5% alcohol solution. All objects and spatial location in this protocol were randomized among groups. We used a camera (model C270 HD, Logitech) above the open-field to record all sessions. An animal tracking software (Ethowatcher, UFSC, Brazil and Anymaze, Stoelting, USA) registered the behavioral parameters. All experiments were conducted between 12:00 and 17:00 h.

### 2.3. Groups and treatment

Rats were divided into five groups. The home cage group (n=6; without apparatus exposure) was used to measure IEG basal expression. The other four groups, with 10 rats each, went through the behavioral test. One of them received saline 0.9% and the other two received 8 mg/kg or 15 mg/kg Ketamine i.p. immediately after the second sample, while the control group received no treatment. The sub anesthetic doses of Ketamine (@ Ketamina Agener 10%) were used in previous protocols (Garcia et al., 2008, 2009; Goulart et al., 2010; Moosavi, Yadollahi Khales, Rastegar, & Zarifkar, 2012)

## 2. Procedure design

During three days before the task, all animals were habituated to the circular open-field (10 minutes for session). Episodic-like memory task comprised of two training trials and a test session of five minutes each. This task was based on the natural exploratory behavioral to detect novelty in an object recognition (Barbosa et al., 2013; Kesner et al., 2015). In the first training, the animal was placed in a circular open field to explore four similar objects (A), after a 1 hour, the rats started a second sample with four other objects (B), two of those appeared in different spatial locations for the first sample. In the test, four objects were shown, two early (B) and two older (A), two displaced (A2, B2) and two stationary (A1 and B1). Experimental design is schematized in Figure x . It is expected that rats explore the recent displaced object (B2) more than the recent stationary object (B1). For the old objects the rats should explore the opposite pattern (A1>A2). This pattern could indicate that the rats integrated the “what-where-when” components

of the episodic-like memory (Kart-Teke et al., 2006; Inostroza, Brotons-Mas, Laurent, Cid, & Prida, 2013; Chao, Nikolaus, Huston, & de Souza Silva, 2014).

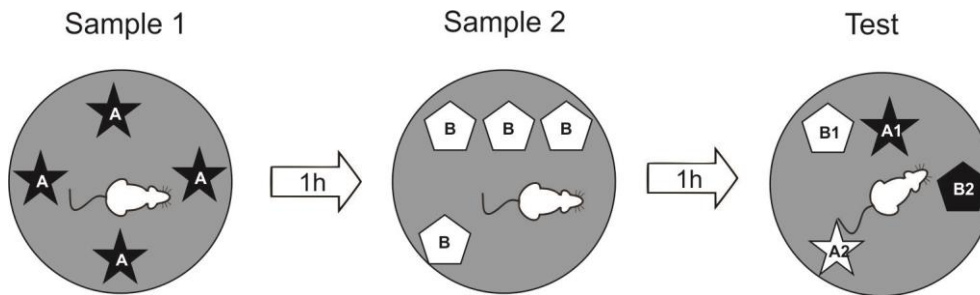


Figure 1. Example of the episodic-like memory task for rats. This task has two samples and a test session of 5 minutes each with one hour of interval among these. In the first sample four equals objects were presented at a specific location. After delay, other four objects were presented, two willing in the same locations of first sample and two at new locations. For the test session, two older objects and two recent were presented. Based on samples, objects could be stationary (A1 and B1) or in different locations (A2 and B2).

### 3.1. Immunohistochemistry

One hour after the last behavioral procedure, rats (three per group) were deeply anesthetized with intraperitoneal injection of the sodium thiopental (40 mg/kg) and perfused transcardially with 200 ml of phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, followed by 300 ml of 4.0% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 (fixative solution). This interval was required aiming the expression peaks of c-Fos (Bisler et al., 2002). The brains were removed from the skull, post-fixed in fixative solution for 2–4 h, and transferred to a solution containing sucrose 30% in 0.1 M PBS, pH 7.4. Each brain was serially cut in the coronal plane into 30- $\mu$ m thick sections with a cryostat microtome (Leica, Germany) at a temperature of  $-20^{\circ}\text{C}$ . The sections were placed sequentially in four compartments (one section per compartment), with the distance between one section and the next in the same compartment being approximately 120  $\mu$ m. All sections were stored in antifreeze solution. For the detection of c-Fos, free-floating sections were incubated for 18–24 h with a monoclonal primary antibody raised in rabbits (c-Fos antibody, 1:1000; SC-52 - Santa Cruz Biotechnology, INC., Texas, USA), containing 2% goat normal serum (Sigma Chemical Company), diluted in 0.3% Triton X-100 (ICN Biomedicals), and 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. Afterward, the sections were incubated with the biotinylated secondary anti-rabbit antibody raised in goat (BA-1000, VECTASTAIN® ABC kits, Vector laboratories, CA, USA), also diluted in 0.3% Triton X-100 and 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. This procedure lasted 2 h and was performed at room temperature. Shortly after, the sections were washed and incubated in 2% avidin-biotin-peroxidase solution (ABC Elite kit, Vector Labs, Burlingame, CA, USA) for 90 min. The reaction was developed by the addition of 2.5% diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma, St. Louis, MO, USA) and 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. The sections were washed (four times, 5 min) with 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, between each step and at the end of the procedure. Afterward, the sections were dried, dehydrated in a graded alcohol series, cleared in xylene, and coverslipped with Entellan (Merck).

### 3.2. c-Fos positive cell count

Using the coordinates of Paxinos and Watson atlas (2009), the sections were examined under brightfield illumination (Olympus Microscope, BX-41) and images were captured using a CCD camera (Nikon, DXM-1200). Positive c-Fos cells were counted into the dorsal hippocampal subregions (CA1, CA3ab, CA3c and DG). The cell count was performed manually by a blinded experimenter to groups through Image J software (1.46i, NIH). For each animal, we recruited four sections and the mean count was calculated and used in the analysis. Each mean for brain area and group was normalized by mean values of the home cage group.

