

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**INIBIÇÃO DA SÍNTESE DE mRNA NO HIPOCAMPO PREJUDICA
A CONSOLIDAÇÃO E A RECONSOLIDAÇÃO DE
MEMÓRIA ESPACIAL**

Weber Cláudio Francisco Nunes da Silva

Orientador: Prof. Dr. Ivan Antonio Izquierdo

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina – Ciências Médicas, como
requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências Médicas

Dedico esta tese a minha avó e grande Mãe (*in memoriam*),

Naisa Augusta Nunes da Silva (★ 1926 – † 2005)

Por todo o grande amor e sabedoria com que me criou.

Graças a ela, não só cheguei até aqui, como posso ir ainda mais alto.

Mamãe, te amo eternamente !

Agradecimentos

Em primeiro lugar à minha família: Mamãe (Naisa Augusta Nunes da Silva), Júlia Maria Nunes da Silva (minha tia que eu amo muito, sempre me deu forças para nunca desistir, e me ensinou a superar qualquer obstáculo, por maior que fosse), Tecla Cirino Nunes da Silva (minha tia que amo como uma mãe, e que sempre me amou como um filho), Francisco Cirino Nunes da Silva (meu tio que amo muito), Eva Cirino Nunes da Silva Saumell e José Aníbal Saumell (tia que também amo muito, e meu já falecido e saudoso tio, com quem aprendi bastante e sinto muitas saudades), Jesuína Cirino Nunes da Silva (minha mãe, que também me ajudou muito, e também amo), meu avô Joaquim Cirino da Silva (*in memoriam*, pouco conheci, mas sei que merece minha admiração) e Helder Newton Nunes da Silva (meu irmão, a quem amo e desejo muita felicidade e sucesso na vida). A todos eles dedico esta tese.

A Juliana Sartori Bonini, que sempre esteve do meu lado me apoiando e me dando forças nos momentos mais agrestes. Ju, te amo muito, e também te dedico esta tese.

Ao meu grande amigo e, juntamente com o Professor Izquierdo, também orientador: Martín Cammarota. Graças ao papel fundamental desempenhado por Martín em minha orientação, decidi continuar no Centro de Memória e fazer meu doutorado, de modo que se não fosse por ele esta tese não existiria. Martín, você é um neurocientista

brilhante, e tenho muito orgulho em, mesmo que não oficialmente, ter sido orientado por você.

Dentre grandes amizades construídas no Rio Grande do Sul, dois merecem um agradecimento especial de minha parte: Cristiano André Kohler e André Ferrer Carvalho. Foram as primeiras pessoas em Porto Alegre que, assim que eu pude conviver, me enxergaram como alguém e me trataram com dignidade, antes de então virarmos grandes amigos. Nunca esquecerei isso. Ainda, quero frisar que, durante todo esse tempo em que estou em Porto Alegre, o Cris têm sido um amigo irmão mesmo, com o qual sempre pude contar. Cris, sinto orgulho de te ter como amigo.

A família da Ju, seus pais, Valter Bonini e Olga Sartori Bonini; sua babá, Maria Lanza; suas irmãs, Janaína Bonini (Jana), Gabriela Bonini (Gabi); seu irmão, esposa (cunhada) e filhos (sobrinhos) Gustavo Bonini (Guto), Deise Bonini, Vinícius Bonini (Vini) e Rafaela Bonini (Rafinha); e suas tias, Onira Sartori e Olívia Sartori, por terem sempre me acolhido e tratado como sendo da família desde sempre, com muito carinho. Gosto muito todos de vocês, e obrigado por tudo.

Aos meus grandes amigos de São Paulo, que me brindaram com sua inestimável e valorosa amizade, confiança e dedicação. Dentre estes amigos, não posso deixar de citar aqui, pois me ajudaram decisivamente em momentos cruciais de minha vida, Leo Kei Iwai e Laércio Marques, bem como aqueles cuja amizade já demonstrou ser resistente ao tempo e a distância: Carlos Henrique, Danilo Policastro, Diego Zubrycky, Elvis

Medeiros, Erik Montagna, Hiroshi Odo, Isaías Glezer e Marco Aurélio (o MAGA). Estes amigos são como irmãos pra mim.

Aos alunos de iniciação científica que muito contribuíram para a realização deste trabalho, em especial a Carol Garrido Zinn (a Pequeninha) e a Thais Rodrigues, que gastaram muitas horas a fio de vários fins de semana dentro da sala do *water maze*. Aqui segue mais uma vez meu muito obrigado a vocês.

Novamente ao Cris, pela construção do programa de análise de imagens que permitiu a obtenção em tempo real de vários parâmetros de desempenho dos animais durante as sessões de treino e de teste, parâmetros esses, como a trajetória percorrida pelos ratos, impossíveis de serem obtidos manualmente. A construção de um programa desses é uma tarefa muito árdua, e aqui há que reconhecer a genialidade de alguém como o Cris em conseguir realizar esta proeza considerando-se que ele aprendeu o conhecimento necessário pra isso sozinho.

A Janine Inez Rossato (Nine), por sua genuína amizade e grande empenho ter mantido e continuar mantendo o Centro de Memória funcionando. Nossa amizade se construiu meio devagar, entre troncos e barrancos, mas noutras épocas o ambiente era hostil para todos, e felizmente acabou ocorrendo o inevitável: reconhecemos um no outro uma grande amizade, e me sinto muito feliz por isso. Nine, desejo do fundo do coração muito sucesso e felicidades pra ti, e muito obrigado por tudo.

Aos meus grandes amigos Fernando Benetti e Marcelo Azevedo (carinhosamente conhecido como Titico), que conheci mais tardiamente em Porto Alegre, mas logo se mostraram ser também ótimos amigos, com os quais gosto muito de estar presente.

Aos meus grande amigos do laboratório, Cristiane Furini (a Cris), Andressa Radiske, Natália Gindri (Natinha), Pâmela Mello Carpes (Pam), Gabriela Cardoso (estas gurias, junto comigo, compõem o “lado sombrio da força”), Siomara Monteiro (Sio), Daniela Izquierdo (Duda), Lia Bevilaqua, Samuel Greggios, Clarice Borges, Lucas Lunardi, Julia Clarke, Ramón Hypolito, Larissa Rios, Isadora, Marta Hemb, Jociane Myskyw (Joci), e outros, pela amizade, convivência divertida e apoio constante.

A Maria Ângela dos Santos (Ângela), que definitivamente me agilizou muito a vida durante a execução deste trabalho, em um momento de grande dificuldade de recursos. Ângela, muitíssimo obrigado por sua indispensável e inesquecível ajuda.

A Ana Lígia Lia de Paula Ramos, que me acolheu como amigo desde a primeira vez em que me viu, quando iniciei como professor substituto no Departamento de Biofísica, tendo então se tornado uma ótima e companheira amizade, e com quem muito aprendi sobre a arte de ensinar.

A todos os amigos do Departamento de Biofísica (ICBS – UFRGS), que sempre foram super atenciosos e prestativos comigo. Um grande abraço a todos.

Ao Prof. Ivan Antonio Izquierdo, por ser meu orientador junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

A todos os demais que, de alguma forma, tenham contribuído para minha formação profissional e como pessoa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, seus professores e funcionários, em especial a Vera Ribeiro, que sempre se mostrou prestativa e atenciosa comigo, disposta a solucionar todo tipo de problema.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo financiamento de minha bolsa, que além de ter fomentado a execução desta tese, tornou possível a minha vida e moradia em Porto Alegre.

