



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

**PAPEL DE mTOR, BDNF, AMPAR E NMDAR NA RECONSOLIDAÇÃO DA  
MEMÓRIA DE EXTINÇÃO**

Doutoranda: Diana Aline Nôga Morais Ferreira  
Orientador: Prof. Dr. Martín Pablo Cammarota

Natal  
2019

DIANA ALINE NÔGA MORAIS FERREIRA

**PAPEL DE mTOR, BDNF, AMPAR E NMDAR NA RECONSOLIDAÇÃO DA  
MEMÓRIA DE EXTINÇÃO**

Tese apresentada à  
Universidade Federal do Rio Grande do  
Norte como requisito para obtenção do  
título de doutora em Psicobiologia

Orientador: Prof. Dr. Martín Pablo Cammarota

NATAL/RN

2019

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN  
Sistema de Bibliotecas - SISBI  
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Central Zila Mamede

Ferreira, Diana Aline Nôga Morais.

Papel de mTOR, BDNF, AMPAR e NMDAR na reconsolidação da memória de extinção / Diana Aline Nôga Morais Ferreira. - 2019. 64f.: il.

Tese (Doutorado)-Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Biociências, Programa de Pós-graduação em Psicobiologia, Natal, 2019.

Orientador: Dr. Martín Pablo Cammarota.

1. Reconsolidação - Tese. 2. Extinção - Tese. 3. GluN2A - Tese. 4. GluN2B - Tese. 5. mTOR - Tese. 6. AMPAR - Tese. I. Cammarota, Martín Pablo. II. Título.

RN/UF/BCZM

CDU 159.929

**Título:** Papel de mTOR, BDNF, AMPAR e NMDAR na Reconsolidação da Memória de Extinção

**Autora:** Diana Aline Nôga Morais Ferreira

**Data da defesa:** 15/03/2019

**Banca Examinadora:**

Prof. Dr. Martín Pablo Cammarota  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Carolina Luchiari  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof. Dr. Mário André Leocádio Miguel  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof<sup>a</sup>. Dra. Alessandra Mussi Ribeiro  
Universidade Federal de São Paulo

Dr. Diego Moncada  
Universidad de Buenos Aires



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a minha família. Aos meus pais, Sônia e Moraes, por me darem todo o suporte para que chegasse a este momento. Aos meus irmãos, David e Diego pela amizade e ajuda nas necessidades. E à Lucas, meu irmão de coração, pela amizade e por estar sempre procurando ajudar e incentivar.

Ao meu orientador Martín, por me receber no seu laboratório no meio do meu doutorado, por me proporcionar todas as condições para realização do trabalho, por me ensinar como fazer ciência, por todas as orientações de trabalho e de vida, pelo crescimento proporcionado e pela paciência.

À todo o grupo do Memory Research Laboratory, Janine, Andressa, Caro, Marina, Gênedý e Lia pela amizade, por me receberem no laboratório, me ensinarem as técnicas e me ajudarem sempre que necessário.

Aos amigos, Fernanda, Ramón, Scheila, Marina Sampaio, Víctor, Luana, Fiuza, Marina Reis, Jéssica, Alexandre e Amanda por se fazerem presentes nos melhores e piores momentos e me ajudarem a seguir em frente.

À Luiz Eduardo por todo amor, companheirismo e carinho, pela presença e incentivos constantes, pelo suporte nos momentos ruins e por me fazer uma pessoa melhor.

À UFRN que foi minha segunda casa durante estes 11 anos.

À todos os não mencionados que de alguma forma contribuíram para a conclusão da tese.

Ao CNPq e a Capes pelo apoio financeiro.

## RESUMO

A reativação de uma memória é um processo que pode induzir dois fenômenos aparentemente concorrentes, a extinção e a reconsolidação. A extinção envolve a redução da resposta previamente adquirida a um estímulo através da formação de um novo traço mnemônico. Já a reconsolidação envolve a modificação de um traço mnemônico previamente estabelecido, seja para o fortalecimento ou para a atualização deste traço. Vários estudos discutem a oposição entre extinção e reconsolidação, porém pouca atenção foi dada a uma possível interação entre os dois processos. Trabalhos prévios do nosso grupo demonstraram que a memória de extinção é passível de reconsolidação e que este processo é dependente de BDNF. Neste trabalho, investigamos os mecanismos envolvidos na ativação/expressão de BDNF e as vias por ele ativadas na região CA1 do hipocampo dorsal. Para isso, treinamos ratos Wistar machos na esQUIVA inibitória, induzimos a extinção da memória aversiva e realizamos intervenções farmacológicas antes (Ro 25-6981) e/ou depois (rapamicina, BDNF, anti-BDNF, anisomicina, pep2m, AP5, Ro 25-6981, TCN-201) da reativação desta memória. Além disso, analisamos a expressão e fosforilação de moléculas de interesse em diferentes tempos após a reativação da memória de extinção. Como resultado observamos que a administração de rapamicina imediatamente, mas não 6h após a reativação, prejudica a reconsolidação da memória de extinção, efeito que foi revertido pela coinfusão de BDNF recombinante. Além disso, demonstramos que o tráfego de AMPARs é necessário para reconsolidação da memória de extinção e que o BDNF não é capaz de reverter o efeito amnésico do bloqueio deste tráfego. Por fim, demonstramos que os NMDARs contendo GluN2B participam da desestabilização, enquanto os NMDARs contendo GluN2A participam da reestabilização do traço durante a reconsolidação da memória de extinção. Por fim, nossos resultados sugerem a existência de uma via mTOR-BDNF-AMPAR que atuaria na reestabilização do traço mnemônico.

Palavras-chave: reconsolidação, extinção, mTOR, BDNF, GluN2A, GluN2B, AMPAR.

## **ABSTRACT**

Memory reactivation can induce two apparently competing processes, namely extinction and reconsolidation. Extinction involves reduction of a previously acquired response to a stimulus through formation of a new memory trace. On the other hand, reconsolidation involves modification of a previously established memory trace, either for its strengthening or updating. Several studies discuss the opposition between extinction and reconsolidation, but little attention was given to a possible interaction between them. Previous work by our group has demonstrated that extinction memory is susceptible to reconsolidation in a BDNF-dependent manner. In the present work, we investigated the mechanisms involved in activation/expression of BDNF and the pathways it activates in CA1 region of dorsal hippocampus. We trained male Wistar rats in step-down inhibitory avoidance task, extinguished the aversive memory and performed pharmacological interventions before (Ro 25-6981) and/or after (rapamycin, BDNF, anti-BDNF, anisomycin, AP5, pep2m, Ro 25-6981, TCN-201) memory reactivation. In addition, we analyzed expression and phosphorylation of target molecules at different times after reactivation of extinction memory. As a result, we observed that rapamycin administration immediately, but not 6 h after reactivation, impairs reconsolidation of fear extinction, an effect reverted by BDNF co-infusion. In addition, we showed AMPARs trafficking is required for reconsolidation of fear extinction and BDNF is not able to reverse the amnesic effect of AMPARs trafficking blockade. Finally, we observed that NMDARs containing GluN2B participate in destabilization, while NMDARs containing GluN2A participate in trace restabilization during reconsolidation of fear extinction. Finally, our results suggest the existence of a mTOR-BDNF-AMPAR pathway that would act in the memory restabilization.

Key-words: reconsolidation, extinction, mTOR, BDNF, GluN2A, GluN2B, AMPAR.



# Sumário

<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....</b>	<b>10</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1. Objetivo Geral.....</b>	<b>21</b>
<b>2.2. Objetivos Específicos.....</b>	<b>21</b>
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>22</b>
<b>3.1. Animais, Cirurgia Estereotáxica e Infusões .....</b>	<b>22</b>
<b>3.2. Esquiva Inibitória.....</b>	<b>22</b>
<b>3.3. Delineamento dos experimentos farmacológicos .....</b>	<b>23</b>
<b>3.4. Immunoblotting e obtenção de fração enriquecida em densidade pós-sináptica .....</b>	<b>24</b>
<b>3.5. Análise Estatística.....</b>	<b>27</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>28</b>
<b>4.1. A atividade de mTOR é necessária para reconsolidação da memória de extinção.....</b>	<b>28</b>
<b>4.2. A coinfusão de BDNF reverte os efeitos amnésicos da Rapamicina .....</b>	<b>30</b>
<b>4.3. O BDNF atua na reconsolidação através do controle do tráfego de AMPARs.....</b>	<b>31</b>
<b>4.4. A atividade de NMDAR contendo a subunidade GluN2A é necessária para reestabilização da memória de extinção, enquanto a atividade de NMDARs contendo a subunidade GluN2B é necessária para sua desestabilização.....</b>	<b>35</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>42</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>48</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>49</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>66</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4E-BP	Proteína ligadora do fator eucariótico de iniciação
AMPC	3´5´-adenosina-monofosfato-cíclico
AMPAR	Receptor $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônicos
Ani	Anisomicina
BDNF	Fator neurotrófico dependente do cérebro
CA	Corno de Ammon
CaMKII	Proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina II
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CS	Estímulo condicionado
DAG	Diacilglicerol
Deptor	<i>DEP domain-containing mTOR-interacting protein</i>
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
eIF4F	complexo eucariótico de iniciação 4F
fPSD	Fração enriquecida em densidade pós-sináptica
GDP	Guanosina difosfato
Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GTP	Guanosina trifosfato
HT	Homogeneizado total
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trifosfato
LTP	Potenciação de longa duração
MAPK	proteína quinase ativada por mitógeno
mLST8	<i>Mammalian lethal with SEC13 protein 8</i>
mSin1	<i>Mammalian stress-activated protein kinase-interacting protein 1</i>
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos
mTORC1	Complexo mTOR 1
mTORC2	Complexo mTOR 2
NMDAR	Receptor N-metil D-aspartato
NSF	<i>N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein</i>
p75 <sup>NTR</sup>	Receptor de neurotrofina p75

PI3K	fosfatidilinositol-3-quinase
PIP <sub>2</sub>	fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PKM $\zeta$	Proteína quinase M $\zeta$
PLC $\gamma$	Fosfolipase C $\gamma$
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PSD-95	Postsynaptic density protein 95
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10</i>
PTSD	Transtorno do estresse pós-traumático
RA	Reativação
Rapa	Rapamicina
Raptor	<i>Regulatory-associated protein of mTOR</i>
Rictor	<i>Rapamycin-insensitive companion of mammalian target of rapamycin</i>
PRAS40	<i>Proline-rich Akt1 substrate 40 kDa</i>
Protor	<i>Protein observed with Rictor</i>
Tel2	<i>Telomere maintenance 2</i>
TrkB	<i>Tropomyosin receptor kinase B</i>
TSC	<i>Tuberous sclerosis protein</i>
Tti1	<i>Tel two-interacting protein 1</i>
US	Estímulo não condicionado
Veh	Veículo

## 1. INTRODUÇÃO

Como afirmaram Squire e Kandel (2000) nossa individualidade é definida pelo acervo de memórias que possuímos e conseguimos expressar. Estas memórias nada mais são do que representações de informações que extraímos do meio, sendo influenciadas pelo nosso conhecimento prévio. Tais memórias podem persistir por diferentes tempos, desde a memória sensorial, que mantém uma breve impressão de um estímulo após seu desaparecimento, passando pela memória de curta duração, até memórias de longa duração, que podem perdurar por toda a vida.

Para perdurar por longos períodos uma memória precisa passar por um processo denominado consolidação. A teoria da consolidação foi inicialmente proposta por Müller & Pilzecker (1900) ao observarem que a introdução de novas informações, logo após o aprendizado, interfere na retenção da memória. Eles então sugeriram que o traço mnemônico é inicialmente instável e é gradualmente estabilizado, em um processo posteriormente denominado consolidação (McGaugh, 1966, 2000). Diversos estudos posteriores deram suporte a existência deste processo de estabilização, ao demonstrarem efeitos amnésicos e promnésicos que ocorriam apenas dentro de uma determinada janela temporal após a aprendizagem (Duncan, 1949; Flexner, Flexner, & Stellar, 1965; McGaugh & Krivanek, 1970; Nader, 2013; Navarro et al., 2005). Uma explicação mais mecanicista para este processo consolidatório foi sugerida por Hebb (1949). Ele defendia que a excitação repetida e persistente de um neurônio “A” sobre outro “B” resultaria em algum processo metabólico ou de crescimento que aumentaria a eficiência de “A” em excitar “B”. Durante a consolidação da memória, ocorreria uma reverberação no circuito envolvido, o que resultaria em um aumento de eficiência nas conexões da rede, estabilizando o traço. A ideia de Hebb foi corroborada experimentalmente anos depois, quando Bliss e Lomo (1973) descreveram a potenciação de longa duração (LTP), a qual é considerada o modelo celular da consolidação. Estes pesquisadores estudaram a via perfurante, que conecta o córtex entorrinal e as células granulares do giro denteado, e observaram que estimulações em alta frequência resultam em um aumento duradouro da eficiência sináptica. Mais tarde, a LTP foi também demonstrada na via das fibras musgosas, que conecta o giro denteado a região

CA3 do hipocampo, na via das colaterais de Schäffer, que conecta CA3 a CA1, bem como em outras regiões do encéfalo (Andersen, Sundberg, Sveen, & Wigström, 1977; Clugnet & LeDoux, 1990; Collingridge, Kehl, & McLennan, 1983; Harris & Cotman, 1986; Schwartzkroin & Wester, 1975).

A LTP mais estudada é a que ocorre na via das colaterais de Schäffer. Para que este evento possa ocorrer, é necessária a coincidência de ativação entre o neurônio pré-sináptico e o neurônio pós-sináptico. Isto se deve ao fato da ativação de receptores N-metil D-aspartato (NMDARs) ser fundamental para indução desta LTP. Estes receptores ionotrópicos tem seu canal bloqueado por uma molécula de magnésio e para que esse bloqueio possa ser removido, a membrana pós-sináptica precisa ser despolarizada. Porém, apenas a remoção do magnésio não é suficiente para abertura do canal, pois também é necessária a ligação do glutamato ao sítio específico. Assim, o neurônio pré-sináptico precisa liberar glutamato em um momento de despolarização do neurônio pós-sináptico para que os NMDARs sejam ativados. Uma vez ativados, os NMDARs permitem um forte influxo de cálcio, o que ativa uma série de cascatas intracelulares. Uma das moléculas ativadas pelo influxo de cálcio é a quinase dependente de cálcio/calmodulina II (CaMKII). Ao ser ativada, a CaMKII se liga a subunidade GluN2B dos NMDARs e fosforila uma série de alvos, levando a um aumento tanto na condutância dos receptores  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônicos (AMPA), quanto na sua inserção na densidade pós-sináptica. A manutenção do estímulo na sinapse e, conseqüentemente, do influxo de cálcio, leva a ativação da enzima adenilato ciclase, cuja atividade resulta na produção de AMPc. O AMPc é responsável por aumentar a ação da proteína quinase A (PKA), que, por sua vez, ativa a via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) no citosol, e migra para o núcleo onde fosforila o fator de transcrição CREB (*cAMP response element-binding protein*). Ademais, a MAPK também atua no núcleo, aumentando a atividade do fator de transcrição Elk-1. Estes fatores de transcrição induzem a síntese de moléculas como o fator neurotrófico dependente do cérebro (BDNF) e Zif268, que são importantes para formação de novas sinapses e conseqüente fortalecimento duradouro da sinalização entre neurônios pré e pós-sinápticos (Baltaci, Mogulkoc, & Baltaci, 2018; Kandel, Schwartz, Jessell, Siegelbaum, & Hudspeth, 2014).

O grande problema da teoria da consolidação é afirmar que, uma vez estabilizada, a memória não é mais suscetível a modificações. Os primeiros experimentos desafiando esta ideia surgiram já na década de 1960. Em 1968 Misanin e colaboradores utilizaram uma tarefa de condicionamento clássico, com um tom como estímulo condicionado (CS) e um choque como estímulo não-condicionado (US). Um dia após o pareamento, eles expuseram os animais somente ao tom, reativando o traço, e aplicaram um choque eletroconvulsivo, tratamento conhecidamente amnésico quando aplicado após aprendizagem. De acordo com o que propõe a teoria da consolidação, este tratamento não deveria prejudicar a memória do condicionamento, já que a janela de consolidação já havia passado, porém o tratamento foi amnésico. Outros trabalhos também demonstraram amnésia ou promnésia após a reativação da memória (Gordon, 1977a, 1977b; Schneider & Sherman, 1968). Com base nisso, uma nova teoria foi proposta por Lewis. Ele defendia que a memória possuía dois estados, um ativo e um inativo. As memórias que não estavam sendo utilizadas estariam no estado inativo e seriam resistentes a modificações. Já as memórias novas e as reativadas estariam no estado ativo, sendo mais instáveis e suscetíveis a modificações (Lewis, 1979). Apesar dos achados experimentais, pouca atenção foi dada a essa segunda janela de labilidade até a publicação do trabalho de Nader e colaboradores em 2000. Eles observaram que, após a indução de um condicionamento aversivo, a infusão do inibidor de síntese proteica anisomicina (Ani) na amígdala basolateral imediatamente após a apresentação apenas do CS (*i.e.* reativação) provocou déficits de memória. Os mesmos déficits não foram observados quando a administração ocorreu 6h após ou na ausência da reativação. Com isso, eles comprovaram que a reativação da memória de fato a torna lábil e para que ela possa permanecer utilizável precisa passar por um processo de reestabilização dependente de síntese proteica, que foi denominado reconsolidação (Nader, Schafe, & Le Doux, 2000).

A reconsolidação possui duas fases. Primeiramente o traço mnemônico precisa ser desestabilizado, processo que é iniciado pela reativação, e depois reestabilizado para que possa permanecer utilizável (Kim, Moki, & Kida, 2011; S.-H. Lee et al., 2012; Milton et al., 2013). Esta reestabilização possui semelhanças com a consolidação, como a participação de NMDARs, MAPK, PKA e Zif268, mas não é apenas uma recapitulação da mesma, já que em um

mesmo tipo de memória, diferentes moléculas e até diferentes regiões cerebrais atuam na consolidação, mas não na reconsolidação e vice-versa (Lee, 2004; Lee & Hynds, 2013; Lima et al., 2009; Tronson & Taylor, 2007). Todo este processamento é importante para permitir a atualização e o fortalecimento de memórias previamente aprendidas (Lee, 2008, 2010).