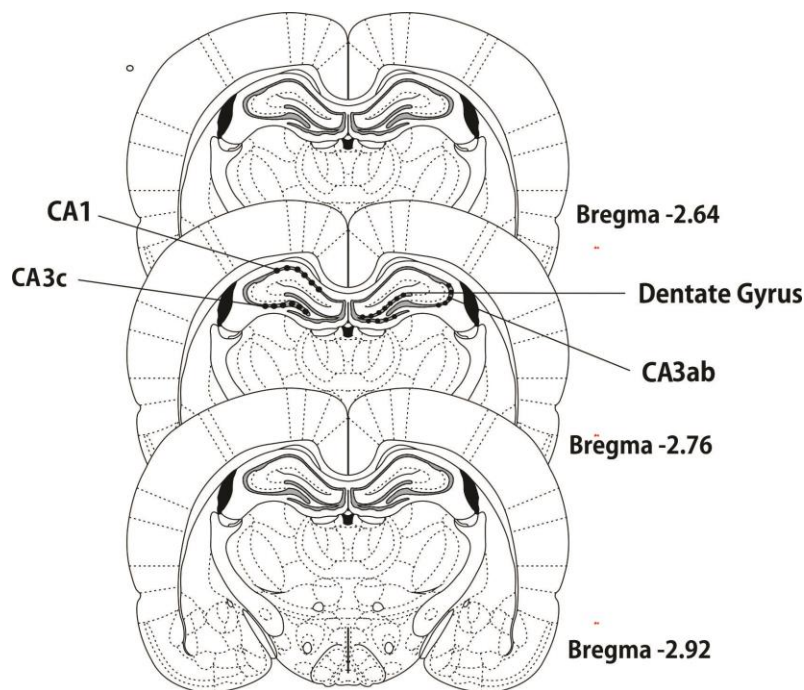


Figure 2. Example of coordinates, based in Paxinos and Watson atlas (2007), and schematic anatomy of hippocampal subfields (CA1, CA3 ab, CA3 c and Dentate Gyrus)

### 3.3. Data collection and analysis

The behavior measures were made by a blinder experimenter for groups. In all sessions were calculated distance, speed and time of exploration.. The exploration ratio and discrimination ratio of the four objects in the test session were calculated. The exploration ratio was calculated for olds and recent, displaced and stationary, objects in the test session (for example: Time exploring Old stationary/Total time exploration). Discrimination ratio was calculated for three aspects of episodic-lime memory. “When” (Time exploring Old stationary - Time exploring Recent stationary/ Time exploring Old stationary + Time exploring Recent stationary), “Where” (Time exploring Recent displaced - Time exploring Recent stationary/ Time exploring Recent displaced + Time exploring Recent stationary) and “Integration ratio” (Time exploring Old stationary - Time exploring Old displaced/ Time exploring Old displaced + Time exploring Old stationary) (Chao et al., 2014). Exploration was defined when the animals approached an object and had physical contact with it, either with the forepaws and/or snouts.

The Shapiro-Wilk test indicated normal data distribution for total distance traveled, total time exploring the objects and the discriminations ratios. However, the explorations ratios did not have normal distribution. Total distance traveled and total time exploring the objects in the last session were analyzed by repeated measures ANOVA [3x4] to feature possible difference in motivation or exploration between groups. For the behavioral data, post hoc analysis was conducted by Bonferroni's test. A priori planned Wilcoxon test was conducted to compare pairs of objects (A1 × A2; B2 × B1; A1 × B1) for each group. One-way ANOVAs and Welch's test were used for comparison of the number of positive c-Fos neurons between groups in each hippocampal subregion. A Tukey–Kramer and Games-Howel's test was used as *post hoc*. Results with normal data were expressed as mean ± SEM, but were used median for non-parametric analysis. Effects were considered significant when  $p < 0.05$ .

## 4. Results

### 4.1 Behavioral set (Behavioral parameters)

Wilcoxon test showed statistically significant differences between these pairs of objects in the control group. These animals explored more A1 than A2 [ $T = -2,807$ ;  $p=0,005$ ;  $d=1,8$ ;  $r=0,99$ ], more A1 than B2 [ $T = -2,803$ ;  $p=0,005$   $d=1,6$ ;  $r=0,99$ ] and A1 than B1 [ $T = -2,810$ ;  $p=0,005$ ;  $d=3$ ;  $r=0,99$ ] (Fig.). The saline group demonstrated the same exploration pattern of control group for comparisons between A1>A2 [ $T = -2,807$ ;  $p=0,005$ ;  $d=1,8$ ;  $r=0,99$ ] and B2>B1 [ $T = -2,803$ ;  $p=0,005$   $d=1,6$ ;  $r=0,99$ ], but statistical differences were not found between A1 and B1 [ $T = -2,810$ ;  $p=0,005$ ;  $d=3$ ;  $r=0,99$ ], as showed in figure 3. As expected, animals with the 1 h delayed group exhibited memories for “where”, “when” and “integration”. Comparing the ratios at chance, the control (“when” [ $T = -4,056$ ,  $p=0,003$ ]; “where” [ $t = 5,657$ ,  $p=0,001$ ]) and saline group (“when” [ $T = -2,756$ ,  $p=0,022$ ]; “where” [ $t = 1,321$ ,  $p=0,219$ ]). Although the saline group did not discriminate the temporal order, the data indicate that these rats could integrate the three elements of episodic-like memory when compared the integration ratio (“what-where-when”) from zero, in both groups (Control [ $t = 5,024$ ,  $p=0,001$ ] and Saline [ $t = 2,966$ ,  $p=0,016$ ]).

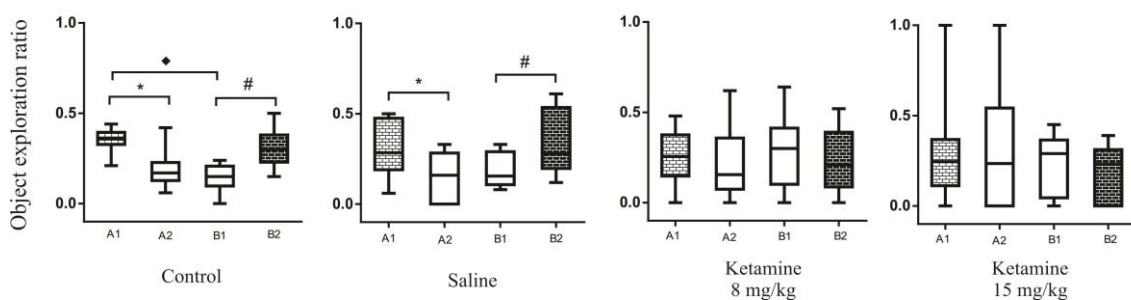


Figure 3. Exploration ratio in the test session for groups control, saline and Ketamine (8 and 15 mg/kg). The graphics represents median and interquartile interval. \* Significant comparisons between a pair of objects A1>A2. # Significant comparisons between a pair of objects B2>B1. ♦ Significant comparisons between a pair of objects A1>B1.