Muito Obrigado a todos

Weber Cláudio Francisco Nunes da Silva

“O verdadeiro discípulo é aquele que supera o mestre.”

Aristóteles

ÍNDICE

Siglas e Abreviaturas	pg. 2
Resumo	pg. 3
Capítulo 1: Introdução	pg. 4
Capítulo 2: Revisão da Literatura	pg. 10
2.1. Consolidação de memórias	pg. 10
2.2. Reconsolidação de memórias	pg. 12
2.3. Memória espacial	pg. 16
2.4. Relação entre memória espacial e síntese de mRNA hipocampal	pg. 19
Capítulo 3: Objetivos	pg. 21
3.1. Objetivo geral	pg. 21
3.2. Objetivos específicos	pg. 21
Referências da Revisão da Literatura	pg. 23
Artigo Científico	pg. 27
Capítulo 4: Considerações Gerais	pg. 39

SIGLAS E ABREVIATURAS

AMA	Amanitina
ANI	Anisomicina
CA1, CA2, CA3	Corno de Amon 1, 2, ou 3, regiões do hipocampo, que os primeiros anatomistas julgaram ter formato semelhante ao chifre presente em alguma representações de Amon, rei dos deuses da cidade de Tebas, na mitologia do Antigo Egito.
DG	Giro denteado.
DRB	5,6-dicloro-1- β -D-ribofuranosil-benzimidazol.
icv	Intra-cérebro-ventricular.
IEGs	Genes imediatamente ativados, do inglês <i>immediately early genes</i> .
LAM	Labirinto aquático de Morris.
LTM	Memória de Longa Duração, do inglês <i>Long-Term Memory</i>
mRNA	RNA mensageiro.
NMDA	N-metil-D-aspartado, do inglês <i>N-methyl-D-aspartate</i>
RNA	Ácido ribonucléico.
S	Subículo
STM	Memória de Curta Duração, do inglês <i>Short-Term Memory</i>

RESUMO

As memórias não são armazenadas em sua forma definitiva logo após sua aquisição. Para que isso ocorra, há a necessidade de um longo processo de estabilização conhecido como consolidação, que requer a indução de expressão gênica e de síntese proteica em várias regiões do cérebro, dentre elas o hipocampo, estrutura de importância capital para a formação de memórias declarativas. Após a consolidação, as memórias tornam-se novamente instáveis logo após a evocação, e para persistirem necessitam ser re-estabilizadas através de um processo denominado reconsolidação, que também envolve a ativação de síntese proteica no hipocampo. Dentro deste cenário, até o momento da realização deste trabalho, não havia nenhum estudo disponível sobre o efeito da inibição da transcrição gênica sobre a consolidação e reconsolidação de memórias espaciais, um tipo de memória declarativa dependente do hipocampo para ser formada e armazenada. Portanto, visando contribuir para o esclarecimento desta questão, no presente trabalho foi investigado o efeito da inibição pós-treino e pós-evocação da síntese de mRNA hipocampal sobre a retenção de uma memória espacial, utilizando dois distintos inibidores da síntese de mRNA. Nós mostramos que a inibição da expressão gênica no hipocampo dorsal de ratos, durante uma restrita janela temporal pós-treino ou pós-teste, prejudica a retenção da memória espacial de longa duração para a tarefa do labirinto aquático de Morris, sem afetar a memória de curto prazo, o aprendizado não-espacial, ou a funcionalidade do hipocampo. Nossos resultados indicam que a consolidação de uma memória espacial induz a ativação da maquinaria transcricional hipocampal, e sugere a existência de um processo de reconsolidação dependente de expressão gênica que funciona no hipocampo dorsal no momento da evocação para estabilizar o traço mnemônico reativado.

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO

O aprendizado e a memória são os mais importantes mecanismos pelos quais o ambiente altera o comportamento dos animais, inclusive seres humanos. O aprendizado é o processo de aquisição de informações provenientes tanto do ambiente quanto de representações introspectivas do ambiente, enquanto memória é o processo através do qual essas informações são codificadas e armazenadas, podendo depois, conforme a necessidade, serem decodificadas e lembradas.

No curso da evolução da vida na Terra, o surgimento da capacidade de aprender e memorizar permitiu que os seres vivos se beneficiassem de experiências passadas para resolver problemas apresentados pelo meio ambiente, deste modo tornando estes seres mais adaptáveis a mudanças. Coerentemente, verifica-se que os seres mais antigos na escala filogenética, como os invertebrados, já apresentam alguma capacidade mnemônica. Essa característica filogeneticamente conservada sugere que a memória poderia ser considerada como uma propriedade intrínseca do sistema nervoso, presente nele desde seu surgimento na natureza, nos primeiros organismos multicelulares.

As memórias podem ser classificadas quanto ao tempo de retenção de informação armazenada ou quanto à natureza de seu conteúdo [Squire e Kandel, 2003; Squire e Zola, 1996], conforme sumarizado nos **Quadros 1 e 2**, respectivamente.

Quadro 1: Classificação das memórias quanto ao tempo de retenção.

Tempo de Retenção	Características
Ultra-rápida	Dura de frações de segundos a alguns segundos; memória sensorial.
Curta duração	Dura minutos ou horas; garante o sentido de continuidade do presente.
Longa duração	Dura horas, dias ou anos; garante o registro do passado autobiográfico e dos conhecimentos do indivíduo.

Quadro 2: Classificação das memórias quanto à natureza de seu conteúdo.

Tipo de Memória quanto ao conteúdo	Subtipos	Características	Principais regiões cerebrais envolvidas em sua formação
Declarativa ou Explícita (pode ser descrita por meio de palavras ou por comportamento com significado atrelado)	• Episódica (eventos)	Tem uma referência temporal; memória de fatos seqüenciáveis temporalmente.	• Lobo Medial Temporal • Diencefalo
	• Semântica (fatos)	Envolve conceitos atemporais; memória de conhecimentos, cultural. Mapas espaciais.	
Não-declarativa ou Implícita (não pode ser descrita por meio de palavras)	• De representação perceptual, memória pré-ativa (<i>priming</i>)	Representações (imagens, sons) sem significado aparente conhecido, mas úteis como dicas facilitatórias da evocação de informações inerentes; memória pré-consciente.	• Neocórtex
	• De procedimentos	Hábitos, habilidades, regras.	• Estriado • Cerebelo
	• Associativa	A habilidade de associar dois ou mais estímulos (condicionamento clássico), ou um estímulo a uma resposta (condicionamento operante).	• Amígdala (respostas emocionais) • Cerebelo (respostas musculares esqueléticas)
	• Não associativa	Atenua uma resposta (habituação) ou a aumenta (sensibilização) através da repetição de um mesmo estímulo.	• Reflexos
Operacional		Processamento contínuo (<i>on-line</i>) das informações recém-adquiridas e/ou recém-evocadas; permite o raciocínio e o planejamento do comportamento.	• Córtex pré-frontal • Córtex parietal posterior

Quando uma memória se forma no sistema nervoso dos seres vivos, primeiramente tem que haver a aquisição da informação relativa a esta memória, seja de fontes externas (experiências sensoriais oriundas da interação com o ambiente) ou internas (cognição, emoção), o que corresponde à aprendizagem. Após a aprendizagem, segue a retenção da informação, que pode ser de curta ou de longa duração. Enquanto estiver retida, a informação pode ser recuperada, e esta etapa é também chamada de evocação, sinônimo de lembrança. A retenção de curta duração (minutos, horas) pode ser convertida em retenção de longa duração (dias, semanas, anos), pelo processo denominado consolidação, que se inicia imediatamente após a aquisição. Por fim, com o passar do tempo, mesmo as informações mais consolidadas podem desaparecer: trata-se do esquecimento.