A reconsolidação já foi demonstrada em diversos paradigmas comportamentais, com diferentes espécies animais e tratamentos (Nader, 2015). Apesar disso, não é universal, já que em alguns casos o traço parece ser resistente a desestabilização. Memórias mais fortes, induzidas por treinos repetidos ou mais intensos, geralmente são resistentes a tratamentos amnésicos aplicados após a reativação (Flavell & Lee, 2013; Suzuki, 2004; S.-H. Wang, de Oliveira Alvares, & Nader, 2009). O mesmo acontece com memórias antigas (Baratti, Boccia, Blake, & Acosta, 2008; Eisenberg & Dudai, 2004; Frankland, 2006), ou quando o estímulo da reativação é previsível (Morris et al., 2006; Pedreira, 2004; Rossato et al., 2007), ou quando a reativação induz a extinção da memória (Eisenberg, Kobilov, Berman, & Dudai, 2003; Power, Berlau, McGaugh, & Steward, 2006; Suzuki, 2004). A extinção da memória também é um possível resultado da reativação de um traço mnemônico. Ela envolve a redução da resposta previamente adquirida a um estímulo. Este processo parece envolver a formação de um novo traço mnemônico que codificaria a ausência do estímulo em relação ao contexto e/ou outro estímulo associado, bem como inibiria a expressão do traço original (Dunsmoor, Niv, Daw, & Phelps, 2015; Orsini & Maren, 2012; Rescorla, 2001). Como a reativação pode induzir tanto extinção como reconsolidação, os dois processos competiriam pela maquinaria celular e a indução de um impediria o acontecimento do outro (Flavell & Lee, 2013; Nader, 2003). Vários estudos discutem a oposição entre extinção e reconsolidação, dando pouca atenção a uma possível interação entre os dois processos.

Em um trabalho recente de nosso grupo, observamos que a administração de inibidores da síntese proteica (Ani, emetina e cicloheximida), na região CA1 do hipocampo dorsal, após a reativação da memória de extinção, provoca o retorno da resposta aversiva previamente aprendida. Esta ação de emetina, Ani e cicloheximida é dependente do tempo de aplicação do fármaco e da reativação,

o que é consistente com a existência de um processo de reconsolidação. Estes resultados corroboram a ideia de que a extinção envolve a formação de um novo traço mnemônico. Este traço estaria dominando o comportamento durante a reativação e seria perturbado pela inibição de sua reconsolidação, o que permitiria o retorno da resposta aversiva original (Rossato, Bevilaqua, Izquierdo, Medina, & Cammarota, 2010).

Posteriormente, nosso grupo demonstrou que, após a reativação da memória de extinção, há um aumento de BDNF, uma neurotrofina responsável por promover crescimento, sobrevivência e diferenciação em neurônios (Begni, Riva, & Cattaneo, 2017; Radiske et al., 2015). Além disso, o bloqueio da ação do BDNF após a reativação provoca o retorno da resposta aversiva, enquanto a coadministração de BDNF impede os déficits causados por inibidores de síntese proteica e expressão gênica. Estes dados comprovam que esta neurotrofina é necessária e suficiente para reconsolidação da memória de extinção na esquila inibitória (EI) (Radiske et al., 2015).

O BDNF possui um papel importante na regulação dos processos plásticos associados ao aprendizado (Lu, 2004; Poo, 2001); além de modular a neurotransmissão excitatória no hipocampo, o que facilita a LTP (Figurov, Pozzo-Miller, Olafsson, Wang, & Lu, 1996; Lessmann, Gottmann, & Heumann, 1994; Takei et al., 1997). Esta neurotrofina aumenta a fosforilação das subunidades GluN1 e GluN2B de NMDAR, assim como a expressão e fosforilação de subunidades de AMPAR (Bekinschtein et al., 2008; Jourdi & Kabbaj, 2013). Ele também induz modificações do tipo estrutural, incluindo a ramificação axonal e a formação de espinhos dendríticos nos neurônios piramidais da região CA1 do hipocampo (Cohen-Cory & Fraser, 1995; Gallo & Letourneau, 1998; Hempstead, 2015; McAllister, Katz, & Lo, 1999; Tyler & Pozzo-Miller, 2001).

A sinalização do BDNF é mediada por dois receptores, TrkB e p75<sup>NTR</sup>. O TrkB (*Tyrosine receptor kinase B*) é o principal responsável pelos efeitos citados acima. A interação entre BDNF e TrkB leva a ativação de várias cascatas intracelulares (Fig. 1), como as cascatas da MAPK (também denominada ERK), da fosfolipase C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) e a via do alvo mecanicístico da rapamicina (mTOR) (Begni et al., 2017; Bekinschtein et al., 2008; Hempstead, 2015).

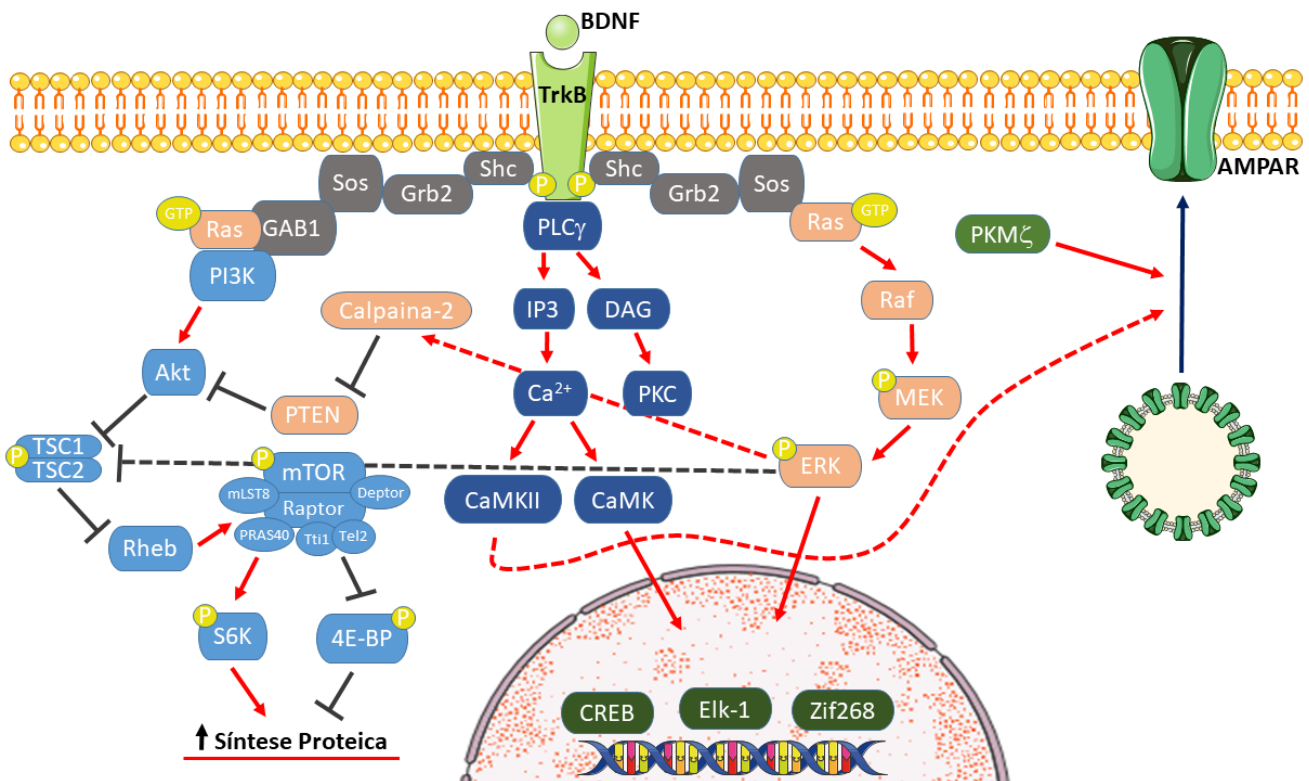


A fosforilação das tirosinas 490 e 515 de TrkB resulta no aumento da afinidade pela proteína Shc, a qual recruta Grb2. Grb2 forma um complexo com Sos, que promove a troca de GDP por GTP na Ras, ativando-a. A Ras ativa a Raf, que fosforila e ativa a MEK. MEK ativa a ERK (MAPK), que fosforila proteínas no citoplasma e migra para o núcleo. No núcleo, ERK fosforila diferentes fatores de transcrição, como Elk-1 e CREB. Como resultado, ocorre aumento na expressão de diversas moléculas, dentre elas Zif268, c-fos e BDNF (Begni et al., 2017; Bekinschtein et al., 2008).

Quando fosforilado na tirosina 816, TrkB ativa a PLC- $\gamma$ , que cliva o fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>). Esta clivagem gera inositol-1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (DAG). O IP<sub>3</sub> se liga a receptores no retículo endoplasmático e promove a liberação de estoques internos de cálcio. O aumento de cálcio leva a ativação de proteínas quinases dependentes de cálcio/calmodulina, como CaMKII e CaMK. CaMKII e CaMK medeiam diversos processos, dentre eles o aumento na fosforilação de CREB e AMPARs e a translocação de AMPARs para a membrana. Além disso, a ação conjunta de cálcio e DAG leva a ativação de proteínas quinases C (PKCs), as quais fosforilam NMDARs, aumentando sua abertura e o influxo de cálcio (Begni et al., 2017; Bekinschtein et al., 2008; Giese & Mizuno, 2013). Dentre as PKCs é importante destacar uma isoforma atípica, a PKM $\zeta$ . Esta proteína não possui o domínio auto-inibitório e dessa forma, fica ativa de forma persistente. Sua atividade vem sendo associada a manutenção da memória de longa duração, através do controle do tráfego de AMPARs (Migues et al., 2010). O BDNF mantém o nível de ativação desta quinase através de mecanismos ainda não descritos (Mei, Nagappan, Ke, Sacktor, & Lu, 2011).

TrkB também é capaz de induzir a ativação da via da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), através da ação conjunta de Ras e a proteína adaptadora Gab-1. PI3K ativa várias moléculas sinalizadoras, dentre elas a quinase Akt, que fosforila e inibe o heterodímero TSC1-TSC2. Ao ser fosforilado, o heterodímero TSC1-TSC2 deixa de inibir a GTPase Rheb, que é um ativador direto de mTOR. mTOR é uma proteína serina-treonina quinase de alto peso molecular, associada a funções como crescimento celular e plasticidade sináptica, as quais realiza através da regulação da tradução de um subgrupo de mRNAs. A ativação de mTOR permite sua junção com as proteínas Raptor (*regulatory-associated*

protein of mTOR), mLST8 (*mammalian lethal with SEC13 protein 8*), Deptor (*DEP domain-containing mTOR-interacting protein*), Tti1 (*Tel two-interacting protein 1*), Tel2 (*telomere maintenance 2*) e PRAS40 (*proline-rich Akt1 substrate 40 kDa*) para formar o complexo mTOR 1 (mTORC1). mTORC1 fosforila as proteínas ligadoras do fator eucariótico de iniciação 4E (4E-BPs), o que permite a formação do complexo eucariótico de iniciação 4F (eIF4F) e o início da tradução de vários mRNAs. Além disso, mTORC1 também ativa a quinase p70S6 (p70S6K ou S6K), que regula a fosforilação e síntese da proteína ribossomal S6, bem como aumenta a atividade de fatores envolvidos nas fases de iniciação e alongamento da síntese proteica (Begni et al., 2017; Dunlop & Tee, 2009; Giese & Mizuno, 2013; Slipczuk et al., 2009). Dentre as várias moléculas cuja síntese podem ser induzidas pela atividade de mTOR, encontra-se o próprio BDNF (Baj, Pinhero, Vaghi, & Tongiorgi, 2016; Moy, Khoutorsky, Asiedu, Dussor, & Price, 2018). A via Ras-Erk auxilia a ativação da via PI3K-Akt-mTOR, já que ERK fosforila TSC2, retirando sua inibição sobre mTOR (Mendoza, Er, & Blenis, 2011), bem como facilita a ativação da Akt. Esta facilitação acontece através da ativação da protease calpaina-2, que degrada PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*), uma fosfatase que inibe a atividade de Akt (Briz et al., 2013).



**Figura 1.** Representação esquemática de cascatas ativadas pelo receptor TrkB. A fosforilação de TrkB resulta no aumento de afinidades por proteínas adaptadoras como Shc, Grb2, Gab-1. Grb2 forma um complexo com Sos, que ativa a Ras. A Ras ativa a Raf, que fosforila e ativa a MEK. MEK ativa a ERK, que fosforila proteínas no citoplasma e migra para o núcleo. No núcleo, ERK fosforila fatores de transcrição, como Elk-1 e CREB. A ação conjunta de Ras e Gab-1 resulta na ativação da PI3K. PI3K ativa a quinase Akt, que fosforila e inibe o heterodímero TSC1-TSC2. Ao ser fosforilado, o heterodímero TSC1-TSC2 deixa de inibir Rheb, um ativador direto de mTOR. mTOR interage com proteínas como Raptor, Deptor e outras para formar o mTORC1, que aumenta a síntese proteica através da ativação da S6K e inibição das 4E-BPs. A via Ras-ERK auxilia na ativação da via PI3K-Akt-mTOR. Além da participação de Ras na ativação de PI3K, ERK fosforila e inativa TSC2 e auxilia na ativação de Akt através da indução da degradação de PTEN pela calpaina-2. A fosforilação de TrkB também ativa a PLC- $\gamma$ , que cliva o PIP<sub>2</sub>, gerando IP<sub>3</sub> e DAG. O IP<sub>3</sub> promove a liberação dos estoques internos de cálcio, o que resulta na ativação de proteínas como CaMKII e CaMK, as quais medeiam a translocação e fosforilação de AMPAR, bem como a fosforilação de CREB. A ação conjunta de DAG e cálcio ativa PKCs, que fosforilam NMDAR, aumentando sua atividade. O BDNF mantém os níveis de atividade da PKM $\zeta$ , que promove a inserção de AMPAR.

Várias das moléculas ativadas nessas vias *downstream* ao BDNF tem papel importante em etapas do processamento mnemônico. A atividade de ERK em regiões como amígdala e hipocampo é importante para o armazenamento, reconsolidação e extinção de memórias aversivas (Adams & Sweatt, 2002; Atkins, Selcher, Petraitis, Trzaskos, & Sweatt, 1998; Cestari, Costanzi, Castellano, & Rossiarnaud, 2006; Duvarci, Nader, & LeDoux, 2005; Fischer et al., 2007; Krawczyk et al., 2015; Schafe et al., 2000). O bloqueio da atividade da CaMKII gera déficits na memória, enquanto o aumento de sua expressão melhora o desempenho mnemônico (Camarota, Bernabeu, Levi De Stein, Izquierdo, & Medina, 1998; Coultrap & Bayer, 2012; Elgersma, 2004; Giese & Mizuno, 2013; Irvine, von Herten, Plattner, & Giese, 2006; Lisman, Schulman, & Cline, 2002; Lucchesi, Mizuno, & Giese, 2011). Modificações nas subunidades que compõem os AMPARs expressos na membrana, bem como a fosforilação destas subunidades são processos necessários para armazenamento, evocação e reconsolidação de memórias (Camarota et al., 2004; Rao-Ruiz et al., 2011; Sachser, Haubrich, Lunardi, & de Oliveira Alvares, 2017; Slipczuk et al., 2009; Thoeringer et al., 2012). Dentre estas moléculas podemos destacar mTOR. A inibição de mTOR pela rapamicina provoca déficits na fase tardia da LTP, a qual é dependente de síntese proteica (Tang et al., 2002); prejudica memórias

espaciais e aversivas (Bekinschtein et al., 2007; Dash, Orsi, & Moore, 2006; Slipczuk et al., 2009); bem como afeta a consolidação e a reconsolidação da memória de reconhecimento (Jobim et al., 2012; Myskiw et al., 2008).

O mTOR integra sinais internos e externos para controlar a função celular. Estes sinais externos advém de fatores de crescimento, como o BDNF discutido anteriormente, mas também de neurotransmissores como o glutamato, atuando sobre NMDARs (Gong, Park, Abbassi, & Tang, 2006; Ru, Peng, Zhong, & Tang, 2012). Estes receptores tem um papel central no processamento mnemônico, atuando na aquisição, consolidação, extinção, evocação, reconsolidação e até no esquecimento da memória (Hafenbreidel, Rafa Todd, & Mueller, 2017; Lopez, Gamache, Schneider, & Nader, 2015; Morris, 2013; Sachser et al., 2017; Yamada, Arai, Suenaga, & Ichitani, 2017).

Apesar de já conhecermos todos estes mecanismos associados a ação do BDNF e a importância desta molécula para reconsolidação da memória de extinção, ainda não se sabe quais destas vias são recrutadas durante este processo de reconsolidação, bem como quais vias induzem a síntese deste BDNF. O melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na reconsolidação da memória de extinção tem grande importância devido a seu potencial terapêutico. Alguns distúrbios como o transtorno do estresse pós-traumático (PTSD) estão associados com a expressão exagerada de memórias aversivas. Algumas das terapias utilizadas no tratamento deste transtorno envolvem os mecanismos da extinção, porém estão associados a recidivas devido a ocorrência de fenômenos como a recuperação espontânea. Como discutido anteriormente, uma das funções da reconsolidação é o fortalecimento do traço mnemônico. Neste sentido, o melhor entendimento das cascatas que permeiam a reconsolidação da memória de extinção poderia resultar no desenvolvimento de estratégias para o fortalecimento desta memória, levando a melhores prognósticos para os pacientes (Parsons & Ressler, 2013; A. Radiske et al., 2015; Smith, Doran, Sippel, & Harpaz-Rotem, 2017). Assim, no presente trabalho buscamos investigar melhor os mecanismos moleculares envolvidos na reconsolidação da memória de extinção de ratos submetidos a EI.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Investigar os mecanismos envolvidos na ativação/expressão de BDNF e as vias por ele ativadas na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos Wistar durante a reconsolidação da memória de extinção na EI.

### **2.2. Objetivos Específicos**

1. Verificar se a inibição de mTOR na região CA1 do hipocampo dorsal após a reativação da memória de extinção inibe sua reconsolidação

2. Investigar se o mTOR está *upstream* ao BDNF necessário durante a reconsolidação da memória de extinção.

3. Investigar se o tráfego de AMPARs é necessário para reconsolidação da memória de extinção e a relação deste tráfego com o BDNF.

4. Verificar se a inibição de NMDARs na região CA1 do hipocampo dorsal após a reativação da memória de extinção inibe sua reconsolidação

5. Investigar o possível papel diferencial das subunidades GluN2A (ou NR2A) e GluN2B (ou NR2B) do NMDAR na reconsolidação da memória de extinção.

6. Verificar se esta reconsolidação da memória de extinção é acompanhada pelo aumento da expressão e/ou fosforilação de mTOR, bem como das subunidades que compõem os receptores NMDA e AMPA.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1. Animais, Cirurgia Estereotáxica e Infusões**

Utilizamos 867 ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar machos com aproximadamente 3 meses de idade e pesando entre 300 e 380g nos experimentos descritos. Mantivemos os animais em grupos de 5, em racks ventilados (Alesco, temperatura: 21-23 ° C) com livre acesso a água e comida, em um ciclo claro/escuro de 12/12 horas (luzes acesas as 6:30).