However, the group Ketamine 8 mg/kg were not able to distinguish between these pairs of objects (A1xA2 [T = -0,612; p=0,541; d=0,1; r=0,05] B1xB2 [T = -0,561; p=0,575; d=0,1; r=0,07] A1XB1 [T = -0,357; p=0,721; d=0,1; r=0,06]). According to Wilcoxon's test, Ketamine 15 mg/kg group did not follow the exploration pattern for episodic recall (A1xA2 [T = -0,204; p=0,838; d=0,06; r=0,05] B1xB2 [T = -0,845; p=0,398; d=0,3; r=0,17] A1XB1 [T = -0,533; p=0,594; d=0,16; r=0,07]). Both groups did not show significant differences from zero in the discrimination ratios. A one-sample t-test for Ketamine 8 mg/kg showed that the group did not discriminate "when ratio" [T=1,321, p=0,219], "where ratio" [t= 0,256, p=0,804] or integrated "what-when-where" content [t= 0,674, p=0,517] as a chance. This pattern were repeated for Ketamine 15 mg/kg to "when ratio" [t= -0,066, p=0,949]; "where ratio" [t= 0,979, p=0,353] and "integration ratio" [t= 0,410, p=0,691], as showed in figure 4.

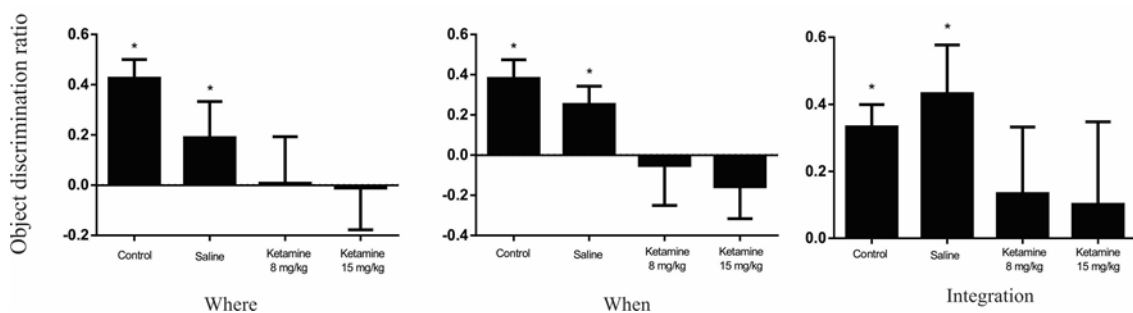


Figure 4. Discrimination for "where", "when" and "integration" ratio between groups control, saline and Ketamine (8 and 15 mg/kg). The graph represents the mean  $\pm$  SEM. \* Significant comparisons in relation to chance.

Two sub-anesthetic doses of ketamine induced a deficit for this type of memory. The highest dose demonstrated a possible hypolocomotion effect, characterized by decreasing of total distance traveled and speed, compared to the others groups at the test session, as showed in table 1.

Table 1. Mean  $\pm$  SEM for total distance travelled, speed and total exploration time in two sample trails and test session.

	Control	Saline	Ketamine 8 mg/kg	Ketamine 15 mg/kg
<b>Total distance (m)</b>				
Sample one	6,38 $\pm$ 1,84	8,49 $\pm$ 3,33	7,72 $\pm$ 1,75	8,80 $\pm$ 1,87
Sample two	6,25 $\pm$ 3,20	8,38 $\pm$ 5,20	7,65 $\pm$ 1,94	7,06 $\pm$ 2,12
Teste session	7,53 $\pm$ 4,59	5,15 $\pm$ 3,18	5,17 $\pm$ 2,18	3,03 $\pm$ 2,27*
<b>Speed (m/s)</b>				
Sample one	0,03 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01
Sample two	0,02 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,02	0,03 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,01
Teste session	0,03 $\pm$ 0,02	0,02 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,01	0,01 $\pm$ 0,01*
<b>Total exploration (s)</b>				
Sample one	26,97 $\pm$ 6,14	41,43 $\pm$ 19,34	42,30 $\pm$ 15,06	33,90 $\pm$ 7,00
Sample two	30,50 $\pm$ 13,76	29,87 $\pm$ 8,96	40,27 $\pm$ 21,85	32,25 $\pm$ 10,80
Teste session	25,33 $\pm$ 12,60	25,20 $\pm$ 9,55	26,06 $\pm$ 21,65	11,80 $\pm$ 9,47*

#### 4.1 c-Fos expression

The Welch's analysis revealed significant difference of c-Fos expression in CA1 among groups [Welch (33,936); p=0,002]. Games-Howel's post hoc showed an increase of c-

Fos in CA1 for all groups when their compared to home cage group (Control [p=0,05], Saline [p=0,016], Ketamine 8 mg/kg [p=0,019] and Ketamine 15 mg/kg [p=0,014]). The same analyses to CA3ab showed different expression of c-Fos among groups [Welch (89,466); p=0,001]. Games-Howel's test indicated an increase for groups Saline (p=0,04) and Cetamine 15 mg/kg (p=0,001) when compared to home cage. A one-way ANOVA reveled differences to positive c-Fos cells in CA3c [F=(4,14) = 7,369, p=0,005] and Tukey HSD characterized this differences as an increased expression for Control [p = 0,05], Ketamine 8 mg/kg [p=0,065] and Ketamine 15 mg/kg [p=0,002] relative to home cage rats. The total number of c-Fos in DG showed a statistical difference [F(4,14) = 18,127, p= 0,001]. All groups showed an increased compared to home cage (Control [p =0,001], Saline [p=0,005], Ketamine 8 mg/kg [p=0,037] e Ketamine 15mg/kg [p=0,027]). Nevertheless, the control group had the highest c-Fos expression in the dentate gyrus when compared to the others groups (Saline. [p=0,003], Ketamine 8 mg/kg [p=0,004] and Ketamine 15 mg/kg [p =0,005]), suggesting the role of this subregion for integration of episodic-like memory. Mean results for counts in all groups and representative images of some areas are displayed are shown in Figure 5.

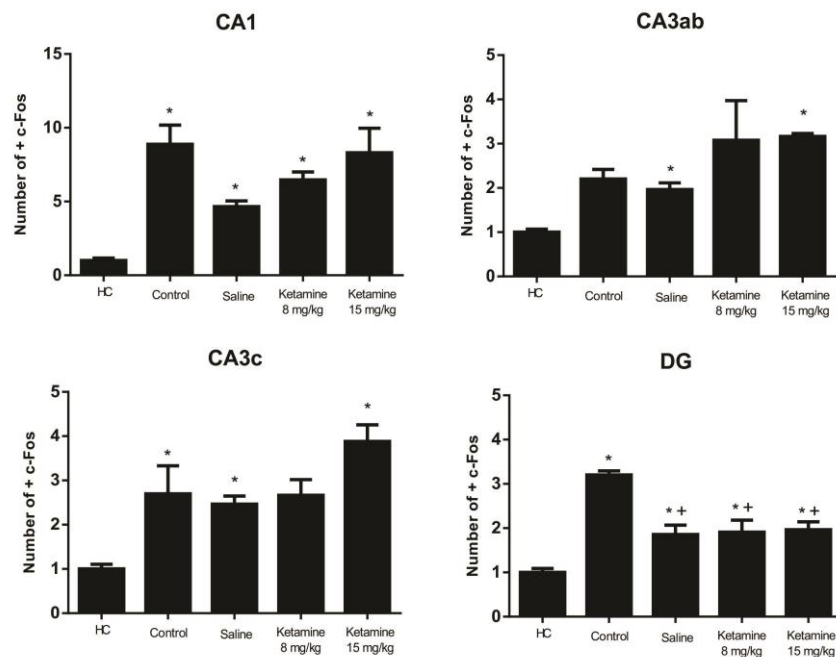


Figure 5. Number of c-Fos positive cells in regions CA1, CA3 ab, CA3 c and Dentate Gyrus (DG) between groups home cage, control, saline and Ketamine (8 and 15 mg/kg). The graph represents the mean  $\pm$  SEM. \* Significant comparisons with home cage group + Significant comparisons with control group.