De todas as informações que entram no sistema nervoso, apenas algumas são de fato retidas por longos prazos, sendo que a maioria nem sequer é adquirida, sendo filtradas por mecanismos atencionais e emocionais. Das que são adquiridas, apenas algumas são consolidadas como memórias de longa duração, e dentre estas muitas são esquecidas. Apenas perduram aquelas informações realmente mais relevantes para a cognição, mais marcantes emocionalmente, mais focalizadas pela atenção ou mais fortes sensorialmente. Neste contexto, o esquecimento também pode ser visto como um filtro, que diferentemente dos filtros atencionais e emocionais, age também sobre as memórias que já foram selecionadas para perdurarem por longo tempo, principalmente sobre aquelas que raramente necessitam ser lembradas, desempenhando deste modo um papel muito importante como mecanismo de prevenção de sobrecarga nos sistemas cerebrais dedicados a memorização. Sem esquecer, torna-se impossível ignorar detalhes para generalizar alguma coisa, o que restringiria a capacidade de pensamento e raciocínio.

A região do cérebro onde os mecanismos celulares de consolidação mais têm sido investigados é o sistema hipocampal, devido principalmente ao conhecimento prévio de que este sistema desempenha um papel crucial na consolidação de memórias declarativas em todas as espécies de mamíferos, inclusive humanos [Squire e Zola, 1996]. O sistema hipocampal [Fig 1] inclui a formação hipocampal e os córtices perirrinal e para-hipocampal. Já a formação hipocampal é composta pelo hipocampo, subículo e córtex entorrinal. Por sua vez, o hipocampo é composto por duas áreas principais: o corno de Amon (subdividido em quatro campos numerados de 1 a 3 e abreviados CA1, CA2, CA3), e o giro denteado (GD). Os aferentes vindos de fora do hipocampo são as fibras perfurantes, que fazem sinapses com as células granulares do giro denteado. Os axônios das células granulares se estendem até a região CA3, onde estabelecem sinapses com os dendritos das células piramidais. Estas, por sua vez,

projetam seus axônios para fora do hipocampo, mas enviam também colaterais para a região CA1 (os colaterais de Schaffer), que fazem sinapses com os dendritos de outras células piramidais aí situadas, cujos axônios projetam para fora do hipocampo [Martin e Clark, 2007].

Considerando-se as aferências e eferências do sistema hipocampal, estudos mostram que o fluxo de informações que serão armazenadas como memórias declarativas de longa duração são primeiramente processadas em um ou mais dos córtices de associação polimodais (córtices pré-frontal, límbico e parieto-occipito-temporal), que associam informações visuais, auditórias e somáticas. Em seguida, essas informações são encaminhadas para os córtices para-hipocampal e perirrinal, e daí seguem para o córtex entorrinal, giro denteado, hipocampo, subículo e novamente córtex entorrinal. Do córtex entorrinal as informações são enviadas de volta aos córtices para-hipocampal e perirrinal, e então retornam aos córtices de associação polimodais [Fig 2] [Squire e Zola, 1996].

Desta forma, fica evidente que o hipocampo é um local de convergência de informações, fato condizente com as fortes evidências experimentais [Izquierdo et al., 1997] de que a plasticidade sináptica hipocampal tem um papel fundamental tanto na tomada de decisão sobre consolidar ou não uma informação, quanto no próprio mecanismo de consolidação em si, empreendendo o fortalecimento das sinapses nas circuitarias corticais subjacentes da informação a ser armazenada [Wang e Morris, 2010; Squire e Zola, 1996; Dudai, 2004; Martin e Clark, 2007].

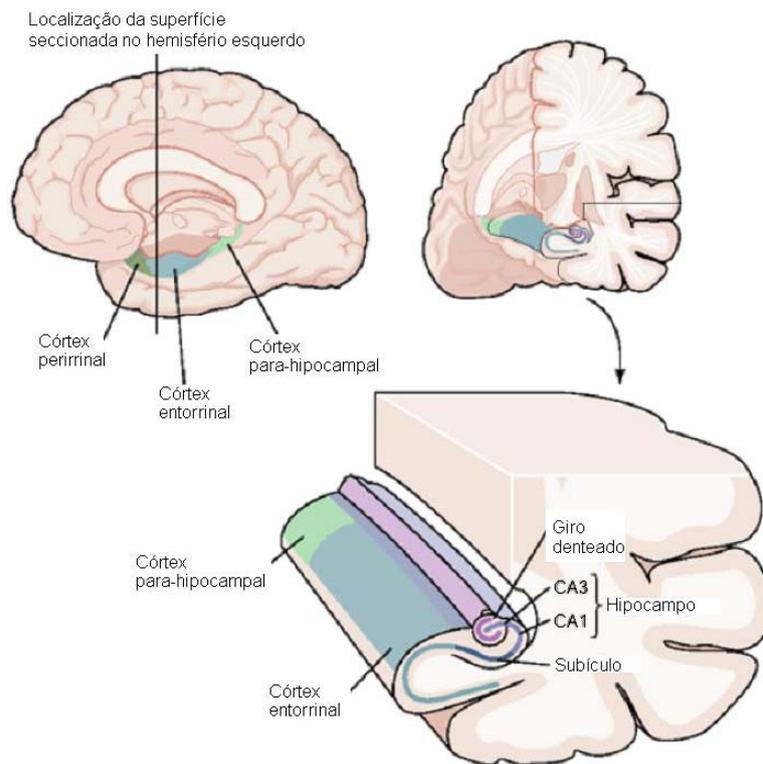


Figura 1: Organização anatômica da formação hipocampal [Kandel et al., 2000].