Para realização da cirurgia estereotáxica, anestesiámos os animais com quetamina (90 mg/Kg, i.p.) e xilazina (10 mg/Kg i.p.) e implantamos bilateralmente cânulas-guia (22 g, 9 mm) na região CA1 do hipocampo dorsal (ântero-posterior = - 4,2; látero-lateral =  $\pm$  3,0; dorsoventral = -2,0 em relação ao bregma). Após 5 dias de recuperação, manipulamos os animais por 3 dias para só então realizarmos os procedimentos experimentais.

Durante os tratamentos farmacológicos utilizamos uma agulha acoplada a um tubo de polietileno conectado a uma micro-seringa Hamilton. Infundimos 1  $\mu$ l/lado por 60s com o auxílio de uma bomba de infusão. Ao término, deixamos a agulha no local por 60s adicionais para garantir a difusão da droga. Todo esforço possível foi realizado com o intuito de diminuir o número de animais utilizados, bem como lhes evitar sofrimento. Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética no uso de animais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (parecer 023.034/2017, em anexo).

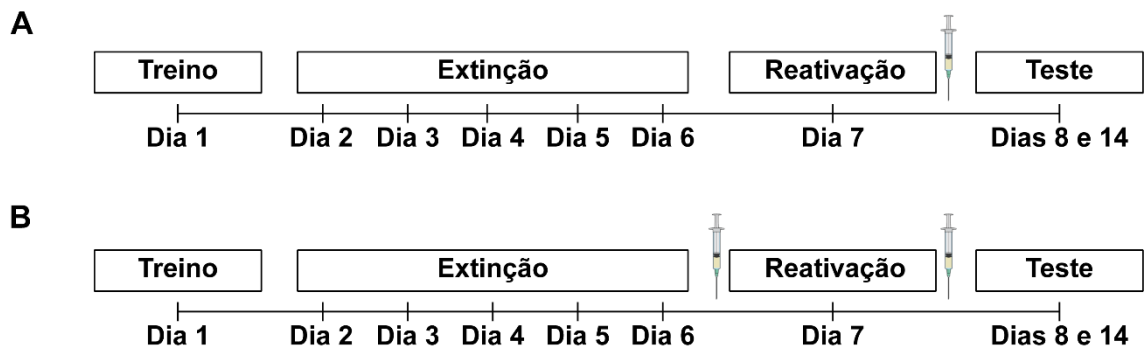
#### **3.2. Esquiva Inibitória**

Para cumprir os objetivos propostos utilizamos o protocolo de reconsolidação da extinção na esquiva inibitória (Radiske et al., 2015; Rossato et al., 2010). O aparato consiste em uma caixa de acrílico (50 x 25 x 25 cm) com piso formado por uma grade de barras metálicas conectadas a uma fonte de corrente elétrica. Em um extremo desta caixa e sobre a mencionada grade localiza-se uma plataforma de 5 cm de altura, 8 cm de largura e 25 cm de comprimento. Durante a sessão de treino colocamos os ratos na plataforma e aplicamos um choque elétrico (0,4 mA por 2 s) no momento em que desceram completamente dela (quatro patas sobre a grade). Retiramos os animais da caixa

imediatamente após o choque. Com um único treinamento, o animal associa a descida ao estímulo aversivo e passa a permanecer na plataforma. Para extinguir esta resposta, submetemos os animais a cinco sessões não reforçadas com 24h de intervalo entre cada uma. Nestas sessões colocamos os animais novamente na plataforma até que descessem, não aplicamos choque e permitimos 30s de exploração após a descida. Para reativar a memória de extinção, recolocamos os animais na plataforma, 24h após a última sessão de extinção e retiramos logo após descerem. A retenção da memória foi avaliada em sessões de teste, realizadas 1 ou 7 dias após a reativação da memória de extinção. Nesta sessão, colocamos os animais na plataforma e medimos a latência para descida. Excluimos das análises os animais que não expressaram a memória aversiva na primeira sessão de extinção (i.e latência menor do que 50 s); que não extinguiram a memória aversiva; ou que não reativaram a memória de extinção (i.e. latência superior a 30 s na sessão de reativação). Em média, excluimos  $31,09 \pm 12,19\%$  dos animais.

### **3.3. Delineamento dos experimentos farmacológicos**

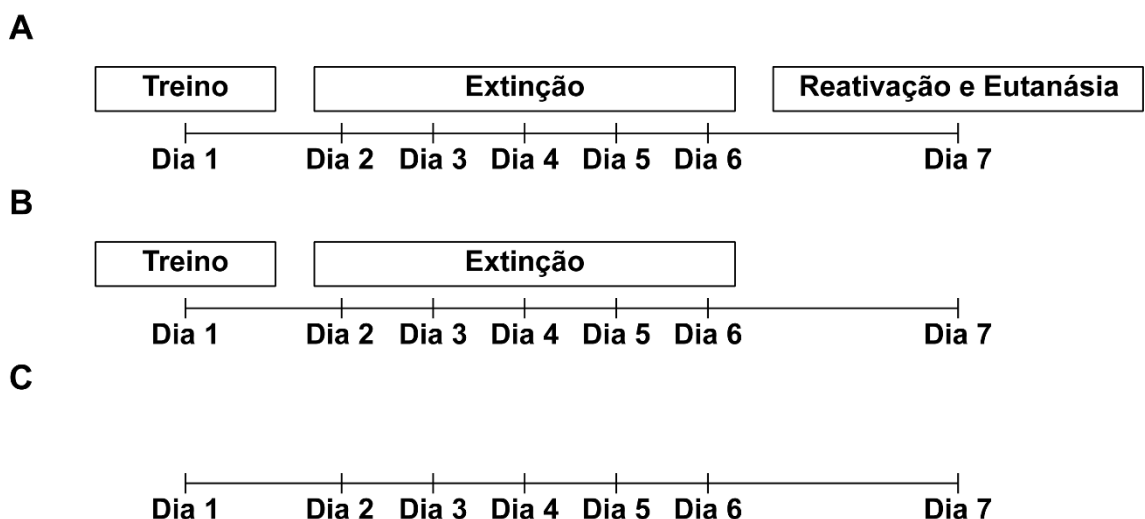
Para realização dos experimentos farmacológicos, treinamos os ratos na EI, induzimos a extinção da memória aversiva resultante nos 5 dias seguintes e reativamos a memória de extinção 24h após a última sessão de extinção. Imediatamente após esta reativação, administramos veículo (Veh, solução salina), rapamicina (25  $\mu$ M, Rapa, antagonista de mTOR), Torin 2 (500  $\mu$ M, antagonista de mTOR), Ani (160  $\mu$ g/ $\mu$ L, inibidor de síntese proteica), BDNF recombinante (0,25  $\mu$ g/ $\mu$ L), pep2m (5 pM, inibidor do tráfego de AMPARs), AP5 (5  $\mu$ g/ $\mu$ L, antagonista de NMDARs), TCN-201 (0,05  $\mu$ g/ $\mu$ L, antagonista específico de NMDARs contendo a subunidade GluN2A), ou Ro 25-6981 (2,5  $\mu$ g/ $\mu$ L, antagonista específico de NMDARs contendo a subunidade GluN2B). Por fim, testamos os animais 1 ou 7 dias após a reativação da memória de extinção (Fig. 2 A). Em parte dos experimentos, administramos Veh ou Ro 25-6981 15 minutos antes da sessão de reativação, e anticorpo inibidor da atividade de BDNF (1  $\mu$ g/ $\mu$ L, BDNFab), IgG controle, Veh ou Rapa imediatamente após a reativação. Nestes casos, a retenção da memória de extinção também foi avaliada 1 ou 7 dias após a sessão de reativação (Fig. 2 B).



**Figura 2.** Delineamento dos experimentos farmacológicos.

### 3.4. Immunoblotting e obtenção de fração enriquecida em densidade pós-sináptica

Treina os animais na EI, induzimos a extinção da memória aversiva nos 5 dias seguintes e 24h após a última sessão de extinção reativamos a memória de extinção. Imediatamente, 30, 90, 180 ou 360 minutos após a reativação da memória de extinção eutanasiamos os animais por decapitação (Fig. 3 A). Como controle, também eutanasiamos um grupo de animais que não passou por qualquer procedimento experimental, sendo apenas manipulados (naive) (Fig. 3 C), e outro grupo que passou pelo treino e extinção, mas não pela sessão de reativação (Ext, Fig. 3 B).

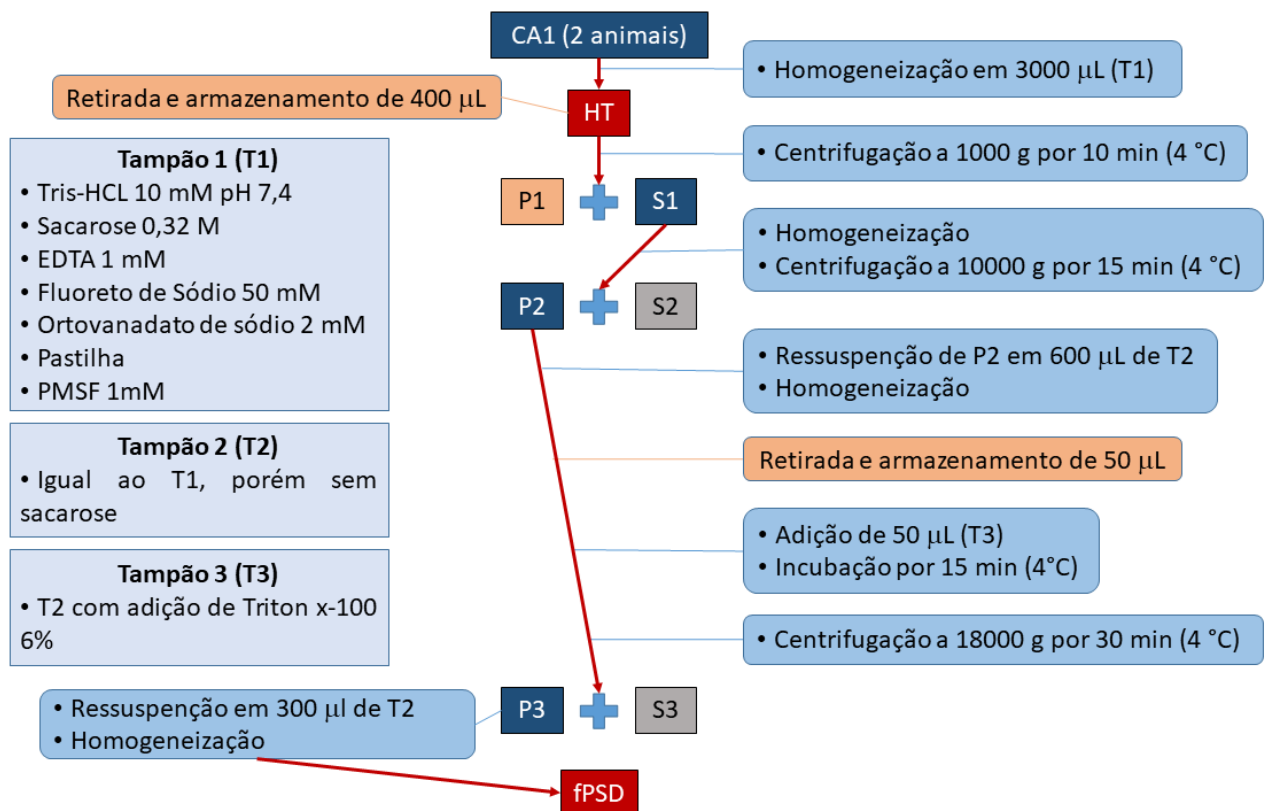


**Figura 3.** Delineamento dos experimentos de Immunoblotting.

Imediatamente após a decapitação, dissecamos a região CA1 do hipocampo dorsal e a congelamos rapidamente em nitrogênio líquido. Utilizamos



dois animais para compor cada número amostral do immunoblotting. Assim, homogeneizamos 4 CA1s em 3 mL de tampão 1 (Tris-HCL 10 mM, pH 7,4, contendo sacarose 0,32 M, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, fluoreto de sódio 50 mM, ortovanadato de sódio 2 mM e pastilha com inibidores de proteases). Retiramos 400  $\mu$ L deste homogenato total (HT) e aliquotamos. Em seguida, centrifugamos o restante do homogenato a 1000 g por 10 min (4 °C). Homogeneizamos o sobrenadante resultante e o centrifugamos a 10.000 g por 15 min (4 °C). Descartamos o sobrenadante resultante e ressuspendemos o precipitado em 600  $\mu$ L de tampão 2 (Tris-HCL 10 mM, pH 7,4, contendo EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, fluoreto de sódio 50 mM, ortovanadato de sódio 2 mM e pastilha com inibidores de proteases). Homogeneizamos o material ressuspendido, retiramos uma alíquota de 50  $\mu$ L e adicionamos o mesmo volume de tampão 3 (Tris-HCL 10 mM, pH 7,4, contendo Triton x-100 6%, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, fluoreto de sódio 50 mM, ortovanadato de sódio 2 mM e pastilha com inibidores de proteases). Colocamos o material sob leve agitação durante 15 min (4 °C) e, em seguida, centrifugamos a 18.000 g por 30 min (4 °C). Descartamos o sobrenadante resultante e ressuspendemos o precipitado em 300  $\mu$ l do tampão 2. Por fim, homogeneizamos o material ressuspendido, obtendo a fração enriquecida em densidade pós-sináptica (fPSD; Fig. 4).



**Figura 4.** Representação esquemática do fracionamento das amostras para imunoblotting. P = precipitado; S = sobrenadante, HT = Homogeneizado total, fPSD = fração rica em densidade pós-sináptica.

Posteriormente, determinamos a concentração proteica de HT e fPSD através do método de Bradford e submetemos quantidades iguais de proteína a separação eletroforética (SDS-page). Em seguida, transferimos as bandas proteicas para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF). Por fim, realizamos a detecção imunológica das proteínas utilizando anticorpos anti-mTOR (Cell Signalling, 1:10.000), anti-pSer2448-mTOR (Cell Signalling, 1:5.000) e anti-pSer2481-mTOR (Santa Cruz, 1:5.000) no HT; e anti-GluN2A (1:20.000), anti-GluN2B (1:5.000), anti-pSer1303-GluN2B (Upstate, 1:5.000), anti-NR1 (Cell Signalling, 1:10.000), anti-GluR1 (UBI, 1:80.000) e anti-GluR2/3 (UBI, 1:80.000) no fPSD, além de anticorpos secundários acoplados a um sistema quimioluminescente (anti-IgG HRP). Detectamos a imunorreatividade utilizando reagente para detecção de quimioluminescência (Amersham ECL Prime, GE Healthcare) e analisamos a densidade das bandas com o auxílio do programa ImageQuant TL (GE Healthcare).

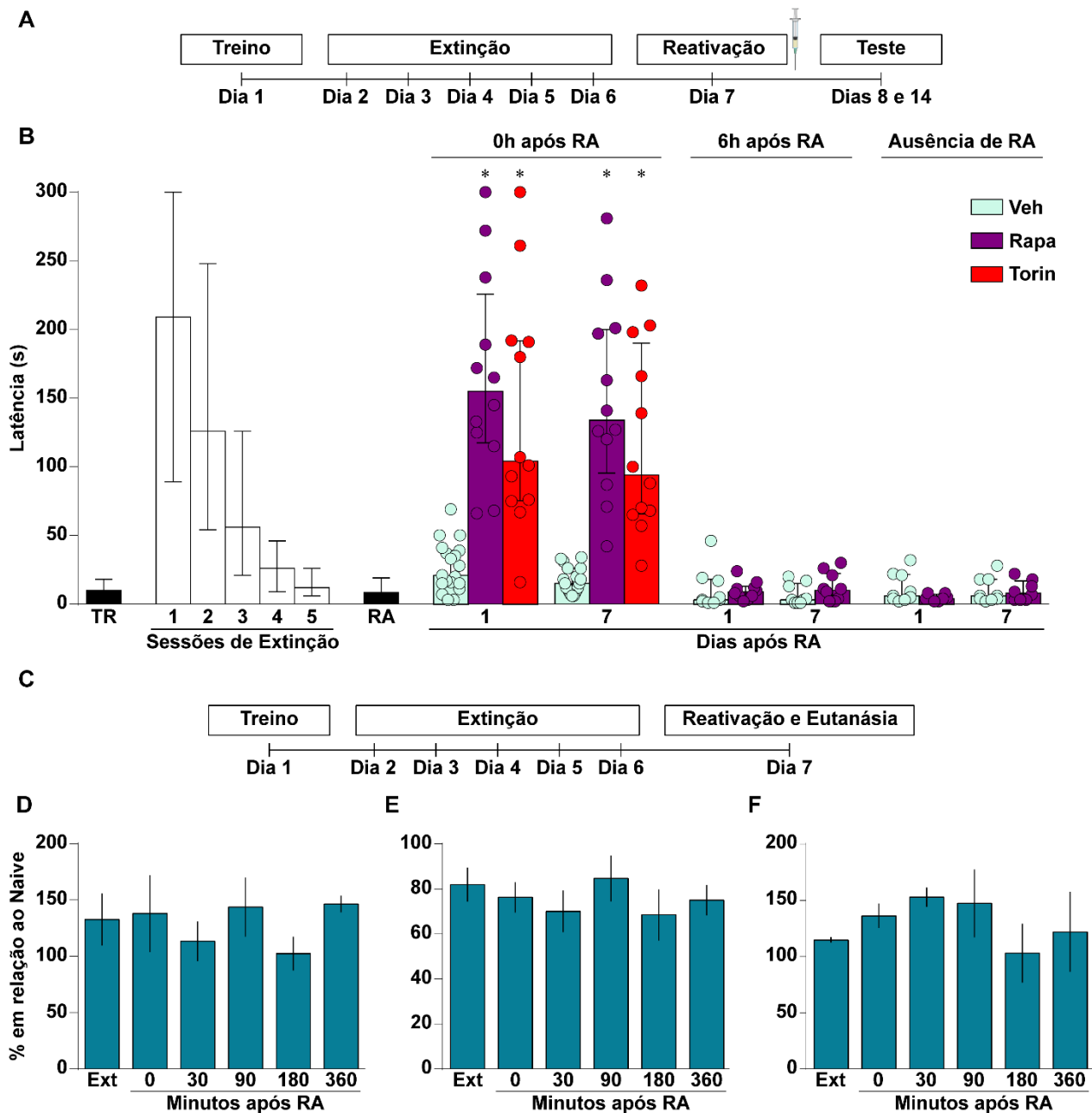
### **3.5. Análise Estatística**

Avaliamos a normalidade e homocedasticidade dos dados através dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Considerando a natureza não paramétrica dos dados comportamentais, utilizamos o teste de Kruskal-Wallis, seguido de post-hoc de Dunn para comparações entre múltiplos grupos. Já para análise dos dados de immunoblotting, que apresentaram distribuição normal, utilizamos ANOVA de uma via, seguida de post-hoc de Sidak. Consideramos significativas diferenças com  $p < 0,05$ . Realizamos os procedimentos estatísticos com auxílio do programa GraphPad Prism 6 para Windows.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. A atividade de mTOR é necessária para reconsolidação da memória de extinção

Para investigar o possível papel de mTOR na reconsolidação da memória de extinção, treinamos os animais na EI, induzimos a extinção da memória aversiva e após a reativação (RA) da memória de extinção infundimos Veh, Rapa ou Torin 2. A administração de ambos antagonistas resultou em aumento na latência para descida da plataforma 1 e 7 dias após a RA, evidenciando um prejuízo na retenção da memória de extinção ( $H_{(13)} = 110,4$ ,  $p < 0,0001$ ; Rapa:  $p < 0,01$  em ambos os tempos; Torin:  $p > 0,05$  1 dia após RA e  $p < 0,01$  7 dias após RA, Fig. 5 B,  $N = 8-19$ ). Não observamos o mesmo efeito quando a administração de Rapa ocorreu 6h após ou na ausência da reativação da memória de extinção ( $p > 0,999$  para todas as comparações, Fig. 5 B). Estes resultados indicam que a atividade de mTOR é necessária para ocorrência da reconsolidação da memória de extinção. Apesar disto, não observamos alterações significativas nos níveis totais de mTOR ( $F_{(5, 18)} = 0,63$ ,  $p = 0,67$ ; Fig. 5 D,  $N = 4$ ), ou na fosforilação desta molécula nas serinas 2481 ( $F_{(5,30)} = 0,52$ ,  $p = 0,75$ ; Fig. 5 E,  $N = 6$ ) e 2448 ( $F_{(5,18)} = 0,74$ ,  $p = 0,6$ ; Fig. 5 F,  $N = 4$ ) nos intervalos de tempo testados.