## 5. Discussion

In this paper, we evaluated the effect of subanesthetic doses of Ketamine in episodic-like memory task and whereby it could alter the pattern of expression c-Fos in the hippocampal subregions. In this task, rats must discriminate the order of presentation and positions through the recollection process for item, space and temporal order in an integrative manner (E. Dere, Kart-Teke, Huston, & De Souza Silva, 2006; Ekrem Dere et al., 2007; Kart-Teke et al., 2006). The acute Ketamine action can affect cognitive function, especially learning and memory in a various types of task, as spatial or non-

spatial and task for temporal order (Riedel et al., 2003; Nikolaos Pitsikas & Boultradakis, 2009; Chrobak et al., 2008; Venâncio et al., 2011; Boultradakis & Pitsikas, 2011; Moosavi et al., 2012).

As expected for behavioral of episodic-like memory, control rats spent more time exploring the displaced recent object (B2) compared to the stationary recent object (B1), indicating spatial novelty. In addition, control rats spent more time exploring the old stationary (A1) more than the recent stationary (B1), indicating the temporal order. The main result is an inverse exploration pattern for the old objects ( $A1 > A2$ ) (Kart-Teke et al., 2006; Li & Chao, 2008; Inostroza et al., 2013; Chao et al., 2014). This opposite pattern is a possible behavioral indicative that an integrative what-where-when memory and the discrimination ratio confirmed this element in our results (Figura 4). Our protocol had minor modifications for episodic task of (Kart-Teke et al., 2006). The delay between the training and used test was modified 50 minutes to 1 hour. We replaced the square arena in the original study for circular open-field, to reduce the rodent's preference for corners, which could generate a spatial interference (Yaski & Eilam, 2007)

The saline group integrated the episodic behavioral criteria with significant differences in their rates of exploration and discrimination between pairs of old objects ( $A1 > A2$ ) and recent ( $B2 > B1$ ). However, unlike the control group, this group showed only a tendency to discriminate the temporal aspect, comparing the order of appearance of objects (A1 and B1). Behavioral differences may relate to vehicle administration immediately after the second sample. In fact, the saline injection can cause acute stress (Nagel & Huston, 1988) and cause memory deficits (Baker & Kim, 2002) including interference in the acquisition of episodic-like memory (Kart-Teke et al., 2006). This interference could activate the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis linking the stressor stimulus, injection of the vehicle, to the release of stress hormones (Roosendaal, 2002; Roosendaal, McEwen, & Chattarji, 2009). In our data, the stressor after training may have influenced the memory trace that was still labile and thus have influenced the exploratory natural tendency of rodents in the test session and so the recognition of events order.

As a non-competitive NMDA antagonist, Ketamine would disrupted both the elements of episodic-like memory' ("what-where-when") and their integration. The exploration ratio (figure 3) and discrimination ratio showed exploration at chance levels for both groups. Possibly the Ketamine blocked the consolidation and recall for item, space and time. Because of ketamine's stereoselective, characterized by isomers, this substance can act not only in glutamatergic systems but also in colinergic and opioid (Wolff & Winstock, 2012; Mion & Villevieille, 2013). Indirectly, ketamine may interfere in modulating cognitive functions, including attention and processing of learning and memory through its interaction with the cholinergic system (Everitt & Robbins, 1997).

An important advantage of the current protocol was that we used the acute administration of ketamine. Chronically, sub-anesthetic dose of ketamine caused injury in the storage and retrieval of object recognition (Boultradakis & Pitsikas, 2011). In sub-anesthetic doses (10mg / kg) administered chronically, Ketamine reduced the habituation of rodents as well as the ability to use spatial cues (Venâncio et al., 2011) Rats are sensitive to change in spatial location of objects (Jourdi et al., 2009; Aggleton et al., 2012), so this visual impairment may be related to the modulation of opioid receptors by ketamine. This

receptor type is presents in the hippocampus (Derrick, Weinberger, & Martinez Jr., 1991; McGaugh, 2000) and may modulate the memory by input information through perforating pathway. The perforating pathway presents two input's: the medial and lateral. The first one processes spatial information and is related to activation of NMDA receptors. The lateral portion is responsible for the entry of visual sensory information through activation of opioid receptors (Dees & Kesner, 2013) Ketamine action on opioid receptors might impair the ability of rats to navigate spatially through the distal and proximal cues in the two doses used, disrupting the spatial aspect of episodic-like memory. Although the impaired of spatial location was not seen when the dose of 15 mg / kg was administered acutely and tested for the memory consolidation in the Morris water maze in rats (Moosavi et al., 2012). Suggesting that this modulation of spatial memory by Ketamine also depends on the memory task (Ribeiro, Rodrigues, Valentim, & Antunes, 2013)

Ketamine, reduced the total exploration time in the test session and it might be involves to reduce the novelty discrimination of "where", "when" and the integration. The highest dose of ketamine reduced the total distance travelled, speed and a total exploration time in the test session. In our data, ketamine at a dose of 15 mg / kg showed reduction of locomotion and average speed, characterizing sedation. This sedative effect can be mediated by the ability of the analgesic substance strongly related to the isomer S - (+) – Ketamine (Mion & Villeveille, 2013). This reduced exploration time, probably led to a less discrimination to the novelty of the parameters "where", "when" and for integration (Figure 4). As showed in table 1, the hypolocomotion is likely linked to ketamine in a dose-dependent administration (Imre et al., 2006) and not disrupted by habituation to the arena.

c-Fos is a functional marker for environmental or behavioral stimulations in brain regions and it is widely used to marker neuronal plasticity after memory tasks (Guzowski, Knierim, & Moser, 2004; Kubik et al., 2007; Albasser et al., 2013; Kinnavane et al., 2015). Castilla-Ortega et al (2012) already described an increase in CA1 after episodic-like memory task. In our results, all groups showed an increase of c-Fos positive cell in CA1 compared to home cage group. The control group was able to discriminate the temporal pattern in behavioral task and following some studies that showed this subregion is involved in temporal information, including spatial-temporal tasks (Hoge & Kesner, 2007; Vago, Bevan, & Kesner, 2007). The behavioral temporal aspect was disrupted by saline injection and this group showed a reduced of cells positive c-Fos in CA1. This subregion has a role in the formation of a strong memory trace for a temporally oldest location (Lee & Kesner, 2003; Hoge & Kesner, 2007). Lesions in this region affect the preference for primacy (Brown & Aggleton, 2001). Importantly, this reduction of c-Fos expression, even not significantly, might be related to the stressor event prior to the test session. However, in the present study we did not find any differences among experimental groups and it is difficult to establish any relation between memory performance and c-Fos CA1 expression.