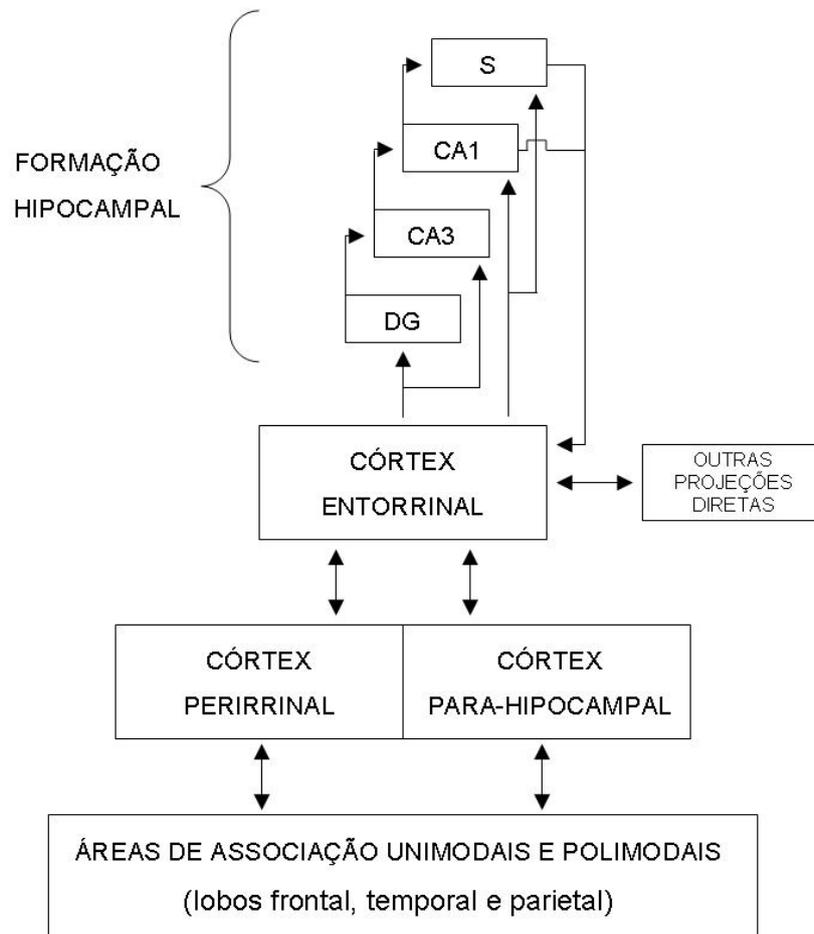


Figura 2: Visão esquemática do sistema mnemônico do lobo temporal medial [Squire e Zola, 1996].

O córtex entorrinal é a maior fonte de projeções para a região hipocampal (que inclui o giro denteado - GD, os Cornos de Amon do hipocampo e o complexo subicular - S). Aproximadamente dois terços das aferências corticais para o córtex entorrinal originam-se nos córtices adjacentes perirrinal e para-hipocampal, os quais por sua vez recebem projeções de áreas unimodais e polimodais nos lobos frontal, temporal e parietal. O córtex entorrinal também recebe outras projeções diretas dos córtices orbital frontal, insular, e do giro temporal superior. Todas essas projeções são recíprocas.

CAPÍTULO 2: REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Consolidação de Memórias

A consolidação é o processo pelo qual há a estabilização dos traços mnemônicos componentes de uma memória após sua aquisição [McGaugh, 1966]. É amplamente aceito que, durante o aprendizado, ocorrem nas circuitarias neurais subjacentes alterações fisiológicas reversíveis na transmissão sináptica dos neurônios componentes, e que são essas alterações que precisam ser estabilizadas para que a memória codificada possa persistir. [Dudai, 1996; McGaugh, 2000; Lamprecht e LeDoux, 2004]. As alterações reversíveis seriam o correspondente molecular da memória de curta duração (STM), e as alterações permanentes, da memória de longa duração (LTM) [Lamprecht e LeDoux, 2004]. Como as alterações moleculares são naturalmente transitórias, não são um mecanismo suficiente para explicar a durabilidade da LTM [Dudai, 2002], sendo, portanto, necessário um mecanismo mais duradouro. De fato, conforme fora antecipado há mais de um século por Santiago Ramón y Cajal [Ramón y Cajal, 1894], há fortes evidências que a LTM exige alterações estruturais na morfologia sináptica, o que por sua vez demanda síntese de novas proteínas [Davis e Squire, 1984; Izquierdo et al., 1998; Kandel, 2001; Lamprecht e LeDoux, 2004]. Assim, a principal característica distinguidora entre a STM e a LTM é que a LTM é sensível a inibidores de síntese protéica [Davis e Squire, 1984; Bourchouladze et al., 1998; Quevedo, 2004].

Muitos experimentos mostram que o período crítico para a ocorrência de síntese protéica necessária para a formação da LTM é durante ou imediatamente após o treino [Bourchouladze et al., 1998; Schafe et al., 1999; Quevedo et al., 2004]. Assim, durante o treino, há a ativação de cascatas de transdução de sinais intracelulares nas redes neuronais requisitadas, que convertem em respostas intracelulares a ação dos

neurotransmissores utilizados na comunicação inter-neuronal. As respostas intracelulares, através da mobilização de segundos mensageiros, convergem rumo a modificação do padrão de expressão gênica, havendo síntese de novos RNA mensageiros, que posteriormente serão traduzidos em novas proteínas [Dudai, 2004].

Essas novas proteínas sintetizadas serão empregadas na reestruturação das sinapses envolvidas, visando alterar de forma duradoura a sensibilidade dessas sinapses aos sinais neurotransmissores. As principais mudanças estruturais que ocorrem nessas sinapses são o aumento nas quantidades de vesículas de armazenamento de neurotransmissores, de sítios para liberação dessas vesículas, e de terminais pré-sinápticos, concomitantemente com mudanças estruturais nos espinhos dendríticos pós-sinápticos que aumentam sua capacidade de geração de potenciais pós-sinápticos excitatórios [Dudai, 2004; Bailey e Kandel, 1993; Weiler et al., 1995].

A necessidade de uma etapa de consolidação de uma informação, para que só a partir deste processo ela possa ser armazenada por longo período de tempo, pode ser justificada sob duas linhas de raciocínio [Dudai, 2004], uma baseada na teoria da computação e outra no nível de implementação de circuitos [Marr, 1982], isto é, de que forma os algoritmos que executam as computações neurais são implementados na circuitaria biológica. Na primeira linha, se todas as informações fossem codificadas em representações internas, haveria uma sobrecarga de espaço computacional cerebral, gasta com informações inúteis, o que rapidamente reduziria a capacidade cerebral de processamento e armazenamento. Na segunda linha, o período em que ocorre a consolidação pode servir como uma janela temporal onde as novas informações adquiridas são maleáveis e prontamente associáveis com outras informações provenientes tanto da rede neuronal inerentemente ativada (*on-line*) quanto de outras redes neuronais não diretamente relacionadas (*off-line*), permitindo assim que as novas

informações sejam agrupadas com as pré-existentes de uma maneira mais organizada. Isto é útil para a construção de uma representação interna mais significativa, que por sua vez facilita a posterior localização e contextualização dessas informações, processos estes que respaldam a evocação eficiente dessas informações quando necessário.

2.2. Reconsolidação de Memórias

Após a consolidação, uma memória pode permanecer estavelmente armazenada, e circunstancialmente ser evocada quando necessário, mas isso não significa que esta memória estará cristalina e indefinidamente gravada, insensível a todo tipo de evento pós-consolidação. Ao invés disso, as memórias consolidadas tornam-se labilizadas quando reativadas, o que ocorre quando são evocadas. Durante essa nova fase de fragilidade, essas memórias podem ter sua retenção prejudicada se houver bloqueio da síntese de proteínas, de forma semelhante ao que ocorre na fase inicial de consolidação. Como um conjunto semelhante de interferências pode afetar a estabilidade de memórias quando agem tanto na fase inicial do aprendizado quanto logo após a evocação, o processo que converte a memória labilizada pela evocação em uma forma novamente estável é denominado reconsolidação [Alberini, 2005; Dudai e Eisenberg, 2004; Nader et al., 2000; Sara, 2000; Tronson e Taylor, 2007].

Apesar da denominação, a reconsolidação não é apenas uma simples reiteração da consolidação, pois a estabilização pós-reativação é um processo diferente da estabilização promovida na consolidação, apesar de existir uma sobreposição destes processos quanto a função de armazenamento de memórias e quanto a necessidade subjacente de síntese protéica [Tronson e Taylor, 2007].