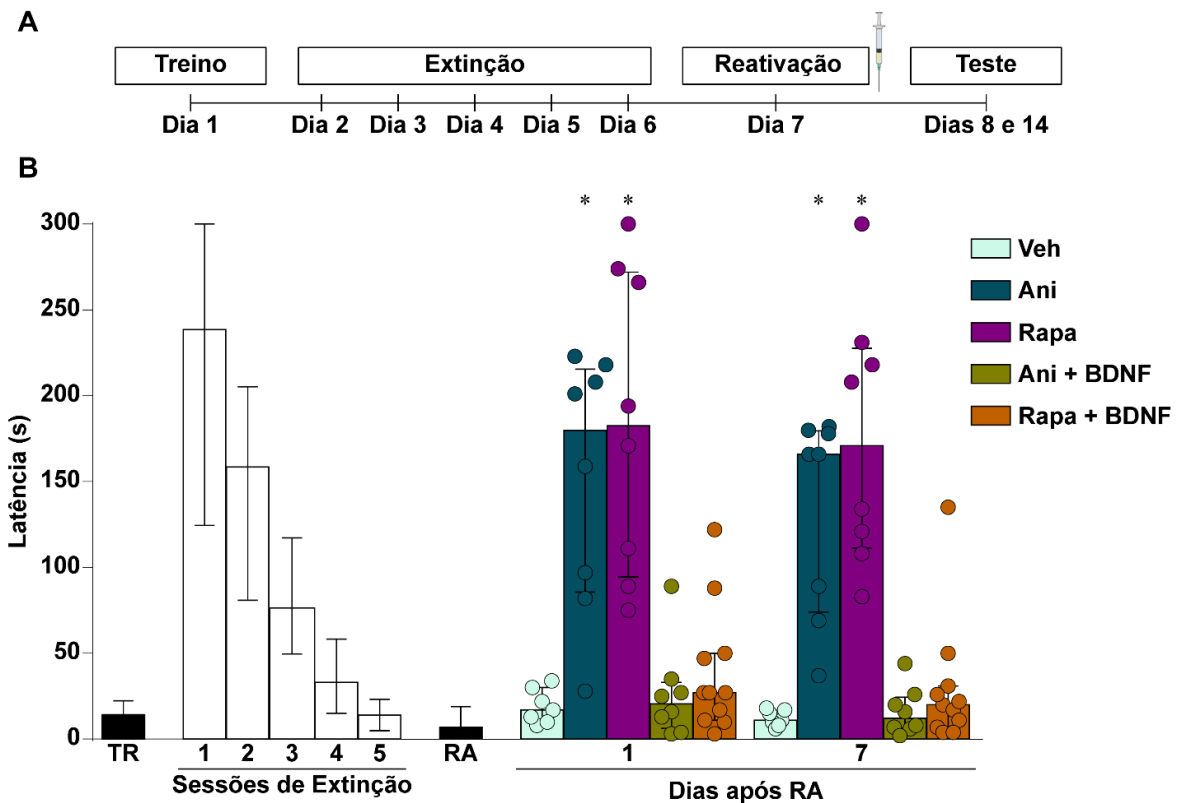


**Figura 5.** (A) Delineamento do experimento comportamental. Treinamos os animais na EI (TR) e, a partir do dia seguinte, os submetemos a uma sessão diária de extinção durante 5 dias. Um dia após a última sessão de extinção, reativamos a memória de extinção e logo em seguida ou 6h depois administramos Veh, Rapa ou Torin 2 bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal. Em parte dos animais, a administração ocorreu na ausência de RA. Avaliamos a retenção da memória de extinção 1 e 7 dias após a RA. (B) A atividade de mTOR é necessária para reconsolidação da memória de extinção. A infusão de Rapa ou Torin imediatamente após a reativação da memória de extinção provocou déficits na retenção desta memória. O mesmo efeito não foi observado com a infusão de Rapa 6h após ou na ausência da RA. Dados expressos como mediana e intervalo interquartil, \*  $p < 0,05$  (post-hoc de Dunn após Kruskal-Wallis) quando comparado ao respectivo veículo.  $N = 9-15$ . (C) Delineamento do experimento para imunoblotting. Treinamos os animais na EI e, a partir do dia seguinte, os submetemos a uma sessão diária de extinção durante 5 dias. Um dia após a última sessão de extinção, reativamos a memória de extinção e eutanásiamos grupos de animais em diferentes intervalos de tempo (imediatamente, 30, 90, 180 e 360 min após a RA). Dissecamos a região CA1 do hipocampo

dorsal e a processamos para Immunoblotting. Como controle, eutanásiamos um grupo de animais que não passou por nenhum procedimento experimental (Naive) e outro que não passou pela sessão de reativação (Ext). A reativação da memória de extinção não induziu alterações significativas nos níveis totais de mTOR (D, N = 4), ou na sua fosforilação nas serinas 2481 (E, N = 6) e 2448 (F, N = 4). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão.

#### **4.2. A coinfusão de BDNF reverte os efeitos amnésicos da Rapamicina**

Em um trabalho anterior, nosso grupo demonstrou que o BDNF é necessário e suficiente para a reconsolidação da memória de extinção (A. Radiske et al., 2015). Sabendo que mTOR também é necessário neste processo reconsolidatório e que ele pode induzir a síntese de BDNF (Baj et al., 2016; Moy et al., 2018), investigamos se o mTOR estaria *upstream* ao BDNF durante a reconsolidação da memória de extinção. Para isso, treinamos os animais na EI, induzimos a extinção da memória aversiva e após a reativação desta memória infundimos Veh, Ani, Rapa, Ani juntamente com BDNF ou Rapa juntamente com BDNF (Fig. 6 A). Como esperado, tanto a administração de Rapa, quanto de Ani induziu aumento na latência para descida da plataforma, evidenciando um déficit na retenção da memória de extinção ( $H_{(9)} = 55,22$ ,  $p < 0,0001$ ; Ani:  $p < 0,05$  1 dias após RA e  $p < 0,01$  7 dias após RA; Rapa:  $p < 0,01$  1 dias após RA e  $p < 0,001$  7 dias após RA; N = 7-11, Fig. 6 B). Em consonância com dados publicados anteriormente (Radiske et al., 2015), a coadministração de BDNF impediu o déficit provocado pela administração de Ani ( $p > 0,999$ ). Além disso, a coinfusão de BDNF também reverteu o déficit provocado pela Rapa ( $p > 0,999$ ), o que sugere que esta neurotrofina está *downstream* ao mTOR e que sua expressão é suficiente para ocorrência da reconsolidação da memória de extinção, mesmo com o bloqueio da atividade de mTOR (Fig. 6 B).



**Figura 6.** (A) Delineamento experimental. Treinamos os animais na EI e, a partir do dia seguinte, os submetemos a uma sessão diária de extinção durante 5 dias. Um dia após a última sessão de extinção, reativamos a memória de extinção e, logo em seguida administramos Veh, Ani, Rapa, Ani juntamente com BDNF ou Rapa juntamente com BDNF bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal. Avaliamos a retenção da memória de extinção 1 e 7 dias após a RA. (B) mTOR controla a síntese de BDNF necessária para reconsolidação da memória de extinção. A administração de Ani ou Rapa provocou déficits na retenção da memória de extinção, os quais foram revertidos pela coadministração de BDNF. Dados expressos como mediana e intervalo interquartil, \*  $p < 0,05$  (post-hoc de Dunn após Kruskal-Wallis) quando comparado ao respectivo veículo (N = 7-11).

### 4.3. O BDNF atua na reconsolidação através do controle do tráfego de AMPARs.

Nossos resultados sugerem a existência de uma via mTOR-BDNF durante a reconsolidação da memória de extinção. Sabe-se que esta neurotrofina atua através de diversos mecanismos para induzir plasticidade e que uma parte importante desses mecanismos é a indução da síntese de proteínas (Genheden et al., 2015; Leal, Comprido, & Duarte, 2014; Panja & Bramham, 2014). Porém, nós demonstramos que o BDNF é suficiente para reconsolidação da memória de extinção mesmo quando a síntese proteica está bloqueada em diferentes níveis. Assim, deve haver um mecanismo independente de síntese proteica através do

qual o BDNF mantém a reestabilização da memória. Considerando que o BDNF controla o tráfego de AMPARs para membrana e que este tráfego é importante para reconsolidação em outros delineamentos experimentais (Bhattacharya et al., 2017; Jourdi & Kabbaj, 2013; Rao-Ruiz et al., 2011; Rossato et al., 2019), hipotetizamos que este é o mecanismo através do qual o BDNF mantém a reestabilização do traço mnemônico durante a reconsolidação. Para testar esta hipótese, antagonizamos uma das vias de tráfego de AMPARs, utilizando um inibidor da interação da subunidade GluR2 do AMPAR com a proteína NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein*), o pep2m (Ralph et al., 2001). Primeiramente, buscamos determinar se esta via de tráfego de AMPARs é importante durante a reconsolidação da memória de extinção. Para tanto, treinamos os ratos na EI, induzimos a extinção da memória aversiva e, logo após a reativação, administramos Veh ou pep2m na região CA1 do hipocampo dorsal. Como resultado, observamos que esta infusão provocou o aumento na latência para descida da plataforma avaliada 1 e 7 dias após a RA, evidenciando prejuízo na retenção da memória de extinção ( $H_{(7)} = 38,31$ ,  $p < 0,0001$ ;  $p < 0,001$  1 dias após RA;  $p < 0,01$  7 dias após RA;  $N = 7-9$ , Fig. 7 B). O mesmo déficit não foi observado quando infundimos o pep2m na ausência de RA ( $p > 0,999$ , Fig. 7 B).

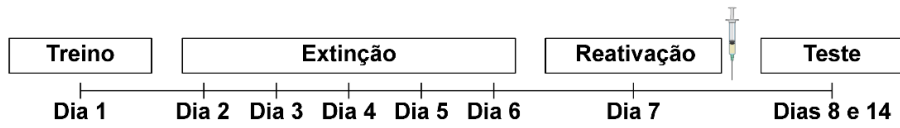
Em seguida, buscamos identificar a possível relação entre BDNF e o tráfego de AMPARs. Para isso, realizamos o mesmo procedimento do experimento anterior e administramos Veh, Rapa, pep2m, Rapa juntamente com BDNF ou pep2m juntamente com BDNF. A ideia por trás deste experimento é que se o BDNF está de fato atuando através do aumento do tráfego de AMPARs pela via da NSF, sua coinfusão não deveria ser capaz de reverter o efeito da inibição da via. Foi exatamente isto que observamos. A infusão de Rapa ou pep2m induziu aumento na latência para descida da plataforma, demonstrando déficits na retenção da memória de extinção que perduraram até 7 dias após a RA ( $H_{(9)} = 49,76$ ,  $p < 0,0001$ ; Rapa:  $p < 0,01$  1 e 7 dias após RA; pep2m:  $p < 0,01$  1 dias após RA e  $p < 0,05$  7 dias após RA,  $N = 6-12$ , Fig. 7 C). A coinfusão de BDNF foi capaz de reverter o efeito amnésico da Rapa ( $p > 0,999$ ), mas não o efeito do pep2m ( $p < 0,05$  1 e 7 dias após RA, Fig. 7 C).

Apesar de nossos resultados demonstrarem a importância do tráfego de AMPARs na reconsolidação da memória de extinção, não encontramos

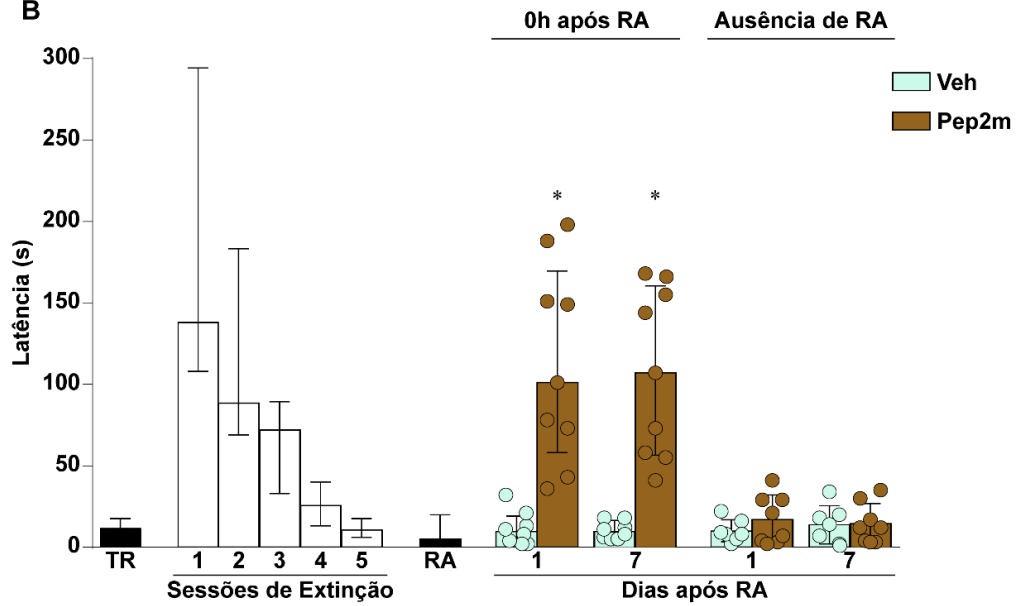


alterações significativas nos níveis de GluR1 ( $F_{(5,36)} = 0,99$ ,  $p = 0,43$ ;  $N = 7$ ; Fig. 7 E), ou GluR2/3 ( $F_{(5,36)} = 1,31$ ,  $p = 0,28$ ;  $N = 7$ ; Fig. 7 F) após a reativação da memória de extinção.