Bilateral electrolytic lesions in CA3 damaged the episodic integration (Li & Chao, 2008). Barbosa et al (2013) did not found increase in c-Fos in the region after the episodic memory task. Most studies explores the evaluation of c-Fos in CA3 as a homogeneous region (Albasser, Poirier, & Aggleton, 2010; Aggleton et al., 2012; Albasser et al., 2013; Barbosa et al., 2013). Our data support the hypothesis that CA3 is able to mediate

associations between arbitrary pairs of stimuli (Gilbert & Kesner, 2003; Rolls & Kesner, 2006), but also indicate that CA3 is a heterogeneous region (Hunsaker, Rosenberg, & Kesner, 2008) by their distinct connections, including its backprojections to dentate gyrus (Scharfman, 2007; Witter, 2007). The control group showed no significant expression of c-Fos in CA3ab region, reinforcing the idea that this region is not essential to the pattern separation process (Hunsaker et al 2008) in episodic integration. However, in CA3c both the control group and the saline showed significant increase of c-Fos. In this case, dorsal CA3c showed a functional role in episodic-like memory processing, possibly mediating the pattern separation to geometric and metrics changes in the environment in addition changes in temporal order of object's presentation. According to Li & Chao, 2008, CA3 is also involved in a temporal information processing.

In general, the increase of c-Fos expression in CA1, CA3ab and CA3c for the groups that received Ketamine might be explained by the action of this substance. Although Ketamine block NMDAR, indirectly, it can mediate the activation of AMPA receptors and voltage dependent calcium channels. The increase of calcium influx would activate signaling pathways that form a complex between proteins of transcription factors, such as kinases, controlling the expression of a large number of genes, including c-Fos, or a neurotropic factors, as BDNF (Flavell & Greenberg, 2008; Machado-Vieira, Salvadore, DiazGranados, & Zarate Jr., 2009; Niciu, Henter, Luckenbaugh, Zarate, & Charney, 2014).

Following Barbosa et al 2013, our results of c-Fos expression showed a greater activation in the Dentate Gyrus. This subregion is implicated in spatial novelty and possibly is essential to the spatial pattern separation (Norman & O'Reilly, 2003; Kesner, 2007; Leutgeb, Leutgeb, Moser, & Moser, 2007; Treves, Tashiro, Witter, & Moser, 2008). 1 hour after episodic task there was an increase of c-Fos expression in the dentate gyrus in all groups compared to the home cage group (Figure 5). In fact, the control group had an increase of c-Fos expression, differing from the others groups. This data reinforce the hypothesis that the dorsal dentate gyrus is essential to the process of spatial pattern separation (Gilbert, Kesner, & Lee, 2001; Leutgeb et al., 2007; Treves et al., 2008) and thus is involved in the rapid formation of episodic memory (Lassalle, Bataille, & Halley, 2000; Barbosa et al., 2013). It is known that lesions in this subregion can impair the rat ability to detect and final metric changes in the location of objects (Leutgeb et al., 2007; Hunsaker et al., 2008; Dees & Kesner, 2013; Kesner et al., 2015). Our data indicate a possible pattern of neural networks in episodic task involving mainly the activation of dorsal GD in fine detection capability of the novelty, which was damaged by acute administration of ketamine. The amnesiac effect of ketamine possibly caused interference not only in glutamatergic system but also in other neurotransmitter systems, as cholinergic or opioid systems.

## 6. Conclusion

In summary, Wistar rats are able to recall unique episodes through associations of spatial-temporal episodes order. This integration pattern of control group was revealed by an increase of c-Fos in CA1 e CA3c, but mainly in DG. Indeed, the network of CA3c and DG is likely involved in pattern separation between similar episodes. Ketamine showed an amnesiac effect and disrupted the integration of episodic-like memory in both groups.

Highest's Ketamine dose showed hypolocomotion as a possible result of sedative effect. These effects may be mediated both by blocking of NMDA receptor and the stereoselectivity of Ketamine, for muscarinic and opioid receptors. Increase of c-Fos in all hippocampal subregions for these groups is possibly related to the action of Ketamine and not the behavioral protocol.

## 7. References

- Addis, D. R., Wong, A. T., & Schacter, D. L. (2008). Age-Related Changes in the Episodic Simulation of Future Events. *Psychological Science*, *19*(1), 33–41. <http://doi.org/10.1111/j.1467-9280.2008.02043.x>
- Aggleton, J. P., Brown, M. W., & Albasser, M. M. (2012). Contrasting brain activity patterns for item recognition memory and associative recognition memory: Insights from immediate-early gene functional imaging. *Neuropsychologia*, *50*(13), 3141–3155. <http://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2012.05.018>
- Albasser, M. M., Olarte-Sánchez, C. M., Amin, E., Horne, M. R., Newton, M. J., Clea, E., & Aggleton, J. P. (2013). The neural basis of nonvisual object recognition memory in the rat. *Behavioral Neuroscience*, *127*(1), 70–85. <http://doi.org/10.1037/a0031216>
- Albasser, M. M., Poirier, G. L., & Aggleton, J. P. (2010). Qualitatively different modes of perirhinal–hippocampal engagement when rats explore novel vs. familiar objects as revealed by c-Fos imaging. *European Journal of Neuroscience*, *31*(1), 134–147. <http://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.07042.x>
- Baker, K. B., & Kim, J. J. (2002). Effects of Stress and Hippocampal NMDA Receptor Antagonism on Recognition Memory in Rats. *Learning & Memory*, *9*(2), 58–65. <http://doi.org/10.1101/lm.46102>
- Barbosa, F. F., de Oliveira Pontes, I. M., Ribeiro, S., Ribeiro, A. M., & Silva, R. H. (2012). Differential roles of the dorsal hippocampal regions in the acquisition of spatial and temporal aspects of episodic-like memory. *Behavioural Brain Research*, *232*(1), 269–277. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.04.022>
- Barbosa, F. F., Santos, J. R., Meurer, Y. S. R., Macêdo, P. T., Ferreira, L. M. S., Pontes, I. M. O., ... Silva, R. H. (2013). Differential Cortical c-Fos and Zif-268 Expression after Object and Spatial Memory Processing in a Standard or Episodic-Like Object Recognition Task. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *7*. <http://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00112>
- Boultadakis, A., & Pitsikas, N. (2011). Anesthetic Ketamine Impairs Rats' Recall of Previous Information: The Nitric Oxide Synthase Inhibitor N-nitro-l-arginine Methyl ester Antagonizes This Ketamine-induced Recognition Memory Deficit. *Anesthesiology*, *114*(6), 1345–1353. <http://doi.org/10.1097/ALN.0b013e318219524e>
- Brown, M. W., & Aggleton, J. P. (2001). Recognition memory: What are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nature Reviews Neuroscience*, *2*(1), 51–61. <http://doi.org/10.1038/35049064>