A existência de um processo de reconsolidação é justificável do ponto de vista de computabilidade de informações, pois um sistema em que as memórias selecionadas

para armazenamento duradouro não pudessem mais ser modificadas teria sua capacidade de processamento de informações bem restrita. Assim, a reconsolidação pode ser o mecanismo que permita que memórias antigas possam ser integradas a novas memórias, ou que memórias antigas possam ser atualizadas ou mesmo substituídas por novas memórias cujo significado seja conflitante, mas que apresentem melhor representatividade das novas condições no tempo presente do que as antigas memórias formadas em outras condições no passado [Alberini, 2005]. Além disso, a reconsolidação pode também ser visualizada como uma fase de um processo de consolidação mais extenso, através do qual o grau de estabilização do traço mnemônico seria não apenas uma função da duração e intensidade do aprendizado, mas também do número de vezes que este traço é reativado. Como o número de reativações de um traço mnemônico está diretamente relacionado com sua relevância comportamental, torna-se muito conveniente para os sistemas neurais atrelar o grau de estabilização desse traço ao número de vezes em que será necessário evocá-lo. Desta forma, quanto mais uma memória for evocada, maior será o grau de estabilização de seus traços mnemônicos subjacentes, e portanto menos suscetível ela será a intervenções que são amnésicas quando atuam ou na fase inicial da consolidação (durante ou após o aprendizado) ou logo após as primeiras reativações [Alberini, 2005].

A Figura 3 expõe resumidamente a seqüência temporal dos principais eventos celulares e moleculares mobilizados pela consolidação e pela reconsolidação de memórias.

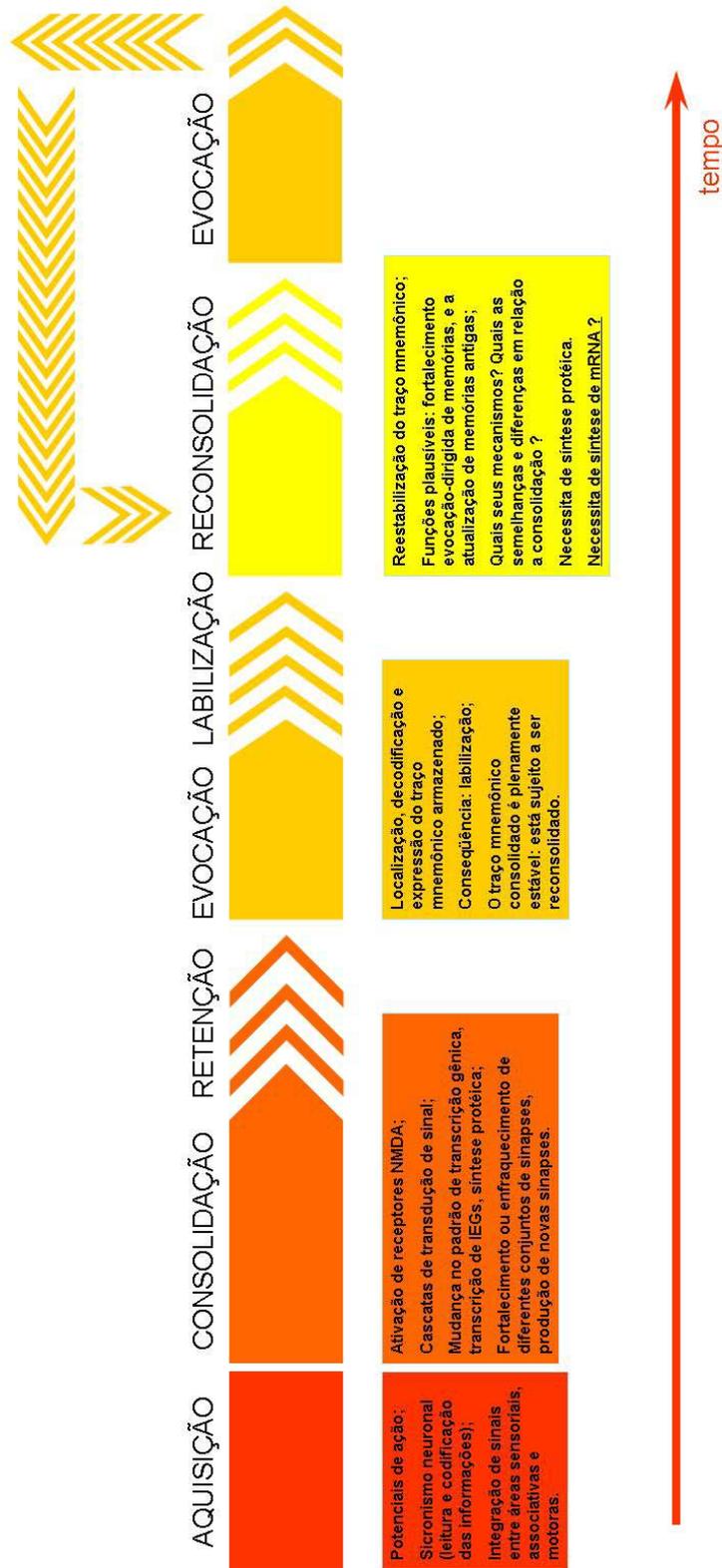


Figura 3: Sequência temporal dos principais eventos celulares e moleculares mobilizados pela consolidação e pela reconsolidação de memórias [Lamprecht e LeDoux, 2004 ;Tronson e Taylor, 2007].

Uma questão que permanece controversa sobre a reconsolidação de memórias é se este processo também requer indução de transcrição gênica, e em caso afirmativo, se requer que esta indução ocorra nas mesmas áreas cerebrais utilizadas para a consolidação do traço original. Os estudos prévios sobre essas questões são conflitantes. Enquanto há alguns grupos de pesquisa que mostraram que a reconsolidação depende de transcrição gênica e de síntese protéica [Kida et al., 2002; Sangha et al., 2003; Lee et al., 2004; Merlo et al., 2005], há outros grupos que, utilizando tarefas comportamentais similares, mostraram que a consolidação, mas não a reconsolidação, requer síntese de mRNA [Taubenfeld et al., 2001; Parsons et al. 2006]. Além disso, vários estudos indicam que alguns fatores de transcrição são ativados apenas durante a reconsolidação [Hall et al., 2001; Lee et al., 2004]. Assim, o real nível de participação da transcrição gênica na reconsolidação ainda é um tema de debate.

2.3. Memória espacial

Na literatura está bem estabelecido que a integridade da formação hipocampal é essencial para a aprendizagem espacial, mas os mecanismos neurais precisos sobre o envolvimento do hipocampo neste processo não está totalmente compreendido. Muitas evidências mostram que o hipocampo é necessário para a aquisição, a evocação, a consolidação e o armazenamento de informações espaciais [Stewart e Morris, 1993; D’Hooge e De Deyn, 2001]. Certamente há o envolvimento de outras regiões cerebrais na navegação espacial, podendo abranger um número de regiões e vias de comunicações inter-regionais maior do que o originalmente proposto [Cain e Saucier, 1996; D’Hooge e De Deyn, 2001].