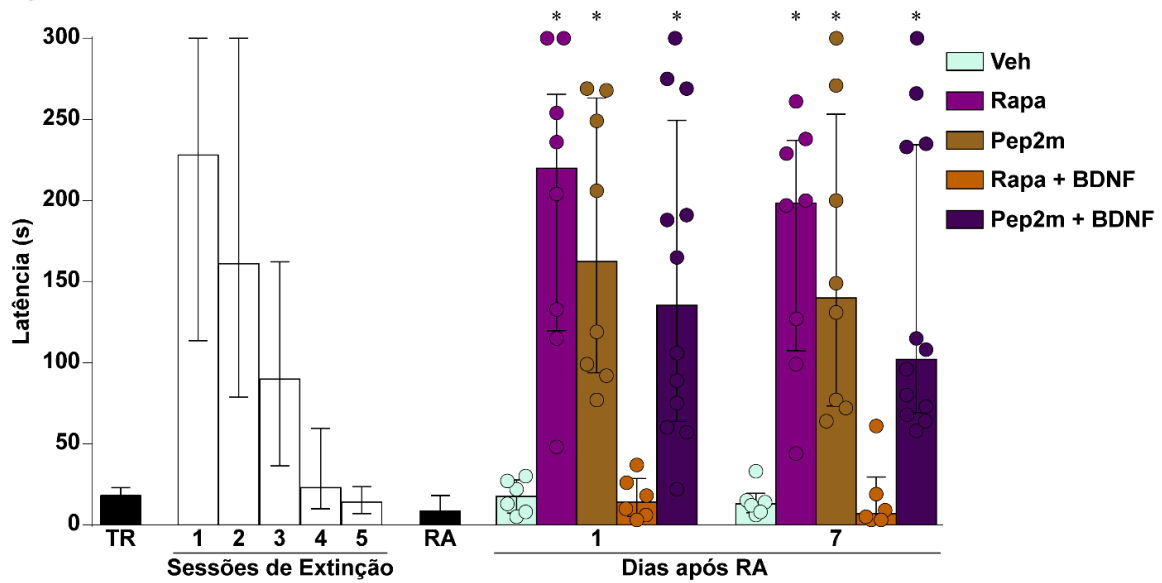
**A**



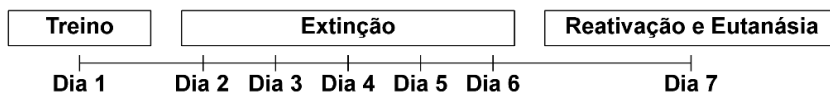
**B**



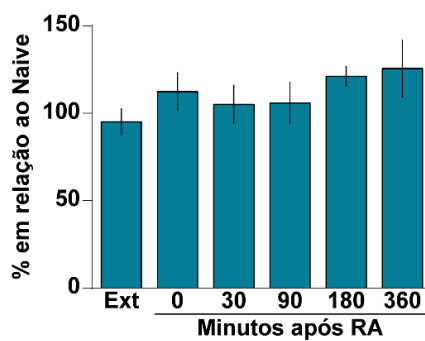
**C**



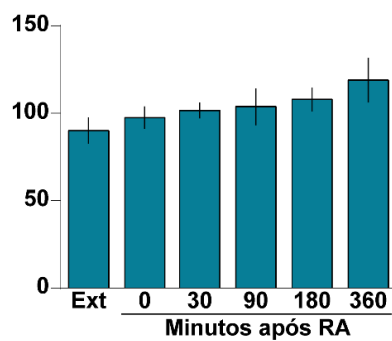
**D**



**E**



**F**



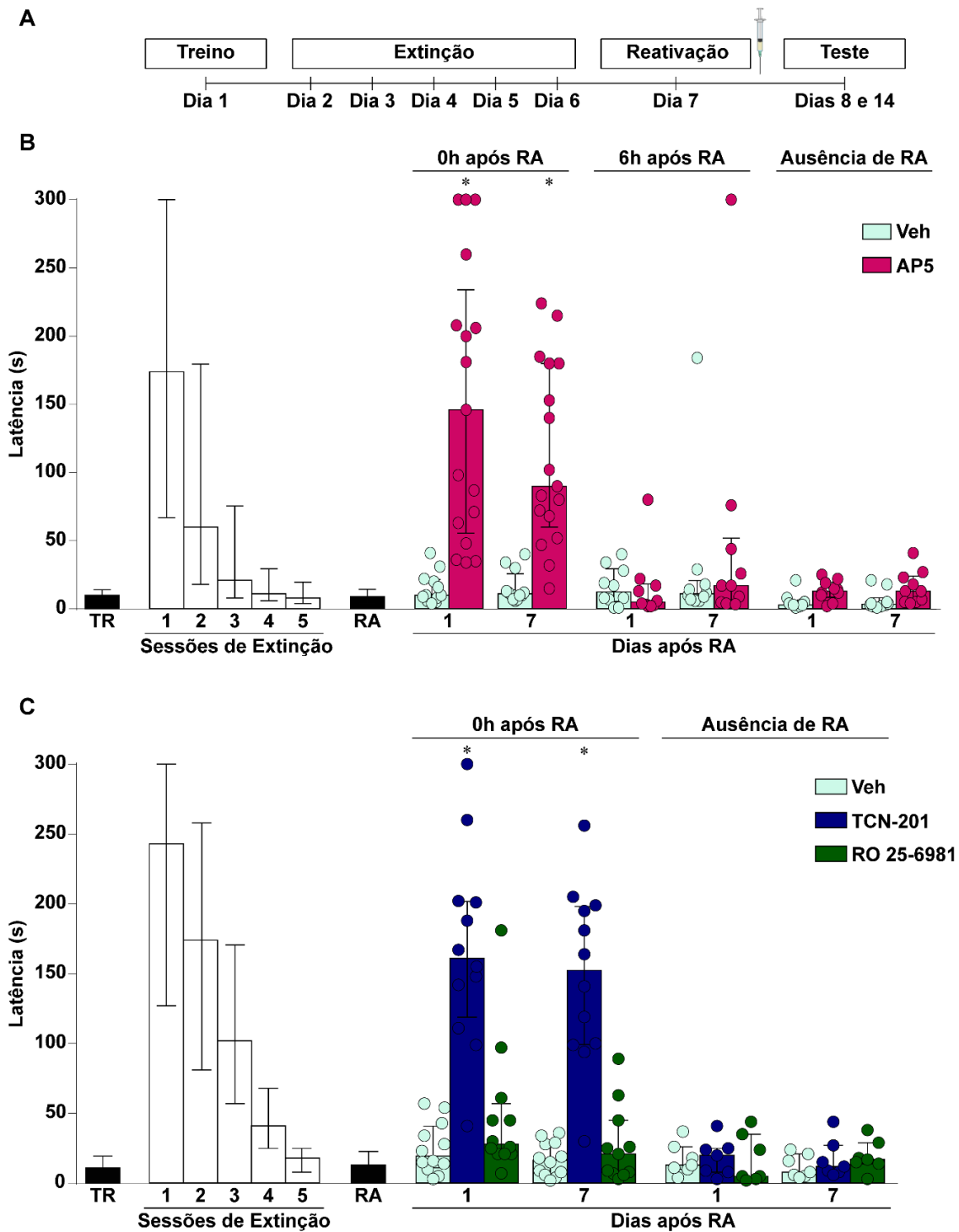
**Figura 7.** (A) Delineamento do experimento comportamental. Treinamos os animais na EI e, a partir do dia seguinte, os submetemos a uma sessão diária de extinção durante 5 dias. Um dia após a última sessão de extinção, reativamos a memória de extinção e logo em seguida administramos Veh, Rapa, pep2m, Rapa juntamente com BDNF ou pep2m juntamente com BDNF bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal. Em parte dos animais, a administração ocorreu na ausência de reativação. Avaliamos a retenção da memória de extinção 1 e 7 dias após a RA. (B) O tráfego de AMPARs é necessário para reconsolidação da memória de extinção. A administração de pep2m prejudicou a manutenção da memória de extinção testada 1 e 7 dias após a RA. O mesmo efeito não foi observado quando a infusão ocorreu na ausência de RA. (C) O BDNF atua na reconsolidação da memória de extinção através do controle do tráfego de AMPARs. A coinfusão de BDNF foi novamente capaz de reverter o efeito amnésico da Rapa, mas não reverteu o efeito do pep2m, sugerindo que o BDNF induz o tráfego de AMPARs. Dados expressos como mediana e intervalo interquartil, \*  $p < 0,05$  (post-hoc de Dunn após Kruskal-Wallis) quando comparado ao respectivo veículo.  $N = 6-12$ . (D) Delineamento do experimento para immunoblotting. Treinamos os animais na EI e, a partir do dia seguinte, os submetemos a uma sessão diária de extinção durante 5 dias. Um dia após a última sessão de extinção, reativamos a memória de extinção e eutanasiamos grupos de animais em diferentes intervalos de tempo (imediatamente, 30, 90, 180 e 360 min após a reativação). Dissecamos a região CA1 do hipocampo dorsal e a processamos para Immunoblotting. Como controle, eutanasiamos um grupo de animais que não passou por nenhum procedimento experimental (Naive) e outro que não passou pela sessão de reativação (Ext). A reativação da memória de extinção não induziu alterações significativas nos níveis totais de GluR1 (E,  $N = 7$ ) e GluR2/3 (F,  $N = 7$ ). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão.

#### **4.4. A atividade de NMDAR contendo a subunidade GluN2A é necessária para reestabilização da memória de extinção, enquanto a atividade de NMDARs contendo a subunidade GluN2B é necessária para sua desestabilização.**

Com o objetivo de investigar o possível papel dos NMDARs na reconsolidação da memória de extinção, utilizamos o mesmo protocolo dos experimentos anteriores e infundimos AP5 imediatamente após a reativação da memória de extinção. O bloqueio de NMDARs aumentou a latência para descida da plataforma avaliada 1 e 7 dias após a sessão de reativação, evidenciando déficits na retenção da memória de extinção ( $H_{(11)} = 138$ ,  $p < 0,0001$ ;  $p < 0,001$  1 dias após RA e  $p < 0,01$  7 dias após RA;  $N = 10-17$ ; Fig. 8 B). O mesmo efeito amnésico não foi observado quando a infusão ocorreu 6h após ou na ausência da reativação da memória de extinção ( $p > 0,999$ , Fig. 8 B).

Tendo identificado o papel de NMDARs e considerando o fato diferentes tipos de subunidade GluN2 podem ativar diferentes cascatas (Sun, Xu, et al., 2018; Zhang & Luo, 2013), buscamos investigar o papel de NMDARs contendo

subunidades GluN2A (GluN2A/NMDAR) e NMDAR contendo subunidades GluN2B (GluN2B/NMDAR) na reconsolidação da memória de extinção. Neste sentido, administramos os antagonistas específicos de GluN2A/NMDARs (TCN-201) e GluN2B/NMDARs (Ro 25-6981) imediatamente após a sessão de reativação da memória de extinção. Como resultado observamos que a infusão do TCN-201, mas não de Ro 25-6981, provocou aumento na latência para descida da plataforma 1 e 7 dias após a sessão de reativação ( $H_{(11)} = 60,17$ ,  $p < 0,0001$ ; TCN-201:  $p < 0,01$  1 dias após RA e  $p < 0,001$  7 dias após RA;  $N = 7-12$ ; Fig. 8 C). Nenhum dos fármacos causou déficits quando a infusão ocorreu na ausência da sessão de reativação da memória de extinção ( $p > 0,999$ ). Estes resultados demonstram que a atividade de GluN2A/NMDARs é necessária para reconsolidação da memória de extinção.

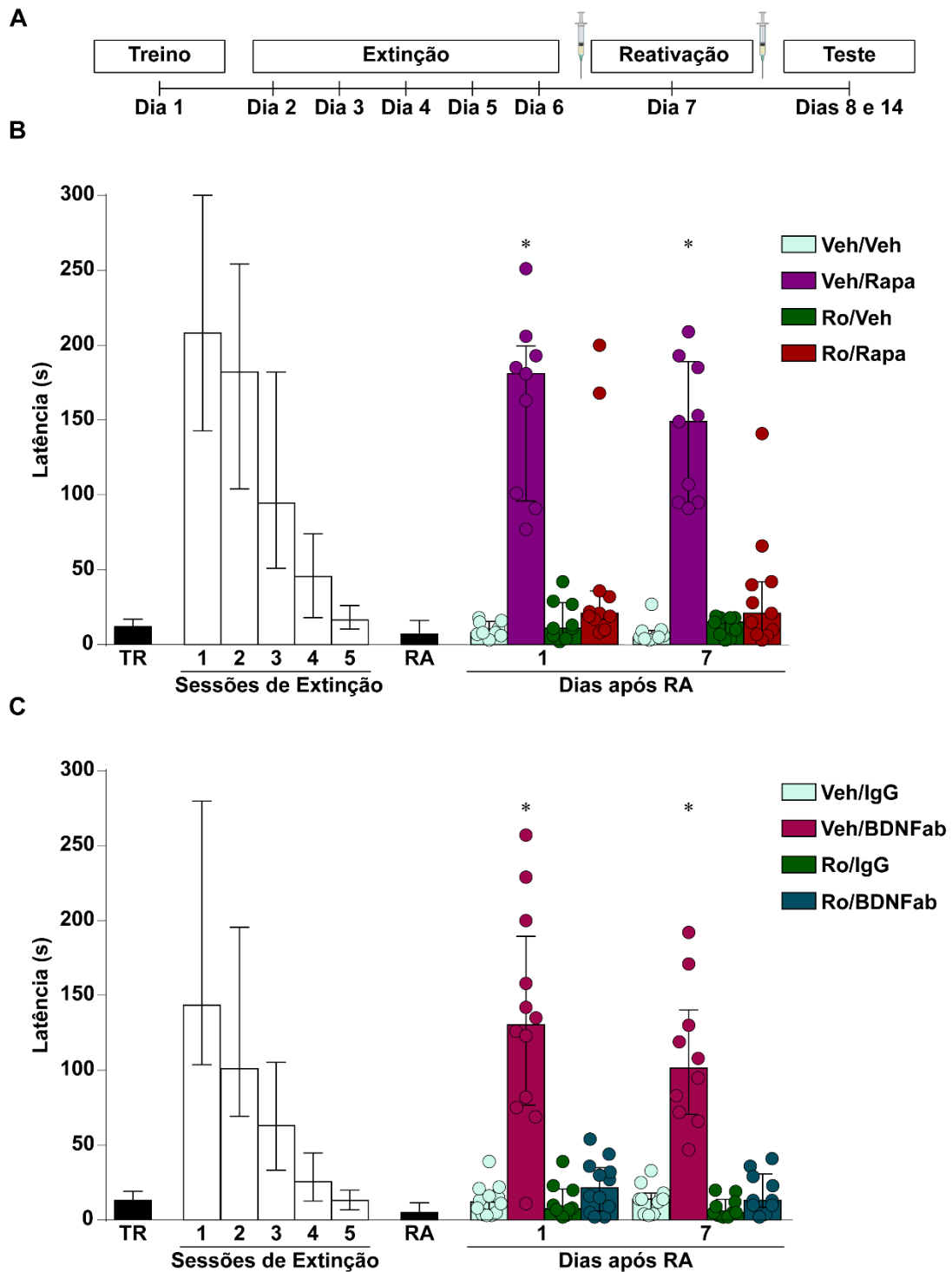


**Figura 8.** (A) Delineamento experimental. Treinamos os animais na EI e, a partir do dia seguinte, os submetemos a uma sessão diária de extinção durante 5 dias. Um dia após a última sessão de extinção, reativamos a memória de extinção e logo em seguida ou 6h mais tarde administramos Veh, AP5, TCN-201 ou Ro 25-6981 bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal. Em parte dos animais, a administração ocorreu na ausência de RA. Avaliamos a retenção da memória de extinção 1 e 7 dias após a RA. (B) Os NMDARs são necessários para reconsolidação da memória de extinção. A infusão do antagonista de NMDAR causou déficits na manutenção da memória de extinção avaliada 1 e 7 dias após a RA. O mesmo efeito não foi

observado quando a infusão ocorreu 6h após ou na ausência de RA. (C) NMDARs contendo GluN2A, mas não os contendo GluN2B, são necessários para reconsolidação da memória de extinção. A infusão do antagonista específico de GluN2A/NMDARs TCN-201, mas não do antagonista específico de GluN2B/NMDARs Ro 25-6981, provocou déficits na retenção da memória de extinção avaliada 1 e 7 dias após a RA. O mesmo efeito não foi observado quando as infusões ocorreram na ausência de RA. Dados expressos como mediana e intervalo interquartil, \*  $p < 0,05$  (post-hoc de Dunn após Kruskal-Wallis) quando comparado ao respectivo veículo.  $N = 7-12$ .

Sabemos que para que possa ser reconsolidada, uma memória precisa primeiramente ser desestabilizada e depois reestabilizada para que possa permanecer armazenada. Nesse sentido, Milton e colaboradores (2013) demonstraram uma dissociação entre a ação dos GluN2A/NMDARs e GluN2B/NMDARs na amígdala basolateral durante a reconsolidação na tarefa de condicionamento auditivo ao medo. Eles observaram que os GluN2B/NMDARs são necessários apenas para desestabilização, enquanto os GluN2A/NMDARs são necessários apenas para reestabilização do traço mnemônico. Assim, decidimos investigar a existência dessa dissociação no hipocampo durante a reconsolidação da memória de extinção. Já demonstramos que os GluN2A/NMDARs atuam na janela de reestabilização, então procuramos definir se os GluN2B/NMDARs atuam na janela da desestabilização. Para tanto, treinamos os animais na EI e induzimos a extinção da memória aversiva. 15 minutos antes da RA, administramos Veh ou Ro 25-6189 e imediatamente após a RA, administramos Veh ou substâncias que já tinham afeito amnésico conhecido, Rapa e BDNFab. Se os GluN2B/NMDARs são necessários para desestabilização, o bloqueio de sua atividade deveria impedir este processo e assim prevenir os efeitos dos agentes amnésicos administrados posteriormente. Observamos exatamente isto, os animais que receberam Veh antes e Rapa após a RA apresentaram aumento na latência para descida da plataforma 1 e 7 dias após a RA ( $H_{(7)} = 46,54$ ,  $p < 0,0001$ ; Rapa:  $p < 0,001$  1 dia após RA e  $p < 0,0001$  7 dias após RA;  $N = 9-11$ ; Fig. 9 B). O mesmo não ocorreu nos animais que receberam Ro 25-6981 antes e Rapa após a RA ( $p = 0,84$ ). Da mesma forma, os animais que receberam Veh antes e BDNFab logo após a RA apresentaram aumento na latência para descida da plataforma 1 e 7 dias após a RA ( $H_{(7)} = 51,51$ ,  $p < 0,0001$ ; BDNFab:  $p < 0,001$  1 e 7 dias após RA;  $N = 10-12$ ; Fig. 9 C). Efeito não observado nos animais que receberam Ro 25-6189 antes e BDNFab

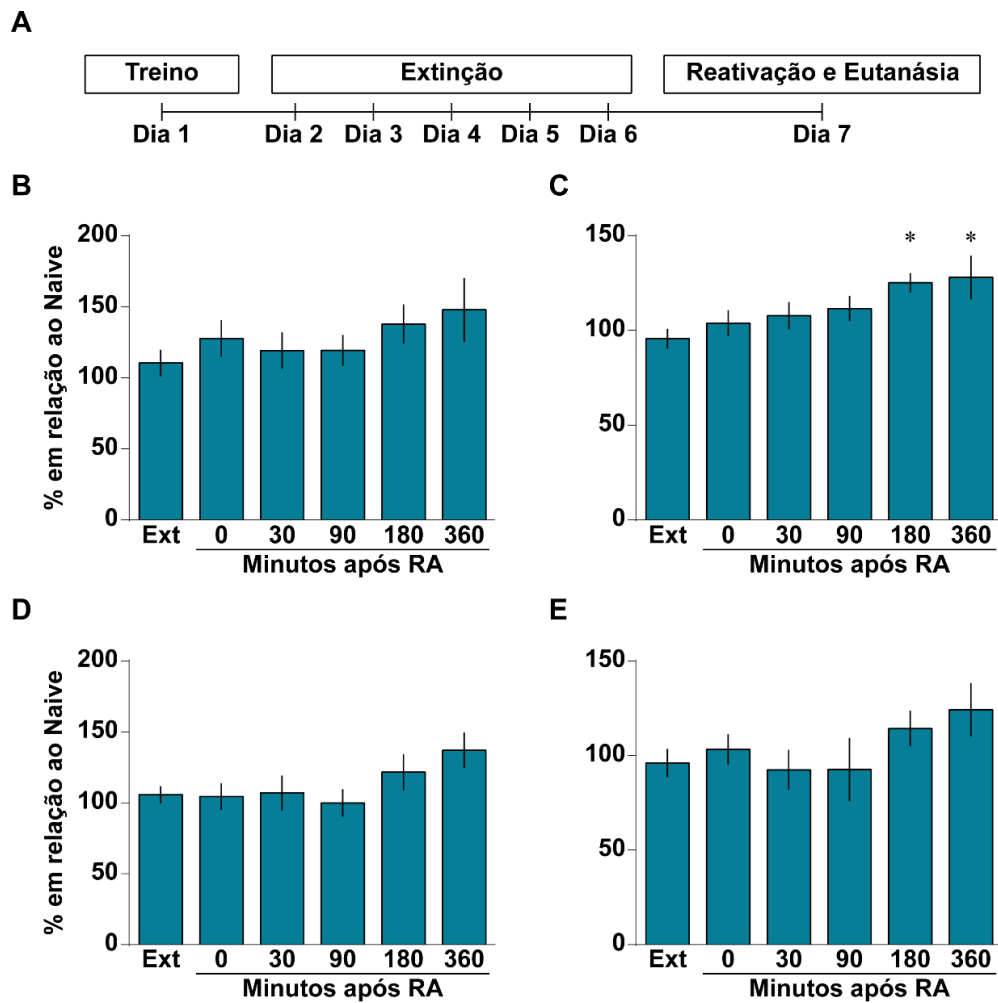
imediatamente após a RA ( $p > 0,999$ ). Estes resultados sugerem que existe de fato uma dissociação entre os NMDARs no hipocampo durante a reconsolidação da memória de extinção, tendo os GluN2B/NMDARs ação específica na desestabilização do traço mnemônico e os GluN2A/NMDARs ação específica na reestabilização do mesmo.