- Canolty, R. T., Edwards, E., Dalal, S. S., Soltani, M., Nagarajan, S. S., Kirsch, H. E., ... Knight, R. T. (2006). High Gamma Power Is Phase-Locked to Theta Oscillations in Human Neocortex. *Science*, *313*(5793), 1626–1628. <http://doi.org/10.1126/science.1128115>
- Castilla-Ortega, E., Pedraza, C., Chun, J., Fonseca, F. R. de, Estivill-Torrús, G., & Santín, L. J. (2012). Hippocampal c-Fos activation in normal and LPA1-null mice after two object recognition tasks with different memory demands. *Behavioural Brain Research*, *232*(2), 400–405. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.04.018>
- Chao, O. Y., Nikolaus, S., Huston, J. P., & de Souza Silva, M. A. (2014). The neurokinin-3 receptor agonist senktide facilitates the integration of memories for object, place and temporal order into episodic memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, *114*, 178–185. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.06.009>
- Chrobak, J. J., Hinman, J. R., & Sabolek, H. R. (2008). Revealing Past Memories: Proactive Interference and Ketamine-Induced Memory Deficits. *The Journal of Neuroscience*, *28*(17), 4512–4520. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0742-07.2008>
- Clayton, N. S., Bussey, T. J., & Dickinson, A. (2003). Can animals recall the past and plan for the future? *Nature Reviews Neuroscience*, *4*(8), 685–691. <http://doi.org/10.1038/nrn1180>
- Countryman, R. A., Orlowski, J. D., Brightwell, J. J., Oskowitz, A. Z., & Colombo, P. J. (2005). CREB phosphorylation and c-Fos expression in the hippocampus of rats during acquisition and recall of a socially transmitted food preference. *Hippocampus*, *15*(1), 56–67. <http://doi.org/10.1002/hipo.20030>
- Dees, R. L., & Kesner, R. P. (2013). The role of the dorsal dentate gyrus in object and object-context recognition. *Neurobiology of Learning and Memory*, *106*, 112–117. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.07.013>
- Dere, E., Huston, J. P., & De Souza Silva, M. A. (2005a). Episodic-like memory in mice: Simultaneous assessment of object, place and temporal order memory. *Brain Research Protocols*, *16*(1–3), 10–19. <http://doi.org/10.1016/j.brainresprot.2005.08.001>
- Dere, E., Huston, J. P., & De Souza Silva, M. A. (2005b). Integrated memory for objects, places, and temporal order: Evidence for episodic-like memory in mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, *84*(3), 214–221. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2005.07.002>
- Dere, E., Huston, J. P., & De Souza Silva, M. A. (2007). The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *31*(5), 673–704. <http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2007.01.005>
- Dere, E., Kart-Teke, E., Huston, J. P., & De Souza Silva, M. A. (2006). The case for episodic memory in animals. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *30*(8), 1206–1224. <http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2006.09.005>
- Derrick, B. E., Weinberger, S. B., & Martinez Jr., J. L. (1991). Opioid receptors are involved in an NMDA receptor-independent mechanism of LTP induction at

- hippocampal mossy fiber-CA3 synapses. *Brain Research Bulletin*, 27(2), 219–223. [http://doi.org/10.1016/0361-9230\(91\)90071-Q](http://doi.org/10.1016/0361-9230(91)90071-Q)
- DeVito, L. M., & Eichenbaum, H. (2011). Memory for the Order of Events in Specific Sequences: Contributions of the Hippocampus and Medial Prefrontal Cortex. *The Journal of Neuroscience*, 31(9), 3169–3175. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4202-10.2011>
- Duman, R. S., Li, N., Liu, R.-J., Duric, V., & Aghajanian, G. (2012). Signaling pathways underlying the rapid antidepressant actions of ketamine. *Neuropharmacology*, 62(1), 35–41. <http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.08.044>
- Ergorul, C., & Eichenbaum, H. (2004). The Hippocampus and Memory for “What,” “Where,” and “When.” *Learning & Memory*, 11(4), 397–405. <http://doi.org/10.1101/lm.73304>
- Everitt, B. J., & Robbins, T. W. (1997). Central Cholinergic Systems and Cognition. *Annual Review of Psychology*, 48(1), 649–684. <http://doi.org/10.1146/annurev.psych.48.1.649>
- Flavell, S. W., & Greenberg, M. E. (2008). Signaling Mechanisms Linking Neuronal Activity to Gene Expression and Plasticity of the Nervous System. *Annual Review of Neuroscience*, 31(1), 563–590. <http://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.060407.125631>
- Garcia, L. S. B., Comim, C. M., Valvassori, S. S., Réus, G. Z., Barbosa, L. M., Andreazza, A. C., ... Quevedo, J. (2008). Acute administration of ketamine induces antidepressant-like effects in the forced swimming test and increases BDNF levels in the rat hippocampus. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 32(1), 140–144. <http://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2007.07.027>
- Garcia, L. S. B., Comim, C. M., Valvassori, S. S., Réus, G. Z., Stertz, L., Kapczinski, F., ... Quevedo, J. (2009). Ketamine treatment reverses behavioral and physiological alterations induced by chronic mild stress in rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 33(3), 450–455. <http://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2009.01.004>
- Gilbert, P. E., & Kesner, R. P. (2003). Recognition Memory for Complex Visual Discriminations Is Influenced by Stimulus Interference in Rodents With Perirhinal Cortex Damage. *Learning & Memory*, 10(6), 525–530. <http://doi.org/10.1101/lm.64503>
- Gilbert, P. E., Kesner, R. P., & Lee, I. (2001). Dissociating hippocampal subregions: A double dissociation between dentate gyrus and CA1. *Hippocampus*, 11(6), 626–636. <http://doi.org/10.1002/hipo.1077>
- Goulart, B. K., de Lima, M. N. M., de Farias, C. B., Reolon, G. K., Almeida, V. R., Quevedo, J., ... Roesler, R. (2010). Ketamine impairs recognition memory consolidation and prevents learning-induced increase in hippocampal brain-derived neurotrophic factor levels. *Neuroscience*, 167(4), 969–973. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.03.032>
- Guzowski, J. F. (2002). Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches. *Hippocampus*, 12(1), 86–104. <http://doi.org/10.1002/hipo.10010>