Muitas células piramidais hipocampais disparam quando um dado rato está em um local em particular, cuja localização seja definida, por exemplo, por diferentes pistas espaciais presentes em uma sala [O’Keefe, 1990, 1991; Kubie e Muller 1991; Rolls, 2000]. Estas células, denominadas células de lugar (*place cells* em inglês), foram sugeridas como o substrato primário de habilidades mnemônicas espaciais que subjaz o processo de navegação espacial [Poucet et al., 2000; D’Hooge e De Deyn, 2001]. A presença dessas células de lugar promoveu a elaboração de teorias segundo as quais o hipocampo de ratos funciona como um mapa espacial, e que pode realizar computações espaciais para implementar navegações dentro de ambientes contendo pistas espaciais suficientes [O’Keefe e Nadel, 1978; O’Keefe, 1991; Burgess et al., 1994; Rolls, 2000].

A tarefa comportamental do labirinto aquático de Morris (LAM) é talvez o paradigma de aprendizado mais utilizado para investigar o processamento de memórias espaciais [Bures et al., 1997; Redish e Touretzky, 1998; De Hoz et al., 2004; Schimanski e Nguyen, 2004]. Nesta tarefa, os ratos (ou outros pequenos roedores) são treinados para escapar da água, através do nado até uma plataforma escondida logo

abaixo da superfície da água, cuja localização só pode ser encontrada utilizando-se pistas espaciais externas ao tanque que contém a água e a plataforma. Análises comportamentais do aprendizado na tarefa do LAM indicam que há a mobilização de um grupo de processos cognitivos envolvidos por um lado com o armazenamento e evocação das informações visuais, e por outro lado com o planejamento e estratégias de navegação.

A intensidade da memória para a tarefa do LAM pode ser aferida em um teste no qual a plataforma é removida do tanque, e os ratos são largados e deixados nadar por um período de tempo. Ratos normais nadam diretamente do ponto de largada até o local onde a plataforma se encontrava durante os dias de treino, e persistem procurando por ela nas proximidades desse local, o que se expressa como a porcentagem de tempo gasto no quadrante alvo (quadrante virtual cujo centro geométrico é o local onde se encontrava a plataforma) significativamente maior do que o esperado pela chance aleatória (25% do tempo de teste em cada quadrante). Se o tanque for totalmente envolto por cortinas, após várias sessões de treino sem essas cortinas, o desempenho do rato em encontrar o local da plataforma cai para o esperado pela chance aleatória. Por isso, o parâmetro de porcentagem do tempo de teste gasto no quadrante alvo também é denominado em alguns trabalhos como teste de transferência (*transfer test* em inglês). Entretanto, se durante o teste, houver cortinas cobrindo apenas parte do tanque, o desempenho dos ratos é relativamente pouco afetado. Isso implica que as pistas espaciais externas ao tanque são essenciais para o aprendizado, mas que nenhuma pista na sala do LAM é absolutamente importante [Stewart e Morris, 1993].

Assim, durante o aprendizado espacial, o parâmetro quantitativo mais simples que evidencia a gradual mudança do desempenho do animal em encontrar o local da plataforma é o declínio no tempo que esse animal leva para encontrar esse local. Esse

tempo é denominado latência de escape. Entretanto, como pode haver muitos outros fatores que contribuem para uma dada latência de escape além da taxa de aprendizagem espacial (incluindo tigmotaxia, déficits visuais, fatores atencionais e motivacionais), torna-se necessário conduzir outras análises de desempenho para se obter um cenário mais detalhado. Dentre essas análises, o teste de transferência é um dos mais importantes e utilizados, pois fornece um parâmetro, independente da latência de escape e da velocidade de nado, da tendência de o animal persistir na procura pelo local onde a plataforma se encontrava durante todo o treino [Stewart e Morris, 1993].

A tarefa do LAM foi descrita há 25 anos como um instrumento para investigação do aprendizado e memória espacial em ratos [Morris, 1984]. Certamente, outras tarefas de aprendizado espacial foram desenvolvidas, estando entre elas o labirinto radial como o exemplo mais proeminente [Wenk, 1998]. Entretanto, quando comparadas ao LAM, as outras tarefas de aprendizado espacial são frequentemente mais complicadas e demandam protocolos de treino mais trabalhosos. A relativa simplicidade de implementação da tarefa do LAM sem dúvida é uma das razões de seu contínuo sucesso. Além disso, a possibilidade de diferenciação entre os condições espaciais (plataforma de escape escondida) e não-espaciais (plataforma de escape visível) da tarefa é vista por muitos autores como sua principal vantagem [D'Hooge e De Deyn, 2001]. Uma vantagem adicional de labirintos aquáticos em relação aos secos é a menor probabilidade de interferência de rastros de odor sobre o comportamento dos animais, o que poderia habilitá-los a empregar uma estratégia de navegação não-espacial (baseada no olfato) para solucionar o labirinto (encontrar o escape), apesar da ausência de pistas espaciais próximas. Mas ainda assim, já se mostrou que ratos podem se guiar por rastros de odor mesmo em labirintos aquáticos, sob certas condições [Means, 1992]. Uma outra vantagem verificada no LAM é que esta tarefa não requer privação de comida nem de

água. Todas essas vantagens ajudam a explicar porque a tarefa do LAM têm sido amplamente utilizada nos estudos sobre memória espacial envolvendo lesões ou intervenções farmacológicas [Stewart e Morris, 1993].

A tarefa do LAM possui uma particular sensibilidade aos efeitos de lesões hipocampais em ratos [Morris, 1984; Morris et al., 1982; Stewart e Morris, 1993, D'Hooge e De Deyn, 2001]. Muitos autores têm apresentado evidências para um envolvimento específico e desproporcional da formação hipocampal em aspectos espaciais do aprendizado na tarefa do LAM [D'Hooge e De Deyn, 2001]. Assim, ratos com os hipocampos lesionados apresentam déficit de aprendizado na tarefa de LAM quando a plataforma de escape não pode ser vista durante o treino, mas apresentam um desempenho normal quando a plataforma encontra-se visível. Interessantemente, o grau de prejuízo no aprendizado espacial em ratos com lesões hipocampais está relacionado com o volume de tecido hipocampal lesionado, e já foi demonstrado que lesões no hipocampo dorsal causam um prejuízo mais pronunciado do que lesões no hipocampo ventral [Moser, 1993; Moser, 1995].

2.4. Relação entre memória espacial e síntese de mRNA hipocampal

A infusão intra-cérebro-ventricular (icv) do inibidor de síntese protéica anisomicina (ANI) bloqueia a aquisição da memória associada ao LAM [Meiri e Rosenblum, 1998] enquanto que a infusão intraperitonal e intra-hipocampal de ANI prejudica tanto a consolidação quanto a reconsolidação dessa memória [Suzuki et al., 2004; Morris et al., 2006; Rossato et al., 2006]. Porém, até a data de publicação deste trabalho, não havia nenhum estudo sobre as conseqüências da inibição de síntese de mRNA sobre a consolidação e a reconsolidação de memória espacial. Portanto, neste

trabalho investigamos o efeito da inibição pós-treino e pós-reativação da síntese de mRNA hipocampal sobre a retenção da preferência espacial no LAM.

CAPÍTULO 3: OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar se a consolidação e a reconsolidação de uma memória hipocampo-dependente requerem a síntese de mRNA no hipocampo dorsal de ratos.

3.2. Objetivos específicos

1) Investigar se a inibição da transcrição gênica no hipocampo dorsal de ratos prejudica a consolidação da memória espacial de longa duração para a tarefa do LAM, e determinar qual a janela temporal deste efeito, se houver, através da infusão bilateral intra-hipocampal de amanitina (50 pmol/lado) ou DRB (20 nmol/lado), imediatamente ou 3 horas após cada sessão diária de treino na versão espacial extensiva do LAM.