**Figura 9.** (A) Delineamento experimental. Treinamos os animais na EI e, a partir do dia seguinte, os submetemos a uma sessão diária de extinção durante 5 dias. Um dia após a última sessão de extinção, reativamos a memória de extinção. 15 minutos antes da RA, administramos Veh, ou Ro 25-6981 e logo após a RA administramos Veh, IgG controle, Rapa ou BDNFab bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal. Avaliamos a retenção da memória de extinção 1 e 7 dias após a RA. (B e C) A atividade de receptores GluN2B/NMDARs é necessária para desestabilização da memória de extinção. A infusão de Ro 25-6981 antes da RA reverteu os efeitos amnésicos das infusões de Rapa (B, N = 9-11) e BDNFab (C, N = 10-12) após a RA. Dados expressos como mediana e intervalo interquartil, \*  $p < 0,05$  (post-hoc de Dunn após Kruskal-Wallis) quando comparado ao respectivo veículo.

Nós também investigamos se a reativação da memória de extinção provoca alterações nos níveis das subunidades que compõem os NMDAR. Não observamos alterações significativas nos níveis de GluN1 ( $F(5,36) = 0,93$ ,  $p = 0,47$ ; N = 7; Fig. 10 B), GluN2B total ( $F(5,36) = 1,73$ ,  $p = 0,15$ ; N = 7; Fig. 10 D) e GluN2B fosforilado na serina 1303 ( $F(5,36) = 1,26$ ,  $p = 0,3$ ; N = 7; Fig. 10 F), mas encontramos um aumento na expressão de GluN2A, que foi significativo 180 e 360 min após a RA ( $F(5,36) = 2,83$ ,  $p < 0,05$ ; 180 min:  $p < 0,05$ ; 360 min:  $p < 0,05$ ; N = 7; Fig. 10 C).





**Figura 10.** (A) Delineamento experimental. Treinamos os animais na EI e, a partir do dia seguinte, os submetemos a uma sessão diária de extinção durante 5 dias. Um dia após a última sessão de extinção, reativamos a memória de extinção e eutanásiamos grupos de animais em diferentes intervalos de tempo (imediatamente, 30, 90, 180 e 360 min após a reativação). Dissecamos a região CA1 do hipocampo dorsal e a processamos para Immunoblotting. Como controle, eutanásiamos um grupo de animais que não passou por nenhum procedimento experimental (Naive) e outro que não passou pela sessão de reativação (Ext). A reativação da memória de extinção não provocou alterações significativas nos níveis de NR1 (B), GluN2B total (D) ou GluN2B fosforilado na serina 1303 (E), mas induziu aumento na expressão de GluN2A 180 e 360 min após a RA (C). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão, \* $p < 0,05$  (post-hoc de Sidak após ANOVA de uma via) comparado ao Ext.  $N = 7$ .

## 5. DISCUSSÃO

Com o objetivo de melhor entender os mecanismos moleculares envolvidos na reconsolidação da memória de extinção utilizamos a EI. Esta tarefa já foi amplamente utilizada em estudos de memória por, dentre outras razões, ser capaz de gerar uma resposta aversiva persistente após um único treino (Bekinschtein et al., 2008; Cammarota et al., 1995; Giovannini, Lana, & Pepeu, 2015; Slipczuk et al., 2009). Porém, a repetida reexposição dos animais ao aparato na ausência de choque induz a extinção da resposta aversiva e esta memória de extinção é passível de reconsolidação, processo que é BDNF-dependente (Radiske et al., 2015; Rossato et al., 2010). Estendendo estes resultados, demonstramos que a atividade de mTOR é importante para reconsolidação da memória de extinção; que este mTOR parece controlar a síntese de BDNF necessária durante o processo; e que esta neurotrofina atua através do controle do tráfego de AMPARs para manter a reestabilização do traço. Além disso, demonstramos a importância da atividade de NMDARs durante a reconsolidação da memória de extinção e uma dissociação entre os GluN2B/NMDARs, que participam da desestabilização, e os GluN2A/NMDARs, que participam da reestabilização do traço mnemônico.

Ainda no que se refere a EI, alguns trabalhos observaram que a inibição da síntese proteica no hipocampo após diferentes sessões de reativação não provoca déficits na retenção da memória (Cammarota, Bevilaqua, Medina, & Izquierdo, 2004; Power et al., 2006; Taubenfeld, Milekic, Monti, & Alberini, 2001). Estes resultados poderiam ser explicados pela não ocorrência de reconsolidação na memória da EI ou ainda, pela não participação do hipocampo neste processo. Porém, os nossos resultados com a reconsolidação da extinção, bem como um trabalho mais recente de nosso grupo (Radiske, Gonzalez, et al., 2017), comprovam que o hipocampo participa sim da reconsolidação da memória da EI, porém apenas quando existem predições contraditórias em relação ao possível resultado da resposta aversiva.

A importância da síntese proteica para plasticidade e o armazenamento de memória já é bem estabelecida. A síntese de novas proteínas é necessária para a fase tardia da LTP e o bloqueio desta síntese, em regiões como hipocampo, córtex pré-frontal e amígdala, provoca déficits de memória nos mais

diversos paradigmas comportamentais (Bourtchouladze et al., 1998; Frey, Krug, Reymann, & Matthies, 1988; Hernandez, Sadeghian, & Kelley, 2002; Kang & Schuman, 1996; Schafe & LeDoux, 2000; Stanton & Sarvey, 1984). Também já foi amplamente demonstrado que a formação de novas proteínas é essencial para reestabilização do traço mnemônico após sua reativação (Milekic & Alberini, 2002; Nader, 2015; Nader et al., 2000; Rossato et al., 2010, 2007). Como dito anteriormente, mTOR tem papel importante no controle da síntese de diversas proteínas através da atuação do mTORC1, o qual tem a Raptor como importante constituinte. A rapamicina forma um complexo com a proteína FKBP12 e se liga ao domínio FRB de mTOR, o que prejudica a interação de mTOR com a Raptor, levando a inibição da atividade de mTORC1 (Dunlop & Tee, 2009; Giese & Mizuno, 2013; Hoeffler & Klann, 2010). Pelo menos uma parte destas proteínas, cuja tradução é controlada por mTORC1, parece estar associada a plasticidade e memória, já que a inibição deste complexo inibe a LTP e provoca déficits de memória em diversas tarefas comportamentais (Bekinschtein et al., 2007; Dash et al., 2006; Tang et al., 2002). Dessa forma, faz sentido que mTOR esteja envolvido no processo de reconsolidação, o que já foi demonstrado em outras tarefas comportamentais (Blundell, Kouser, & Powell, 2008; Myskiw et al., 2008) e nossos resultados demonstram na EI.

O mTOR também pode se associar a proteína Rictor (*Rapamycin-insensitive companion of mammalian target of rapamycin*) e formar, juntamente com mLST8, Deptor, Tti1, Tel2, mSin1 (*mammalian stress-activated protein kinase-interacting protein1*) e Protor (*protein observed with Rictor*), o complexo mTOR 2 (mTORC2), o qual é insensível a ação aguda da Rapa (Switon, Kotulska, Janusz-Kaminska, Zmorzynska, & Jaworski, 2017). As funções deste complexo são menos conhecidas do que as do mTORC1, porém já se sabe que ele é importante para sobrevivência celular e que controla a organização da actina, função que tem papel importante na consolidação de memórias (K. Huang & Fingar, 2014; W. Huang et al., 2013; Jacinto et al., 2004). Diferentemente do que ocorre com a Rapa, a infusão aguda de Torin 2 é capaz de inibir tanto a atividade de mTORC1, quanto a de mTORC2, já que ele compete pela ligação do ATP ao sítio catalítico de mTOR (Liu et al., 2013; Zask, Verheijen, & Richard, 2011). Dessa forma, Torin 2 causaria uma inibição mais completa das funções de mTOR. Porém, esta diferença de espectro de ação não se refletiu na

capacidade de inibição da reconsolidação da memória de extinção, já que Rapa provocou o mesmo nível de déficits em concentrações inferiores. Os mecanismos por trás desta observação precisariam ser melhor estudados. Uma possível explicação é que mTORC2 possua alguma função oposta as de mTORC1 que atue “contra” a reestabilização do traço mnemônico, a qual seria inibida pelo Torin 2. Como dito anteriormente, ainda se sabe muito pouco sobre as funções de mTORC2, mas aparentemente ele tem ação oposta a mTORC1 no controle da função mitocondrial, já que a inibição de mTORC1 reduz o consumo de oxigênio por estas organelas, enquanto a inativação de Rictor (por *knockdown*) aumenta este consumo (Schieke et al., 2006). Além disso, em um dos poucos trabalhos utilizando Torin 2 e Rapa *in vivo* foi necessário o uso de doses maiores de Torin 2 para obtenção de efeito semelhante ao da Rapa (Vogel, Ainslie, & Gibson, 2016). Outra possibilidade é que mTORC2 não participe da reestabilização do traço durante a reconsolidação da memória de extinção e Torin 2 tenha uma menor eficiência na inibição de mTORC1 quando comparado a Rapa.

Apesar de termos observado a importância de mTOR nos experimentos farmacológicos, não encontramos alterações significativas nos níveis desta molécula nem na sua fosforilação através de immunoblotting. Este resultado pode se dever ao fato de não ocorrerem alterações de expressão, mas apenas de nível de ativação, ou ao fato das alterações acontecerem em um nível que ultrapassa a resolução da técnica utilizada.

Nossos resultados sugerem que uma das moléculas cuja síntese é controlada pelo mTORC1 é o BDNF, uma vez que a coadministração desta neurotrofina aboliu o efeito amnésico da inibição de mTORC1. Corroborando esta ideia, trabalhos recentes demonstraram que mTORC1 e/ou seus efetores são necessários para síntese de BDNF em neurônios no hipocampo e nos gânglios da raiz dorsal (Baj et al., 2016; Moy et al., 2018). Considerando que o BDNF é capaz de ativar mTORC1 através da via PI3K-Akt-mTOR (Begni et al., 2017; Dunlop & Tee, 2009; Hoeffler & Klann, 2010), é possível que exista uma alça de retroalimentação positiva entre estas moléculas durante a reconsolidação da memória de extinção. É importante destacar que apesar de alguns trabalhos afirmarem que o BDNF participa apenas da consolidação e não

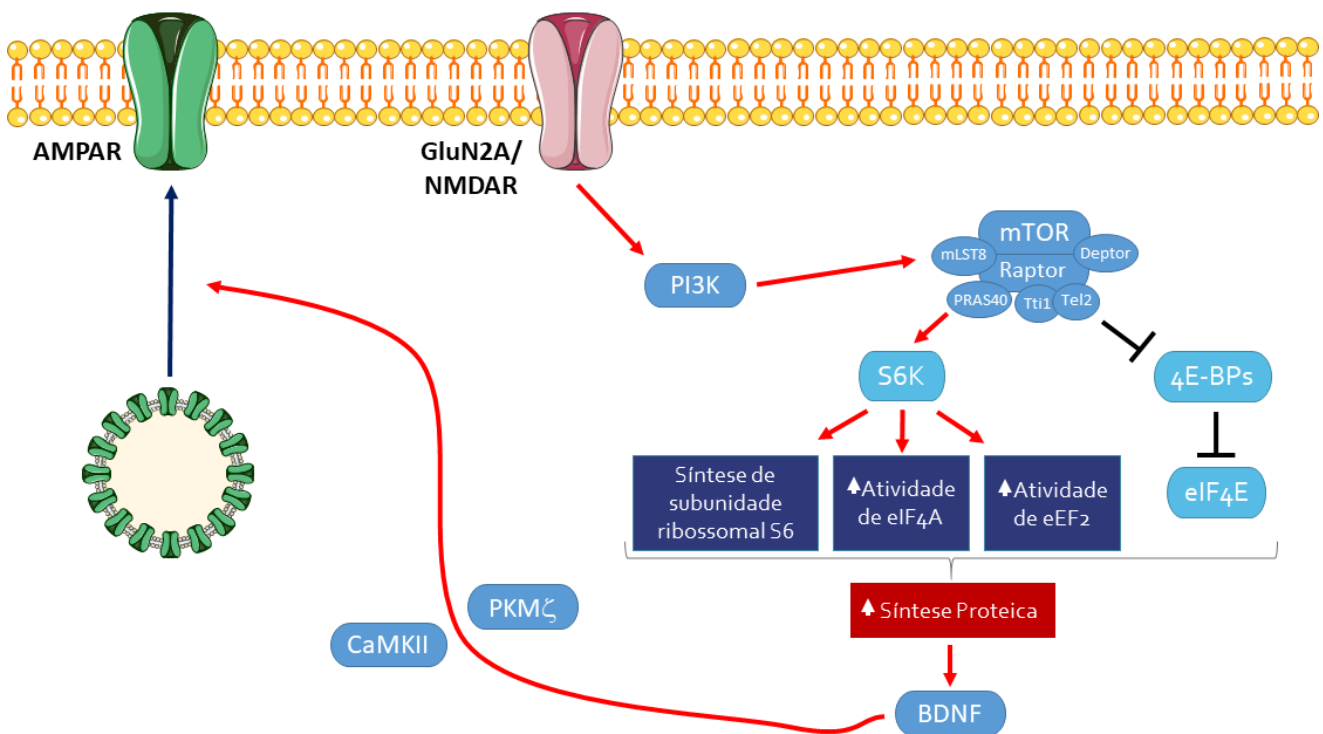
da reconsolidação de memórias (Lee, 2004; Lee & Hynds, 2013), trabalhos do nosso e de outros grupos já demonstraram o papel desta neurotrofina na reconsolidação de memórias aversivas e não aversivas (Giachero, Bustos, Calfa, & Molina, 2013; Radiske et al., 2015; Radiske et al., 2017; Rossato et al., 2019; Samartgis, Schachte, Hazi, & Crowe, 2012; Y. Wang et al., 2012).

Nós demonstramos que o BDNF é capaz de manter a reestabilização da memória de extinção mesmo com a inibição da síntese proteica por Ani e Rapa. Estes resultados sugerem a existência de algum mecanismo independente de síntese proteica, através do qual o BDNF é capaz de manter esta reestabilização. Nesse sentido, já foi demonstrado que, apesar de ser um indutor de síntese proteica (Genheden et al., 2015; Leal et al., 2014), o BDNF regula alguns mecanismos plásticos de forma independente desta síntese (Panja & Bramham, 2014). Alguns exemplos são o aumento da inserção de PSD-95 na sinapse (Yoshii & Constantine-Paton, 2007), o que é importante para o ancoragem de AMPARs (Opazo, Sainlos, & Choquet, 2012); o aumento na transmissão sináptica de alta frequência no hipocampo (Gottschalk et al., 1999); e a manutenção da atividade da PKM $\zeta$  (Mei et al., 2011). Outra ação do BDNF que pode ocorrer de forma independente de síntese proteica é o controle do tráfego de AMPAR (Jourdi & Kabbaj, 2013; Rossato et al., 2019), processo que é importante para reconsolidação de memórias (Bhattacharya et al., 2017; Rao-Ruiz et al., 2011; Rossato et al., 2019). Neste sentido, nós comprovamos que o tráfego de AMPAR é necessário para reconsolidação da memória de extinção, já que sua inibição através da administração de pep2m causou déficits na retenção da memória. Bem como, demonstramos que a coadministração de BDNF não foi capaz de reverter este efeito amnésico de pep2m. Este último resultado é um indicativo de que este tráfego está *downstream* a atividade do BDNF. Corroborando esta ideia, um trabalho recente do nosso grupo demonstrou que durante a reconsolidação da memória reconhecimento de objetos, o BDNF controla o tráfego de AMPARs através da manutenção da atividade da PKM $\zeta$  (Rossato et al., 2019). Além disso, estudos afirmam que a CaMKII, uma das moléculas ativadas pelo BDNF, induz o tráfego de AMPARs (Lisman, Yasuda, & Raghavachari, 2012).

Como discutido anteriormente, os NMDARs são necessários para LTP em CA1 e participam de praticamente todas as fases do processamento mnemônico (Baltaci et al., 2018; Hafenbreidel et al., 2017; Lopez et al., 2015; Morris, 2013; Sachser et al., 2017; Yamada et al., 2017). Assim, não é estranho que sua atividade seja necessária para reconsolidação da memória de extinção, como observamos ao inibir sua atividade com AP5. Este receptor ionotrópico é formado obrigatoriamente por quatro subunidades, sendo duas GluN1 (ou NR1) e duas GluN2 (ou NR2) ou GluN3. Existem quatro tipos de subunidades GluN2, GluN2A-D, porém, as mais comuns nas sinapses hipocâmpais são GluN2A e GluN2B (Lee et al., 2014; Traynelis et al., 2010). O tipo de subunidade GluN2 define características como condutância, permeabilidade ao cálcio, sensibilidade ao glutamato, tempo de desativação, probabilidade de abertura e as cascatas de sinalização celular que serão ativadas pelo receptor (Hansen et al., 2018; Wyllie, Livesey, & Hardingham, 2013). Considerando estas diferenças, nós investigamos uma possível dissociação na função de GluN2B/NMDARs e GluN2A/NMDARs hipocâmpais durante a reconsolidação da memória de extinção e observamos que o primeiro atua na desestabilização, enquanto o segundo atua na reestabilização do traço mnemônico. Nossos dados corroboram os achados de Milton e colaboradores (2013), que demonstraram a mesma dissociação na amígdala durante a reconsolidação na tarefa de condicionamento auditivo ao medo. Além disso, observamos que a reconsolidação da memória de extinção provocou um aumento na expressão da GluN2A 180 e 360 min após a RA. Este período coincide com o período de aumento na expressão de BDNF demonstrado anteriormente por Radiske e colaboradores (2015). Dessa forma, pode ser resultado da ação desta neurotrofina, já que ela é capaz de induzir aumento na expressão de subunidades de NMDARs (Caldeira et al., 2007).

Um mecanismo através do qual GluN2B/NMDARs pode provocar a desestabilização do traço mnemônico é a indução da autofagia. Artigos recentes tem demonstrado que a atividade de GluN2B/NMDARs inibe mTOR (Miller et al., 2014; C.-C. Wang et al., 2011), o qual é um inibidor da autofagia (Heras-Sandoval, Pérez-Rojas, Hernández-Damián, & Pedraza-Chaverri, 2014; Noda & Ohsumi, 1998; Schmelzle & Hall, 2000). Dessa forma, GluN2B/NMDARs, ao inibir mTOR, aumentaria a autofagia, um processo que Shehata e colaboradores (2018) mostraram ser importante para desestabilização do traço mnemônico.