- Guzowski, J. F., Knierim, J. J., & Moser, E. I. (2004). Ensemble Dynamics of Hippocampal Regions CA3 and CA1. *Neuron*, *44*(4), 581–584. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.11.003>
- Herrera, D. G., & Robertson, H. A. (1996). Activation of c-fos in the brain. *Progress in Neurobiology*, *50*(2–3), 83–107. [http://doi.org/10.1016/S0301-0082\(96\)00021-4](http://doi.org/10.1016/S0301-0082(96)00021-4)
- Hoge, J., & Kesner, R. P. (2007). Role of CA3 and CA1 subregions of the dorsal hippocampus on temporal processing of objects. *Neurobiology of Learning and Memory*, *88*(2), 225–231. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2007.04.013>
- Hunsaker, M. R., Rosenberg, J. S., & Kesner, R. P. (2008). The role of the dentate gyrus, CA3a,b, and CA3c for detecting spatial and environmental novelty. *Hippocampus*, *18*(10), 1064–1073. <http://doi.org/10.1002/hipo.20464>
- Imre, G., Fokkema, D. S., Boer, J. A. D., & Ter Horst, G. J. (2006). Dose–response characteristics of ketamine effect on locomotion, cognitive function and central neuronal activity. *Brain Research Bulletin*, *69*(3), 338–345. <http://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2006.01.010>
- Inostroza, M., Brotons-Mas, J. R., Laurent, F., Cid, E., & Prida, L. M. de la. (2013). Specific Impairment of “What-Where-When” Episodic-Like Memory in Experimental Models of Temporal Lobe Epilepsy. *The Journal of Neuroscience*, *33*(45), 17749–17762. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0957-13.2013>
- Jourdi, H., Hsu, Y.-T., Zhou, M., Qin, Q., Bi, X., & Baudry, M. (2009). Positive AMPA Receptor Modulation Rapidly Stimulates BDNF Release and Increases Dendritic mRNA Translation. *The Journal of Neuroscience*, *29*(27), 8688–8697. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6078-08.2009>
- Kart-Teke, E., De Souza Silva, M. A., Huston, J. P., & Dere, E. (2006). Wistar rats show episodic-like memory for unique experiences. *Neurobiology of Learning and Memory*, *85*(2), 173–182. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2005.10.002>
- Katche, C., Bekinschtein, P., Slipczuk, L., Goldin, A., Izquierdo, I. A., Cammarota, M., & Medina, J. H. (2010). Delayed wave of c-Fos expression in the dorsal hippocampus involved specifically in persistence of long-term memory storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(1), 349–354. <http://doi.org/10.1073/pnas.0912931107>
- Kesner, R. P. (2007). A behavioral analysis of dentate gyrus function. In H. E. Scharfman (Ed.), *Progress in Brain Research* (Vol. 163, pp. 567–576). Elsevier. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079612307630301>
- Kesner, R. P., Taylor, J. O., Hoge, J., & Andy, F. (2015). Role of the dentate gyrus in mediating object-spatial configuration recognition. *Neurobiology of Learning and Memory*, *118*, 42–48. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.11.004>
- Kinnavane, L., Albasser, M. M., & Aggleton, J. P. (2015). Advances in the behavioural testing and network imaging of rodent recognition memory. *Behavioural Brain Research*, *285*, 67–78. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.07.049>
- Kubik, S., Miyashita, T., & Guzowski, J. F. (2007). Using immediate-early genes to map hippocampal subregional functions. *Learning & Memory*, *14*(11), 758–770. <http://doi.org/10.1101/lm.698107>

- Lassalle, J. M., Bataille, T., & Halley, H. (2000). Reversible inactivation of the hippocampal mossy fiber synapses in mice impairs spatial learning, but neither consolidation nor memory retrieval, in the Morris navigation task. *Neurobiology of Learning and Memory*, *73*(3), 243–257. <http://doi.org/10.1006/nlme.1999.3931>
- Lee, I., & Kesner, R. P. (2003). Time-Dependent Relationship between the Dorsal Hippocampus and the Prefrontal Cortex in Spatial Memory. *The Journal of Neuroscience*, *23*(4), 1517–1523.
- Leutgeb, J. K., Leutgeb, S., Moser, M.-B., & Moser, E. I. (2007). Pattern Separation in the Dentate Gyrus and CA3 of the Hippocampus. *Science*, *315*(5814), 961–966. <http://doi.org/10.1126/science.1135801>
- Li, J.-S., & Chao, Y.-S. (2008). Electrolytic lesions of dorsal CA3 impair episodic-like memory in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, *89*(2), 192–198. <http://doi.org/10.1016/j.nlm.2007.06.006>
- Machado-Vieira, R., Salvadore, G., DiazGranados, N., & Zarate Jr., C. A. (2009). Ketamine and the next generation of antidepressants with a rapid onset of action. *Pharmacology & Therapeutics*, *123*(2), 143–150. <http://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.02.010>
- McGaugh, J. L. (2000). Memory--a Century of Consolidation. *Science*, *287*(5451), 248–251. <http://doi.org/10.1126/science.287.5451.248>
- Mion, G., & Villeveille, T. (2013). Ketamine Pharmacology: An Update (Pharmacodynamics and Molecular Aspects, Recent Findings). *CNS Neuroscience & Therapeutics*, *19*(6), 370–380. <http://doi.org/10.1111/cns.12099>
- Monaghan, D. T., Andaloro, V. J., & Skifter, D. A. (1998). Chapter 12 Molecular determinants of NMDA receptor pharmacological diversity. In I. A. L. and L. G. O.P. Ottersen (Ed.), *Progress in Brain Research* (Vol. 116, pp. 171–190). Elsevier. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079612308604379>
- Moosavi, M., Yadollahi Khales, G., Rastegar, K., & Zarifkar, A. (2012). The effect of sub-anesthetic and anesthetic ketamine on water maze memory acquisition, consolidation and retrieval. *European Journal of Pharmacology*, *677*(1–3), 107–110. <http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.12.021>
- Nagel, J. A., & Huston, J. P. (1988). Enhanced inhibitory avoidance learning produced by post-trial injections of substance P into the basal forebrain. *Behavioral and Neural Biology*, *49*(3), 374–385. [http://doi.org/10.1016/S0163-1047\(88\)90386-X](http://doi.org/10.1016/S0163-1047(88)90386-X)
- Niciu, M. J., Henter, I. D., Luckenbaugh, D. A., Zarate, C. A., & Charney, D. S. (2014). Glutamate Receptor Antagonists as Fast-Acting Therapeutic Alternatives for the Treatment of Depression: Ketamine and Other Compounds. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *54*, 119–139. <http://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011613-135950>
- Norman, K. A., & O'Reilly, R. C. (2003). Modeling hippocampal and neocortical contributions to recognition memory: A complementary-learning-systems approach. *Psychological Review*, *110*(4), 611–646. <http://doi.org/10.1037/0033-295X.110.4.611>