2) Investigar se a inibição da transcrição gênica no hipocampo dorsal de ratos prejudica a memória espacial de curta duração para a tarefa do LAM, no mesmo instante pós-treino em que tiver havido prejuízo na consolidação da memória de longa duração, através da infusão bilateral intra-hipocampal de amanitina (50 pmol/lado) após a sessão única de treino na versão espacial massiva do LAM.

3) Investigar se a inibição da transcrição gênica no hipocampo dorsal de ratos prejudica o desempenho deles em uma versão não-espacial do LAM, no mesmo instante pós-treino em que tiver havido prejuízo na consolidação da memória de longa duração, através da infusão bilateral intra-hipocampal de amanitina (50 pmol/lado) após cada sessão diária de treino na versão não-espacial do LAM.

4) Investigar se a inibição da transcrição gênica no hipocampo dorsal de ratos, através da infusão bilateral intra-hipocampal de amanitina (50 pmol/lado) ou DRB (20 nmol/lado), imediatamente ou 3 horas após uma sessão única de teste (plataforma

ausente) realizada 24 horas após a última sessão de treino na versão espacial extensiva do LAM, prejudica a reconsolidação da memória espacial de longa duração para esta tarefa, mensurada em uma segunda sessão única de teste realizada 24 ou 120 horas após o primeiro teste.

5) Investigar se a infusão bilateral intra-hipocampal de amanitina (50 pmol/lado) no mesmo instante pós-teste (sem plataforma) em que tiver havido prejuízo na reconsolidação da memória de longa duração, terá algum efeito sobre a retenção do traço mnemônico em um segundo teste realizado 3 horas após o primeiro teste, realizado 24 horas após a última sessão de treino na versão espacial extensiva do LAM.

6) Investigar se a inibição da transcrição gênica no hipocampo dorsal de ratos, através da infusão bilateral intra-hipocampal de amanitina (50 pmol/lado) 24 horas após a última sessão de treino na versão espacial extensiva do LAM, causa algum efeito sobre a retenção da memória espacial de longo prazo mensurada em uma sessão única de teste realizada 24 ou 120 horas após a infusão.

7) Investigar se a inibição da transcrição gênica no hipocampo dorsal de ratos, através da infusão bilateral intra-hipocampal de amanitina (50 pmol/lado), imediatamente ou 3 horas após uma sessão única de teste (plataforma presente) realizada 24 horas após a última sessão de treino na versão espacial extensiva do LAM, prejudica a reconsolidação da memória espacial de longa duração para esta tarefa, mensurada em uma segunda sessão única de teste realizada 24 ou 120 horas após o primeiro teste.

REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

- Alberini CM. 2005. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends Neurosci* 28: 51–56.
- Bailey CH, Kandel ER. 1993. Structural changes accompanying memory storage. *Annu Rev Physiol* 55: 397-426.
- Bourtchouladze R, Abel T, Berman N, Gordon R, Lapidus K, Kandel ER. 1998. Different training procedures recruit either one or two critical periods for contextual memory consolidation, each of which requires protein synthesis and PKA. *Learn Mem* 5: 365–74.
- Bures J, Fenton AA, Kaminsky Y, Zinyuk L. 1997. Place cells and place navigation. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 343–350.
- Burgess N, Recce M, O'Keefe J. 1994. A model of hippocampal function. *Neural Netw* 7: 1065–1081.
- Cain DP, Saucier D. 1996. The neuroscience of spatial navigation: focus on behavior yields advances. *Rev Neurosci* 7: 215–231.
- Davis HP, Squire LR. 1984. Protein synthesis and memory: a review. *Psychol Bull* 96: 518–559.
- De Hoz L, Martin SJ, Morris RG. 2004. Forgetting, reminding, and remembering: The retrieval of lost spatial memory. *PLoS Biol* 2: E225.
- D'Hooge R, De Deyn PP. 2001. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Research Reviews* 36: 60–90.
- Dudai Y. 1996. Consolidation: fragility on the road to the engram. *Neuron* 17: 367 -370.
- Dudai Y. 2002. Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. *Curr Opin Neurobiol* 12: 211–216.
- Dudai Y. 2004. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol* 55: 51-86.
- Dudai Y, Eisenberg M. 2004. Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron* 44: 93–100.
- Hall J, Thomas KL, Everitt BJ. 2001. Cellular imaging of zif268 expression in the hippocampus and amygdala during contextual and cued fear memory retrieval: Selective activation of hippocampal CA1 neurons during the recall of contextual memories. *J Neurosci* 21: 2186–2193.

- Izquierdo I, Barros DM, Mello e Souza T, de Souza MM, Izquierdo LA, Medina JH. 1998. Mechanisms for memory types differ. *Nature* 393: 635.
- Izquierdo I, Medina JH. 1997. Memory formation - the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem* 68: 285–316.
- Kandel ER. 2001. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294, 1030–1038.
- Kandel ER, Kupfermann I, Iversen S. 2000. Learning and Memory. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. *Principles of Neural Science*. McGraw-Hill 4a. ed., New York.
- Kida S, Josselyn AS, de Ortiz SP, Kogan JH, Chevere I, Masushige S, Silva AJ. 2002. CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. *Nat Neurosci* 5: 348–355.
- Kubie JL, Muller RU. 1991. Multiple representations in the hippocampus. *Hippocampus* 1: 240–242.
- Lamprecht L, LeDoux J. 2004. Structural plasticity and memory. *Nat Rev Neurosci* 5: 45-54.
- Lee JL, Everitt BJ, Thomas KL. 2004. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science* 304: 839–843.
- Marr D. 1982. *Vision*. Freeman, San Francisco.
- Martin SJ, Clark RE. 2007. The rodent hippocampus and spatial memory: from synapses to systems. *Cell Mol Life Sci* 64: 401 – 431.
- McGaugh JL. 1966. Time-dependent processes in memory storage. *Science* 153: 1351-1358.
- McGaugh JL. 2000. Memory — a century of consolidation. *Science* 287: 248–251.
- Means LW, Alexander SR, O’Neal MF. 1992. Those cheating rats: male and female rats use odor trails in a water-escape ‘working memory’ task. *Behav Neural Biol* 58: 144–151.
- Meiri N, Rosenblum K. 1998. Lateral ventricle injection of the protein synthesis inhibitor anisomycin impairs long-term memory in a spatial memory task. *Brain Res* 789: 48–55.
- Merlo E, Freudenthal R, Maldonado H, Romano A. 2005. Activation of the transcription factor NF- κ B by retrieval is required for long term memory reconsolidation. *Learn Mem* 12: 23–29.