Outro possível mecanismo é a indução de degradação proteica através do sistema ubiquitina-proteassoma. A CaMKII se liga a região intracelular de GluN2B ativado (Zhou et al., 2007). Esta quinase recruta o sistema ubiquitina-proteassoma (Bingol et al., 2010) e a atividade deste sistema é necessária para desestabilização do traço mnemônico reativado (S.-H. Lee et al., 2008). No que se refere aos GluN2A/NMDAR, eles foram associados a ativação de cascatas envolvidas em plasticidade, como a da ERK; e com o aumento da fosforilação de CREB e de expressão de BDNF (Sun, Xu, et al., 2018). Além disso, eles também ativam a via da PI3K (Hu et al., 2016; Moulton & Harvey, 2011; Sun, Cheng, Hu, & Gao, 2018), que, como discutido anteriormente, leva a ativação de mTOR. Juntamente com os nossos resultados, este fato poderia sugerir a existência de uma via GluN2A/NMDAR-mTOR-BDNF-AMPA que atuaria na reestabilização do traço durante a reconsolidação da memória de extinção (Fig. 11). No entanto, mais estudos são necessários para comprovação da existência desta via.



**Figura 11.** Mecanismos moleculares envolvidos na reconsolidação da memória de extinção. GluN2A/NMDAR ativariam a PI3K, que por sua vez, ativaria mTOR, levando a formação do mTORC1. Este complexo, aumentaria a síntese de BDNF, através da ativação da S6K e inativação das 4E-BPs. O BDNF atuaria aumentando o tráfego de AMPAR através da ação da CAMKII e/ou PKM $\zeta$ .

## 6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, concluímos que a atividade de mTOR é necessária para reconsolidação da memória de extinção e que esta quinase parece controlar a expressão de BDNF. O BDNF, por sua vez, atua através do controle do tráfego de AMPARs para promover a reestabilização do traço mnemônico após a reativação. Além disso, GluN2B/NMDARs atuam na desestabilização, enquanto GluN2A/NMDARs atuam na reestabilização do traço mnemônico durante a reconsolidação. Além disso, provemos mais uma comprovação de que a extinção de fato envolve a formação de um novo traço mnemônico, o qual pode ser reconsolidado. Com este trabalho, aprofundamos o conhecimento acerca dos mecanismos envolvidos na reconsolidação da memória de extinção. Isto pode contribuir para o desenvolvimento futuro de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de transtornos relacionados a persistência indevida de memória aversivas.



## 7. REFERÊNCIAS

- Adams, J. P., & Sweatt, J. D. (2002). Roles for the ERK MAP Kinase Cascade in Memory. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *42*, 135–163.
- Andersen, P., Sundberg, S. H., Sveen, O., & Wigström, H. (1977). Specific long-lasting potentiation of synaptic transmission in hippocampal slices. *Nature*, *266*, 736–7.
- Atkins, C. M., Selcher, J. C., Petraitis, J. J., Trzaskos, J. M., & Sweatt, J. D. (1998). The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nature Neuroscience*, *1*, 602–609.
- Baj, G., Pinhero, V., Vaghi, V., & Tongiorgi, E. (2016). Signaling pathways controlling activity-dependent local translation of BDNF and their localization in dendritic arbors. *Journal of Cell Science*, *129*, 2852–2864.
- Baltaci, S. B., Mogulkoc, R., & Baltaci, A. K. (2018). Molecular Mechanisms of Early and Late LTP. *Neurochemical Research*. doi:10.1007/s11064-018-2695-4
- Baratti, C. M., Boccia, M. M., Blake, M. G., & Acosta, G. B. (2008). Reactivated memory of an inhibitory avoidance response in mice is sensitive to a nitric oxide synthase inhibitor. *Neurobiology of Learning and Memory*, *89*, 426–440.
- Begni, V., Riva, M. A., & Cattaneo, A. (2017). Cellular and molecular mechanisms of the brain-derived neurotrophic factor in physiological and pathological conditions. *Clinical Science*, *131*, 123–138.
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2008). BDNF and Memory Formation and Storage. *The Neuroscientist*, *14*, 147–156.
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Katche, C., Slipczuk, L., Rossato, J. I., Goldin, A., ... Medina, J. H. (2008). BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*, 2711–2716.
- Bekinschtein, P., Katche, C., Slipczuk, L. N., Igaz, L. M., Cammarota, M.,

- Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2007). mTOR signaling in the hippocampus is necessary for memory formation. *Neurobiology of Learning and Memory*, *87*, 303–307.
- Bhattacharya, S., Kimble, W., Buabeid, M., Bhattacharya, D., Bloemer, J., Alhowail, A., ... Suppiramaniam, V. (2017). Altered AMPA receptor expression plays an important role in inducing bidirectional synaptic plasticity during contextual fear memory reconsolidation. *Neurobiology of Learning and Memory*, *139*, 98–108.
- Bingol, B., Wang, C.-F., Arnott, D., Cheng, D., Peng, J., & Sheng, M. (2010). Autophosphorylated CaMKII $\alpha$  Acts as a Scaffold to Recruit Proteasomes to Dendritic Spines. *Cell*, *140*, 567–578.
- Bliss, T. V., & Lomo, 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*, 331–56.
- Blundell, J., Kouser, M., & Powell, C. M. (2008). Systemic inhibition of mammalian target of rapamycin inhibits fear memory reconsolidation. *Neurobiology of Learning and Memory*, *90*, 28–35.
- Bourtchouladze, R., Abel, T., Berman, N., Gordon, R., Lapidus, K., & Kandel, E. R. (1998). Different training procedures recruit either one or two critical periods for contextual memory consolidation, each of which requires protein synthesis and PKA. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, *5*, 365–74.
- Briz, V., Hsu, Y.-T., Li, Y., Lee, E., Bi, X., & Baudry, M. (2013). Calpain-2-Mediated PTEN Degradation Contributes to BDNF-Induced Stimulation of Dendritic Protein Synthesis. *Journal of Neuroscience*, *33*, 4317–4328.
- Caldeira, M. V., Melo, C. V., Pereira, D. B., Carvalho, R. F., Carvalho, A. L., & Duarte, C. B. (2007). BDNF regulates the expression and traffic of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *35*, 208–219.
- Cammarota, M., Bernabeu, R., Levi De Stein, M., Izquierdo, I., & Medina, J. H.

- (1998). Learning-specific, time-dependent increases in hippocampal Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II activity and AMPA GluR1 subunit immunoreactivity. *The European Journal of Neuroscience*, *10*, 2669–76.
- Cammarota, M., Bevilaqua, L. R. M., Bonini, J. S., Rossatto, J. I., Medina, J. H., & Izquierdo, N. (2004). Hippocampal glutamate receptors in fear memory consolidation. *Neurotoxicity Research*, *6*, 205–12.
- Cammarota, M., Bevilaqua, L. R. M., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2004). Retrieval Does Not Induce Reconsolidation of Inhibitory Avoidance Memory. *Learning & Memory*, *11*, 572–578.
- Cammarota, M., Izquierdo, I., Wolfman, C., Levi de Stein, M., Bernabeu, R., Jerusalinsky, D., & Medina, J. H. (1995). Inhibitory avoidance training induces rapid and selective changes in 3[H]AMPA receptor binding in the rat hippocampal formation. *Neurobiology of Learning and Memory*, *64*, 257–64.
- Cestari, V., Costanzi, M., Castellano, C., & Rossiarnaud, C. (2006). A role for ERK2 in reconsolidation of fear memories in mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, *86*, 133–143.
- Clugnet, M. C., & LeDoux, J. E. (1990). Synaptic plasticity in fear conditioning circuits: induction of LTP in the lateral nucleus of the amygdala by stimulation of the medial geniculate body. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *10*, 2818–24.
- Cohen-Cory, S., & Fraser, S. E. (1995). Effects of brain-derived neurotrophic factor on optic axon branching and remodelling in vivo. *Nature*, *378*, 192–196.
- 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*, 33–46.
- Coultrap, S. J., & Bayer, K. U. (2012). CaMKII regulation in information processing and storage. *Trends in Neurosciences*, *35*, 607–618.
- Dash, P. K., Orsi, S. A., & Moore, A. N. (2006). Spatial Memory Formation and

- Memory-Enhancing Effect of Glucose Involves Activation of the Tuberous Sclerosis Complex-Mammalian Target of Rapamycin Pathway. *Journal of Neuroscience*, 26, 8048–8056.
- Duncan, C. P. (1949). The retroactive effect of electroshock on learning. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 42, 32–44.
- Dunlop, E. A., & Tee, A. R. (2009). Mammalian target of rapamycin complex 1: Signalling inputs, substrates and feedback mechanisms. *Cellular Signalling*, 21, 827–835.
- Dunsmoor, J. E., Niv, Y., Daw, N., & Phelps, E. A. (2015). Rethinking Extinction. *Neuron*, 88, 47–63.
- Duvarci, S., Nader, K., & LeDoux, J. E. (2005). Activation of extracellular signal-regulated kinase- mitogen-activated protein kinase cascade in the amygdala is required for memory reconsolidation of auditory fear conditioning. *European Journal of Neuroscience*, 21, 283–289.
- Eisenberg, M., & Dudai, Y. (2004). Reconsolidation of fresh, remote, and extinguished fear memory in medaka: old fears don't die. *European Journal of Neuroscience*, 20, 3397–3403.
- Eisenberg, M., Kobil, T., Berman, D. E., & Dudai, Y. (2003). Stability of Retrieved Memory: Inverse Correlation with Trace Dominance. *Science*, 301, 1102–1104.
- Elgersma, Y. (2004). Mouse Genetic Approaches to Investigating Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Function in Plasticity and Cognition. *Journal of Neuroscience*, 24, 8410–8415.
- Figurov, A., Pozzo-Miller, L. D., Olafsson, P., Wang, T., & Lu, B. (1996). Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus. *Nature*, 381, 706–709.
- Fischer, A., Radulovic, M., Schrick, C., Sananbenesi, F., Godovac-Zimmermann, J., & Radulovic, J. (2007). Hippocampal Mek/Erk signaling mediates extinction of contextual freezing behavior. *Neurobiology of Learning and Memory*, 87, 149–158.

- Flavell, C. R., & Lee, J. L. C. (2013). Reconsolidation and extinction of an appetitive pavlovian memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, *104*, 25–31.
- Flexner, L. B., Flexner, J. B., & Stellar, E. (1965). Memory and cerebral protein synthesis in mice as affected by graded amounts of puromycin. *Experimental Neurology*, *13*, 264–72.
- Frankland, P. W. (2006). Stability of recent and remote contextual fear memory. *Learning & Memory*, *13*, 451–457.
- Frey, U., Krug, M., Reymann, K. G., & Matthies, H. (1988). Anisomycin, an inhibitor of protein synthesis, blocks late phases of LTP phenomena in the hippocampal CA1 region in vitro. *Brain Research*, *452*, 57–65.
- Gallo, G., & Letourneau, P. C. (1998). Localized sources of neurotrophins initiate axon collateral sprouting. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *18*, 5403–14.
- Genheden, M., Kenney, J. W., Johnston, H. E., Manousopoulou, A., Garbis, S. D., & Proud, C. G. (2015). BDNF Stimulation of Protein Synthesis in Cortical Neurons Requires the MAP Kinase-Interacting Kinase MNK1. *Journal of Neuroscience*, *35*, 972–984.
- Giachero, M., Bustos, S. G., Calfa, G., & Molina, V. A. (2013). A BDNF sensitive mechanism is involved in the fear memory resulting from the interaction between stress and the retrieval of an established trace. *Learning & Memory*, *20*, 245–255.
- Giese, K. P., & Mizuno, K. (2013). The roles of protein kinases in learning and memory. *Learning & Memory*, *20*, 540–552.
- Giovannini, M. G., Lana, D., & Pepeu, G. (2015). The integrated role of ACh, ERK and mTOR in the mechanisms of hippocampal inhibitory avoidance memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, *119*, 18–33.
- Gong, R., Park, C. S., Abbassi, N. R., & Tang, S.-J. (2006). Roles of Glutamate Receptors and the Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Signaling Pathway in Activity-dependent Dendritic Protein Synthesis in Hippocampal

- Neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 18802–18815.
- Gordon, W. C. (1977a). Similarities of Recently Acquired and Reactivated Memories in Interference. *The American Journal of Psychology*, 90, 231.
- Gordon, W. C. (1977b). Susceptibility of a reactivated memory to the effects of strychnine: A time-dependent phenomenon. *Physiology & Behavior*, 18, 95–99.
- Gottschalk, W. A., Jiang, H., Tartaglia, N., Feng, L., Figuero, A., & Lu, B. (1999). Signaling mechanisms mediating BDNF modulation of synaptic plasticity in the hippocampus. *Learning & Memory*, 6, 243–256.
- Hafenbreidel, M., Rafa Todd, C., & Mueller, D. (2017). Infralimbic GluN2A-Containing NMDA Receptors Modulate Reconsolidation of Cocaine Self-Administration Memory. *Neuropsychopharmacology*, 42, 1113–1125.
- Hansen, K. B., Yi, F., Perszyk, R. E., Furukawa, H., Wollmuth, L. P., Gibb, A. J., & Traynelis, S. F. (2018). Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors. *The Journal of General Physiology*, 150, 1081–1105.
- Harris, E. W., & Cotman, C. W. (1986). Long-term potentiation of guinea pig mossy fiber responses is not blocked by N-methyl D-aspartate antagonists. *Neuroscience Letters*, 70, 132–7.
- Hebb, D. O. (1949). *The Organization of Behavior*. Nova-York: Wiley.
- Hempstead, B. L. (2015). Brain-Derived Neurotrophic Factor: Three Ligands, Many Actions. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, 126, 9–19.
- Heras-Sandoval, D., Pérez-Rojas, J. M., Hernández-Damián, J., & Pedraza-Chaverri, J. (2014). The role of PI3K/AKT/mTOR pathway in the modulation of autophagy and the clearance of protein aggregates in neurodegeneration. *Cellular Signalling*, 26, 2694–2701.
- Hernandez, P. J., Sadeghian, K., & Kelley, A. E. (2002). Early consolidation of instrumental learning requires protein synthesis in the nucleus accumbens. *Nature Neuroscience*, 5, 1327–1331.

- Hoeffler, C. A., & Klann, E. (2010). mTOR signaling: At the crossroads of plasticity, memory and disease. *Trends in Neurosciences*, 33, 67–75.
- Hu, R., Chen, J., Lujan, B., Lei, R., Zhang, M., Wang, Z., ... Wan, Q. (2016). Glycine triggers a non-ionotropic activity of GluN2A-containing NMDA receptors to confer neuroprotection. *Scientific Reports*, 6, 34459.
- Huang, K., & Fingar, D. C. (2014). Growing knowledge of the mTOR signaling network. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 36, 79–90.
- Huang, W., Zhu, P. J., Zhang, S., Zhou, H., Stoica, L., Galiano, M., ... Costa-Mattoli, M. (2013). mTORC2 controls actin polymerization required for consolidation of long-term memory. *Nature Neuroscience*, 16, 441–448.
- Irvine, E. E., von Herten, L. S. J., Plattner, F., & Giese, K. P. (2006).  $\alpha$ CaMKII autophosphorylation: a fast track to memory. *Trends in Neurosciences*, 29, 459–465.
- Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Rügge, M. A., Hall, A., & Hall, M. N. (2004). Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nature Cell Biology*, 6, 1122–1128.
- Jobim, P. F. C., Pedroso, T. R., Werenicz, A., Christoff, R. R., Maurmann, N., Reolon, G. K., ... Roesler, R. (2012). Impairment of object recognition memory by rapamycin inhibition of mTOR in the amygdala or hippocampus around the time of learning or reactivation. *Behavioural Brain Research*, 228, 151–158.
- Jourdi, H., & Kabbaj, M. (2013). Acute BDNF Treatment Upregulates GluR1-SAP97 and GluR2-GRIP1 Interactions: Implications for Sustained AMPA Receptor Expression. *PLoS ONE*, 8, e57124.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S. A., & Hudspeth, A. (2014). *Princípios de Neurociências (5ª)*. Porto Alegre: Artmed.
- Kang, H., & Schuman, E. M. (1996). A requirement for local protein synthesis in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity. *Science (New York, N.Y.)*, 273, 1402–6.

- Kim, R., Moki, R., & Kida, S. (2011). Molecular mechanisms for the destabilization and restabilization of reactivated spatial memory in the Morris water maze. *Molecular Brain*, 4, 9.
- Krawczyk, M. C., Blake, M. G., Baratti, C. M., Romano, A., Boccia, M. M., & Feld, M. (2015). Memory reconsolidation of an inhibitory avoidance task in mice involves cytosolic ERK2 bidirectional modulation. *Neuroscience*, 294, 227–237.
- Leal, G., Comprido, D., & Duarte, C. B. (2014). BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. *Neuropharmacology*, 76, 639–656.
- Lee, C.-H., Lü, W., Michel, J. C., Goehring, A., Du, J., Song, X., & Gouaux, E. (2014). NMDA receptor structures reveal subunit arrangement and pore architecture. *Nature*, 511, 191–197.
- Lee, J. L. C. (2004). Independent Cellular Processes for Hippocampal Memory Consolidation and Reconsolidation. *Science*, 304, 839–843.
- Lee, J. L. C. (2008). Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nature Neuroscience*, 11, 1264–1266.
- Lee, J. L. C. (2010). Memory Reconsolidation Mediates the Updating of Hippocampal Memory Content. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 4. doi:10.3389/fnbeh.2010.00168
- Lee, J. L. C., & Hynds, R. E. (2013). Divergent cellular pathways of hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Hippocampus*, 23, 233–244.
- Lee, S.-H., Choi, J.-H., Lee, N., Lee, H.-R., Kim, J.-I., Yu, N.-K., ... Kaang, B.-K. (2008). Synaptic Protein Degradation Underlies Destabilization of Retrieved Fear Memory. *Science*, 319, 1253–1256.
- Lee, S.-H., Kwak, C., Shim, J., Kim, J.-E., Choi, S.-L., Kim, H. F., ... Kaang, B.-K. (2012). A cellular model of memory reconsolidation involves reactivation-induced destabilization and restabilization at the sensorimotor synapse in Aplysia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 14200–14205.