- Pietersen, C. Y., Bosker, F. J., Postema, F., Fokkema, D. S., Korf, J., & den Boer, J. A. (2006). Ketamine administration disturbs behavioural and distributed neural correlates of fear conditioning in the rat. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *30*(7), 1209–1218. <http://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2006.02.019>
- Pitsikas, N., & Boultsadakis, A. (2009). Pre-training administration of anesthetic ketamine differentially affects rats' spatial and non-spatial recognition memory. *Neuropharmacology*, *57*(1), 1–7. <http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.03.015>
- Pitsikas, N., Boultsadakis, A., & Sakellaridis, N. (2008). Effects of sub-anesthetic doses of ketamine on rats' spatial and non-spatial recognition memory. *Neuroscience*, *154*(2), 454–460. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.04.001>
- Ribeiro, P. O., Rodrigues, P. C., Valentim, A. M., & Antunes, L. M. (2013). A single intraperitoneal injection of ketamine does not affect spatial working, reference memory or neurodegeneration in adult mice: An animal study. *European Journal of Anaesthesiology*, *30*(10), 618–626. <http://doi.org/10.1097/EJA.0b013e3283610321>
- Riedel, G., Platt, B., & Micheau, J. (2003). Glutamate receptor function in learning and memory. *Behavioural Brain Research*, *140*(1–2), 1–47. [http://doi.org/10.1016/S0166-4328\(02\)00272-3](http://doi.org/10.1016/S0166-4328(02)00272-3)
- Rolls, E. T., & Kesner, R. P. (2006). A computational theory of hippocampal function, and empirical tests of the theory. *Progress in Neurobiology*, *79*(1), 1–48. <http://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2006.04.005>
- Roosendaal, B. (2002). Stress and Memory: Opposing Effects of Glucocorticoids on Memory Consolidation and Memory Retrieval. *Neurobiology of Learning and Memory*, *78*(3), 578–595. <http://doi.org/10.1006/nlme.2002.4080>
- Roosendaal, B., McEwen, B. S., & Chattarji, S. (2009). Stress, memory and the amygdala. *Nature Reviews Neuroscience*, *10*(6), 423–433. <http://doi.org/10.1038/nrn2651>
- Sakurai, S. Y., Penney, J. B., & Young, A. B. (1993). Regionally Distinct N-Methyl-D-Aspartate Receptors Distinguished by Quantitative Autoradiography of [3H]MK-801 Binding in Rat Brain. *Journal of Neurochemistry*, *60*(4), 1344–1353. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb03295.x>
- Schacter, D. L., Addis, D. R., & Buckner, R. L. (2007). Remembering the past to imagine the future: the prospective brain. *Nature Reviews Neuroscience*, *8*(9), 657–661. <http://doi.org/10.1038/nrn2213>
- Scharfman, H. E. (2007). The CA3 “backprojection” to the dentate gyrus. In H. E. Scharfman (Ed.), *Progress in Brain Research* (Vol. 163, pp. 627–637). Elsevier. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079612307630349>
- Seoane, A., Tinsley, C. J., & Brown, M. W. (2012). Interfering with Fos expression in rat perirhinal cortex impairs recognition memory. *Hippocampus*, *22*(11), 2101–2113. <http://doi.org/10.1002/hipo.22028>

- Treves, A., Tashiro, A., Witter, M. P., & Moser, E. I. (2008). What is the mammalian dentate gyrus good for? *Neuroscience*, *154*(4), 1155–1172. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.04.073>
- Vago, D. R., Bevan, A., & Kesner, R. P. (2007). The role of the direct perforant path input to the CA1 subregion of the dorsal hippocampus in memory retention and retrieval. *Hippocampus*, *17*(10), 977–987. <http://doi.org/10.1002/hipo.20329>
- VanElzakker, M., Fevurly, R. D., Breindel, T., & Spencer, R. L. (2008). Environmental novelty is associated with a selective increase in Fos expression in the output elements of the hippocampal formation and the perirhinal cortex. *Learning & Memory*, *15*(12), 899–908. <http://doi.org/10.1101/lm.1196508>
- Venâncio, C., Magalhães, A., Antunes, L., & Summavielle, T. (2011). Impaired spatial memory after ketamine administration in chronic low doses. *Current Neuropharmacology*, *9*(1), 251–255. <http://doi.org/10.2174/157015911795016912>
- Wilson, D. I. G., Watanabe, S., Milner, H., & Ainge, J. A. (2013). Lateral entorhinal cortex is necessary for associative but not nonassociative recognition memory. *Hippocampus*, *23*(12), 1280–1290. <http://doi.org/10.1002/hipo.22165>
- Witter, M. P. (2007). Intrinsic and extrinsic wiring of CA3: Indications for connective heterogeneity. *Learning & Memory*, *14*(11), 705–713. <http://doi.org/10.1101/lm.725207>
- Wolff, D. K., & Winstock, A. R. (2012). Ketamine. *CNS Drugs*, *20*(3), 199–218. <http://doi.org/10.2165/00023210-200620030-00003>
- Yaski, O., & Eilam, D. (2007). The impact of landmark properties in shaping exploration and navigation. *Animal Cognition*, *10*(4), 415–428. <http://doi.org/10.1007/s10071-007-0073-8>

## 9.2 Certidão do CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIDÃO

João Pessoa, 29 de abril de 2014.

CEUA Nº 0102/14

Ilmo(a). **Prof. Dr. Flávio Freitas Barbosa**  
Departamento **Psicologia - CCHLA - UFPB**

Orientando(a): **Ingrid Brasilino Montenegro Bento de Souza, (Mestrado)**

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba em sua reunião ordinária de **28/04/2014** analisou e **APROVOU** a execução do projeto **Avaliação da administração aguda de Cetamina nos níveis de BDNF no hipocampo de ratos: implicações na memória e na depressão.**

Com previsão de empregar **72 Ratos WISTAR - ANIMAIS DO BIOTÉRIO Prof. Thomas George.**

Para serem utilizados no período de **28/01/2014 a 01/04/2015**

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animal do CBiotec/UFPB