- Lessmann, V., Gottmann, K., & Heumann, R. (1994). BDNF and NT-4/5 enhance glutamatergic synaptic transmission in cultured hippocampal neurones. *Neuroreport*, *6*, 21–5.
- Lewis, D. J. (1979). Psychobiology of active and inactive memory. *Psychological Bulletin*, *86*, 1054–83.
- Lima, R. H., Rossato, J. I., Furini, C. R., Bevilaqua, L. R., Izquierdo, I., & Cammarota, M. (2009). Infusion of protein synthesis inhibitors in the entorhinal cortex blocks consolidation but not reconsolidation of object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, *91*, 466–472.
- Lisman, J., Schulman, H., & Cline, H. (2002). The Molecular Basis of CaMKII Function in Synaptic and Behavioural Memory. *Nature Reviews Neuroscience*, *3*, 175–190.
- Lisman, J., Yasuda, R., & Raghavachari, S. (2012). Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nature Reviews Neuroscience*, *13*, 169–182.
- Liu, Q., Xu, C., Kirubakaran, S., Zhang, X., Hur, W., Liu, Y., ... Gray, N. S. (2013). Characterization of Torin2, an ATP-Competitive Inhibitor of mTOR, ATM, and ATR. *Cancer Research*, *73*, 2574–2586.
- Lopez, J., Gamache, K., Schneider, R., & Nader, K. (2015). Memory Retrieval Requires Ongoing Protein Synthesis and NMDA Receptor Activity-Mediated AMPA Receptor Trafficking. *Journal of Neuroscience*, *35*, 2465–2475.
- Lu, L. (2004). A Single Infusion of Brain-Derived Neurotrophic Factor into the Ventral Tegmental Area Induces Long-Lasting Potentiation of Cocaine Seeking after Withdrawal. *Journal of Neuroscience*, *24*, 1604–1611.
- Lucchesi, W., Mizuno, K., & Giese, K. P. (2011). Novel insights into CaMKII function and regulation during memory formation. *Brain Research Bulletin*, *85*, 2–8.
- McAllister, A. K., Katz, L. C., & Lo, D. C. (1999). Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annual Review of Neuroscience*, *22*, 295–318.

- McGaugh, J. L. (1966). Time-Dependent Processes in Memory Storage. *Science*, *153*, 1351–1358.
- McGaugh, J. L. (2000). Memory--a century of consolidation. *Science (New York, N.Y.)*, *287*, 248–51.
- McGaugh, J. L., & Krivanek, J. A. (1970). Strychnine effects on discrimination learning in mice: effects of dose and time of administration. *Physiology & Behavior*, *5*, 1437–42.
- Mei, F., Nagappan, G., Ke, Y., Sacktor, T. C., & Lu, B. (2011). BDNF Facilitates L-LTP Maintenance in the Absence of Protein Synthesis through PKM $\zeta$ . *PLoS ONE*, *6*, e21568.
- Mendoza, M. C., Er, E. E., & Blenis, J. (2011). The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends in Biochemical Sciences*, *36*, 320–328.
- Migues, P. V., Hardt, O., Wu, D. C., Gamache, K., Sacktor, T. C., Wang, Y. T., & Nader, K. (2010). PKM $\zeta$  maintains memories by regulating GluR2-dependent AMPA receptor trafficking. *Nature Neuroscience*, *13*, 630–634.
- Milekic, M. H., & Alberini, C. M. (2002). Temporally graded requirement for protein synthesis following memory reactivation. *Neuron*, *36*, 521–5.
- Miller, O. H., Yang, L., Wang, C.-C., Hargroder, E. A., Zhang, Y., Delpire, E., & Hall, B. J. (2014). GluN2B-containing NMDA receptors regulate depression-like behavior and are critical for the rapid antidepressant actions of ketamine. *ELife*, *3*. doi:10.7554/eLife.03581
- Milton, A. L., Merlo, E., Ratano, P., Gregory, B. L., Dumbreck, J. K., & Everitt, B. J. (2013). Double Dissociation of the Requirement for GluN2B- and GluN2A-Containing NMDA Receptors in the Destabilization and Restabilization of a Reconsolidating Memory. *Journal of Neuroscience*, *33*, 1109–1115.
- Misanin, J. R., Miller, R. R., & Lewis, D. J. (1968). Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science (New York, N.Y.)*, *160*, 554–5.

- Morris, R. G. M. (2013). NMDA receptors and memory encoding. *Neuropharmacology*, *74*, 32–40.
- Morris, R. G. M., Inglis, J., Ainge, J. A., Olverman, H. J., Tulloch, J., Dudai, Y., & Kelly, P. A. T. (2006). Memory Reconsolidation: Sensitivity of Spatial Memory to Inhibition of Protein Synthesis in Dorsal Hippocampus during Encoding and Retrieval. *Neuron*, *50*, 479–489.
- Moult, P. R., & Harvey, J. (2011). NMDA receptor subunit composition determines the polarity of leptin-induced synaptic plasticity. *Neuropharmacology*, *61*, 924–936.
- Moy, J. K., Khoutorsky, A., Asiedu, M. N., Dussor, G., & Price, T. J. (2018). eIF4E Phosphorylation Influences Bdnf mRNA Translation in Mouse Dorsal Root Ganglion Neurons. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *12*. doi:10.3389/fncel.2018.00029
- Müller, G. E., & Pilzecker, A. (1900). *Experimentelle Beiträge zur Lehre vom Gedächtnis. Zeitschrift für Psychologie*.
- Myskiw, J. C., Rossato, J. I., Bevilaqua, L. R. M., Medina, J. H., Izquierdo, I., & Cammarota, M. (2008). On the participation of mTOR in recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, *89*, 338–351.
- Nader, K. (2003). Memory traces unbound. *Trends in Neurosciences*, *26*, 65–72.
- Nader, K. (2013). The Discovery of Memory Reconsolidation. In C. M. Alberini (Ed.), *Memory Reconsolidation* (pp. 1–13). Elsevier.
- Nader, K. (2015). Reconsolidation and the Dynamic Nature of Memory. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *7*, a021782.
- Nader, K., Schafe, G. E., & Le Doux, J. E. (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, *406*, 722–726.
- Navarro, A., Gómez, C., Sánchez-Pino, M.-J., González, H., Báñez, M. J., Boveris, A. D., & Boveris, A. (2005). Vitamin E at high doses improves survival, neurological performance, and brain mitochondrial function in aging

- male mice. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 289, R1392-9.
- Noda, T., & Ohsumi, Y. (1998). Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 3963–6.
- Opazo, P., Sainlos, M., & Choquet, D. (2012). Regulation of AMPA receptor surface diffusion by PSD-95 slots. *Current Opinion in Neurobiology*, 22, 453–460.
- Orsini, C. A., & Maren, S. (2012). Neural and cellular mechanisms of fear and extinction memory formation. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 36, 1773–1802.
- Panja, D., & Bramham, C. R. (2014). BDNF mechanisms in late LTP formation: A synthesis and breakdown. *Neuropharmacology*, 76, 664–676.
- Parsons, R. G., & Ressler, K. J. (2013). Implications of memory modulation for post-traumatic stress and fear disorders. *Nature Neuroscience*, 16, 146–153.
- Pedreira, M. E. (2004). Mismatch Between What Is Expected and What Actually Occurs Triggers Memory Reconsolidation or Extinction. *Learning & Memory*, 11, 579–585.
- Poo, M. (2001). Neurotrophins as synaptic modulators. *Nature Reviews Neuroscience*, 2, 24–32.
- Power, A. E., Berlau, D. J., McGaugh, J. L., & Steward, O. (2006). Anisomycin infused into the hippocampus fails to block “reconsolidation” but impairs extinction: The role of re-exposure duration. *Learning & Memory*, 13, 27–34.
- Radiske, A., Gonzalez, M. C., Conde-Ocazonez, S. A., Feitosa, A., Köhler, C. A., Bevilaqua, L. R., & Cammarota, M. (2017). Prior Learning of Relevant Nonaversive Information Is a Boundary Condition for Avoidance Memory Reconsolidation in the Rat Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 37, 9675–9685.
- Radiske, A., Rossato, J. I., Gonzalez, M. C., Köhler, C. A., Bevilaqua, L. R., &

- Cammarota, M. (2017). BDNF controls object recognition memory reconsolidation. *Neurobiology of Learning and Memory*, *142*, 79–84.
- Radiske, A., Rossato, J. I., Kohler, C. A., Gonzalez, M. C., Medina, J. H., & Cammarota, M. (2015). Requirement for BDNF in the Reconsolidation of Fear Extinction. *Journal of Neuroscience*, *35*, 6570–6574.
- Ralph, G. S., Bienemann, A., Ma, J., Tan, H. K., Noel, J., Henley, J. M., & Uney, J. B. (2001). Disruption of the GluR2-NSF Interaction Protects Primary Hippocampal Neurons from Ischemic Stress. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *17*, 662–670.
- Rao-Ruiz, P., Rotaru, D. C., van der Loo, R. J., Mansvelder, H. D., Stiedl, O., Smit, A. B., & Spijker, S. (2011). Retrieval-specific endocytosis of GluA2-AMPA receptors underlies adaptive reconsolidation of contextual fear. *Nature Neuroscience*, *14*, 1302–1308.
- Rescorla, R. A. (2001). Retraining of extinguished Pavlovian stimuli. *Journal of Experimental Psychology. Animal Behavior Processes*, *27*, 115–24.
- Rossato, J. I., Bevilaqua, L. R., Izquierdo, I., Medina, J. H., & Cammarota, M. (2010). Retrieval induces reconsolidation of fear extinction memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*, 21801–21805.
- Rossato, J. I., Bevilaqua, L. R. M., Myskiw, J. C., Medina, J. H., Izquierdo, I., & Cammarota, M. (2007). On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Learning & Memory*, *14*, 36–46.
- Rossato, J. I., Carolina Gonzalez, M., Radiske, A., Apolinário, G., Conde-Ocazonez, S., Bevilaqua, L. R., & Cammarota, M. (2019). PKM $\zeta$  inhibition disrupts reconsolidation and erases object recognition memory. *The Journal of Neuroscience*, 2270–18.
- Ru, W., Peng, Y., Zhong, L., & Tang, S.-J. (2012). A Role of the Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) in Glutamate-Induced Down-regulation of Tuberous Sclerosis Complex Proteins 2 (TSC2). *Journal of Molecular Neuroscience*, *47*, 340–345.

- Sachser, R. M., Haubrich, J., Lunardi, P. S., & de Oliveira Alvares, L. (2017). Forgetting of what was once learned: Exploring the role of postsynaptic ionotropic glutamate receptors on memory formation, maintenance, and decay. *Neuropharmacology*, *112*, 94–103.
- Samartgis, J. R., Schachte, L., Hazi, A., & Crowe, S. F. (2012). Brain-derived neurotrophic factor facilitates memory consolidation and reconsolidation of a weak training stimulus in the day-old chick. *Neuroscience Letters*, *516*, 119–123.
- Schafe, G. E., Atkins, C. M., Swank, M. W., Bauer, E. P., Sweatt, J. D., & LeDoux, J. E. (2000). Activation of ERK/MAP kinase in the amygdala is required for memory consolidation of pavlovian fear conditioning. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *20*, 8177–87.
- Schafe, G. E., & LeDoux, J. E. (2000). Memory consolidation of auditory pavlovian fear conditioning requires protein synthesis and protein kinase A in the amygdala. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *20*, RC96.
- Schieke, S. M., Phillips, D., McCoy, J. P., Aponte, A. M., Shen, R.-F., Balaban, R. S., & Finkel, T. (2006). The Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Pathway Regulates Mitochondrial Oxygen Consumption and Oxidative Capacity. *Journal of Biological Chemistry*, *281*, 27643–27652.
- Schmelzle, T., & Hall, M. N. (2000). TOR, a Central Controller of Cell Growth. *Cell*, *103*, 253–262.
- Schneider, A. M., & Sherman, W. (1968). Amnesia: a function of the temporal relation of footshock to electroconvulsive shock. *Science (New York, N.Y.)*, *159*, 219–21.
- Schwartzkroin, P. A., & Wester, K. (1975). Long-lasting facilitation of a synaptic potential following tetanization in the in vitro hippocampal slice. *Brain Research*, *89*, 107–19.
- Shehata, M., Abdou, K., Choko, K., Matsuo, M., Nishizono, H., & Inokuchi, K.

- (2018). Autophagy Enhances Memory Erasure through Synaptic Destabilization. *The Journal of Neuroscience*, 38, 3809–3822.
- Slipczuk, L., Bekinschtein, P., Katche, C., Cammarota, M., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2009). BDNF Activates mTOR to Regulate GluR1 Expression Required for Memory Formation. *PLoS ONE*, 4, e6007.
- Smith, N. B., Doran, J. M., Sippel, L. M., & Harpaz-Rotem, I. (2017). Fear extinction and memory reconsolidation as critical components in behavioral treatment for posttraumatic stress disorder and potential augmentation of these processes. *Neuroscience Letters*, 649, 170–175.
- Squire, L. R., & Kandel, E. R. (2000). *Memória: da mente às moléculas*. Porto Alegre: Artmed.
- Stanton, P. K., & Sarvey, J. M. (1984). Blockade of long-term potentiation in rat hippocampal CA1 region by inhibitors of protein synthesis. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 4, 3080–8.
- Sun, Y., Cheng, X., Hu, J., & Gao, Z. (2018). The Role of GluN2A in Cerebral Ischemia: Promoting Neuron Death and Survival in the Early Stage and Thereafter. *Molecular Neurobiology*, 55, 1208–1216.
- Sun, Y., Xu, Y., Cheng, X., Chen, X., Xie, Y., Zhang, L., ... Gao, Z. (2018). The differences between GluN2A and GluN2B signaling in the brain. *Journal of Neuroscience Research*, 96, 1430–1443.
- Suzuki, A. (2004). Memory Reconsolidation and Extinction Have Distinct Temporal and Biochemical Signatures. *Journal of Neuroscience*, 24, 4787–4795.
- Switon, K., Kotulska, K., Janusz-Kaminska, A., Zmorzynska, J., & Jaworski, J. (2017). Molecular neurobiology of mTOR. *Neuroscience*, 341, 112–153.
- Takei, N., Sasaoka, K., Inoue, K., Takahashi, M., Endo, Y., & Hatanaka, H. (1997). Brain-derived neurotrophic factor increases the stimulation-evoked release of glutamate and the levels of exocytosis-associated proteins in cultured cortical neurons from embryonic rats. *Journal of Neurochemistry*,

68, 370–5.

- Tang, S. J., Reis, G., Kang, H., Gingras, A.-C., Sonenberg, N., & Schuman, E. M. (2002). A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*, 467–472.
- Taubenfeld, S. M., Milekic, M. H., Monti, B., & Alberini, C. M. (2001). The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBP $\beta$ . *Nature Neuroscience*, *4*, 813–818.
- Thoeringer, C. K., Henes, K., Eder, M., Dahlhoff, M., Wurst, W., Holsboer, F., ... Wotjak, C. T. (2012). Consolidation of Remote Fear Memories Involves Corticotropin-Releasing Hormone (CRH) Receptor Type 1-Mediated Enhancement of AMPA Receptor GluR1 Signaling in the Dentate Gyrus. *Neuropsychopharmacology*, *37*, 787–796.
- Traynelis, S. F., Wollmuth, L. P., McBain, C. J., Menniti, F. S., Vance, K. M., Ogden, K. K., ... Dingledine, R. (2010). Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation, and Function. *Pharmacological Reviews*, *62*, 405–496.
- Tronson, N. C., & Taylor, J. R. (2007). Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nature Reviews Neuroscience*, *8*, 262–275.
- Tyler, W. J., & Pozzo-Miller, L. D. (2001). BDNF enhances quantal neurotransmitter release and increases the number of docked vesicles at the active zones of hippocampal excitatory synapses. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *21*, 4249–58.
- Vogel, K. R., Ainslie, G. R., & Gibson, K. M. (2016). mTOR inhibitors rescue premature lethality and attenuate dysregulation of GABAergic/glutamatergic transcription in murine succinate semialdehyde dehydrogenase deficiency (SSADHD), a disorder of GABA metabolism. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *39*, 877–886.
- Wang, C.-C., Held, R. G., Chang, S.-C., Yang, L., Delpire, E., Ghosh, A., & Hall,



- B. J. (2011). A Critical Role for GluN2B-Containing NMDA Receptors in Cortical Development and Function. *Neuron*, 72, 789–805.
- Wang, S.-H., de Oliveira Alvares, L., & Nader, K. (2009). Cellular and systems mechanisms of memory strength as a constraint on auditory fear reconsolidation. *Nature Neuroscience*, 12, 905–912.
- Wang, Y., Zhang, T.-Y., Xin, J., Li, T., Yu, H., Li, N., & Chen, Z.-Y. (2012). Differential Involvement of Brain-Derived Neurotrophic Factor in Reconsolidation and Consolidation of Conditioned Taste Aversion Memory. *PLoS ONE*, 7, e49942.
- Wyllie, D. J. A., Livesey, M. R., & Hardingham, G. E. (2013). Influence of GluN2 subunit identity on NMDA receptor function. *Neuropharmacology*, 74, 4–17.
- Yamada, K., Arai, M., Suenaga, T., & Ichitani, Y. (2017). Involvement of hippocampal NMDA receptors in encoding and consolidation, but not retrieval, processes of spontaneous object location memory in rats. *Behavioural Brain Research*, 331, 14–19.
- Yoshii, A., & Constantine-Paton, M. (2007). BDNF induces transport of PSD-95 to dendrites through PI3K-AKT signaling after NMDA receptor activation. *Nature Neuroscience*, 10, 702–711.
- Zask, A., Verheijen, J. C., & Richard, D. J. (2011). Recent advances in the discovery of small-molecule ATP competitive mTOR inhibitors: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 21, 1109–1127.
- Zhang, X.-M., & Luo, J.-H. (2013). GluN2A versus GluN2B: twins, but quite different. *Neuroscience Bulletin*, 29, 761–772.
- Zhou, Y., Takahashi, E., Li, W., Halt, A., Wiltgen, B., Ehninger, D., ... Silva, A. J. (2007). Interactions between the NR2B Receptor and CaMKII Modulate Synaptic Plasticity and Spatial Learning. *Journal of Neuroscience*, 27, 13843–13853.

## 8. ANEXOS



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA  
Av. Salgado Filho, S/N – CEP: 59072-970 – Natal / RN  
Fone: (84) 9229-6491 / e-mail: ceua@reitoria.ufrn.br



### CERTIFICADO

Natal (RN), 12 de julho de 2017.

Certificamos que a proposta intitulada "Investigação dos mecanismos moleculares envolvidos na recsolidação da memória de extinção na esquia inibitória", PARECER nº 023.034/2017, sob a responsabilidade de **Martín Pablo Cammarota**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n.º 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n.º 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado, após adequações, pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – CEUA/UFRN.

Vigência do Projeto	FEVEREIRO 2021
Espécie/Linhagem	<i>Rattus norvegicus</i> Wistar
Número de Animais	885
Idade/Peso	3 meses / 300-380 g
Sexo	Machos
Origem	Biotério do Instituto do Cérebro – UFRN
Manutenção	Biotério do Instituto do Cérebro – UFRN

Informamos ainda que, segundo o Cap. 2, Art. 13, do Regimento Interno desta CEUA, é função do professor/pesquisador responsável pelo projeto a elaboração de relatório de acompanhamento que deverá ser entregue tão logo a pesquisa for concluída.

  
José de Castro Souza Neto Júnior  
Coordenador da CEUA-UFRN

[www.ceua.propesq.ufrn.br](http://www.ceua.propesq.ufrn.br)