- Morris R. 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11: 47–60.
- Morris RGM, Garrud P, Rawlins JNP, O'Keefe J. 1982. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297: 681–683.
- Morris RG, Inglis J, Ainge JA, Olverman HJ, Tulloch J, Dudai Y, Kelly PA. 2006. Memory reconsolidation: Sensitivity of spatial memory to inhibition of protein synthesis in dorsal hippocampus during encoding and retrieval. *Neuron* 50: 479–489.
- Moser E, Moser MB, Andersen P. 1993. Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *J Neurosci* 13: 3916–3925.
- Moser MB, Moser EI, Forrest E, Andersen P, Morris RG. 1995. Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 9697–9701.
- Nader K, Schafe GE, LeDoux JE. 2000. The labile nature of consolidation theory. *Nat Rev Neurosci* 1: 216–219.
- O'Keefe J. 1990. A computational theory of the cognitive map. *Prog Brain Res* 83: 301–312.
- O'Keefe J. 1991. The hippocampal cognitive map and navigational strategies. In Paillard J. 1991. *Brain and Space*. Oxford Univ Press, Oxford, UK: 273-295.
- O'Keefe J, Nadel L. 1978. *The hippocampus as a cognitive map*. Clarendon, Oxford, UK: 570 pp.
- Parsons RG, Gafford GM, Baruch DE, Riedner BA, Helmstetter FJ. 2006. Long-term stability of fear memory depends on the synthesis of protein but not mRNA in the amygdala. *Eur J Neurosci* 23: 1853–1859.
- Poucet B, Save E, Lenck-Santini PP. 2000. Sensory and memory properties of hippocampal place cells. *Rev Neurosci* 11: 95–111.
- Quevedo J, Vianna MR, Martins MR, Barichello T, Medina JH, Roesler R, Izquierdo I. 2004. Protein synthesis, PKA, and MAP kinase are differentially involved in short- and long-term memory in rats. *Behav Brain Res* 154(2): 339-343.
- Ramón y Cajal S. 1894. La fine structure des centres nerveux. *Proc R Soc Lond* 55: 444–468.
- Redish AD, Touretzky DS. 1998. The role of the hippocampus in solving the Morris water maze. *Neural Comput* 10: 73–111.
- Rolls ET. 2000. Memory systems in the brain. *Annu Rev Psychol* 51: 599-630.

- Rossato JI, Bevilacqua LR, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. 2006. Retrieval induces hippocampal-dependent reconsolidation of spatial memory. *Learn Mem* 13: 431–440.
- Sangha S, Scheibenstock A, Lukowiak K. 2003. Reconsolidation of a long-term memory in *Lymnaea* requires new protein and RNA synthesis and the soma of right pedal dorsal 1. *J Neurosci* 23: 8034–8040.
- Sara SJ. 2000. Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. *Learn Mem* 7: 73–84.
- Schafe GE, Nadel NV, Sullivan GM, Harris A, LeDoux JE. 1999. Memory consolidation for contextual and auditory fear conditioning is dependent on protein synthesis, PKA, and MAP kinase. *Learn Mem* 6: 97–110.
- Schimanski LA, Nguyen PV. 2004. Multidisciplinary approaches for investigating the mechanisms of hippocampus-dependent memory: A focus on inbred mouse strains. *Neurosci Biobehav Rev* 28: 463–483.
- Squire LR, Kandel ER. 2003. *Memória: da mente às moléculas*. Artmed, Porto Alegre.
- Squire LR, Zola SM. 1996. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 13515-13522.
- Stewart CA, Morris RGM. 1993. The watermaze, in: Sahgal A (Ed.), *Behavioural Neuroscience. A Practical Approach*, Vol. 1, IRL Press, Oxford: 107–122.
- Suzuki A, Josselyn SA, Frankland PW, Masushige S, Silva AJ, Kida S. 2004. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J Neurosci* 24: 4787–4795.
- Taubenfeld SM, Milekic MH, Monti B, Alberini CM. 2001. The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBP β . *Nat Neurosci* 4: 813–818.
- Tronson NC, Taylor JR. 2007. Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nat Rev Neurosci* 8: 262–275.
- Wang SH, Morris RGM. 2010. Hippocampal-neocortical interactions in memory formation, consolidation, and reconsolidation. *Annu Rev Psychol* 61: 49–79.
- Weiler IJ, Hawrylak N, Greenough WT. 1995. Morphogenesis in memory formation: synaptic and cellular mechanisms. *Behav Brain Res* 66(1-2): 1-6.
- Wenk GL. 1998. Assessment of spatial memory using radial arm and Morris water mazes, in: Crawley J, Gerfen C, McKay R, Rogawski M, Sibley D, Skolnick P (Eds.), *Current Protocols in Neuroscience*, Wiley, New York.

ARTIGO CIENTÍFICO

HIPPOCAMPUS 18:29–39 (2008)

Inhibition of mRNA Synthesis in the Hippocampus Impairs
Consolidation and Reconsolidation of Spatial Memory

Weber C. Da Silva,^{1,2} Juliana S. Bonini,¹ Lia R.M. Bevilaqua,¹ Jorge H. Medina,³
Iván Izquierdo,¹ and Martín Cammarota^{1,3*}

Inhibition of mRNA Synthesis in the Hippocampus Impairs Consolidation and Reconsolidation of Spatial Memory

Weber C. Da Silva,^{1,2} Juliana S. Bonini,¹ Lia R.M. Bevilaqua,¹ Jorge H. Medina,³ Iván Izquierdo,¹ and Martín Cammarota^{1,3*}

ABSTRACT: Using two different mRNA synthesis inhibitors, we show that blockade of hippocampal gene expression during restricted post-training or postretrieval time windows hinders retention of long-term spatial memory for the Morris water maze task, without affecting short-term memory, nonspatial learning, or the functionality of the hippocampus. Our results indicate that spatial memory consolidation induces the activation of the hippocampal transcriptional machinery and suggest the existence of a gene expression-dependent reconsolidation process that operates in the dorsal hippocampus at the moment of retrieval to stabilize the reactivated mnemonic trace. © 2007 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: memory; learning; consolidation; reconsolidation; mRNA; transcription; hippocampus

INTRODUCTION

Memories are not stored in definitive form immediately after acquisition. Before that they must undergo a protracted stabilization process known as consolidation (McGaugh, 1966). Induction of gene expression and protein synthesis (Igaz et al., 2002; Cammarota et al., 2003) in several areas of the brain constitute critical steps in memory consolidation. It has also been demonstrated that upon retrieval consolidated memories are rendered unstable again and in order to persist must be restabilized through a reconsolidation process that involves activation of the translational machinery (Nader et al., 2000; Sara, 2000; Tronson and Taylor, 2007). One question that remains controversial regarding memory reconsolidation is whether this process also requires induction of gene expression and, if it does so, whether this must occur in the same areas of the brain used for consolidation of the original trace. Previous reports

about this issue are conflicting. While some research groups showed that reconsolidation is dependent on transcription and translation (Kida et al., 2002; Sangha et al., 2003; Lee et al., 2004; Merlo et al., 2005), using similar behavioral tasks others found that consolidation but not reconsolidation requires synthesis of mRNA (Taubenfeld et al., 2001; Parsons et al., 2006). In addition, several studies indicate that some transcription factors are activated only during memory reconsolidation (Hall et al., 2001; Lee et al., 2004). Clearly, the actual participation of gene transcription in this process is still a matter of debate.

The Morris water maze task (MWM) is perhaps the learning paradigm most utilized to investigate spatial memory processing (Bures et al., 1997; Redish and Touretzky, 1998; De Hoz et al., 2004; Schimanski and Nguyen, 2004). Intracerebroventricular infusion of the protein synthesis inhibitor anisomycin (ANI) blocks acquisition of the memory associated with the MWM (Meiri and Rosenblum, 1998) while intraperitoneal and intrahippocampal ANI impair both consolidation and reconsolidation of this memory (Suzuki et al., 2004; Morris et al., 2006; Rossato et al., 2006). However, at present there are no studies on the consequences of mRNA synthesis inhibition in the consolidation and reconsolidation of spatial memory. Therefore, we investigated the effect of posttraining and postretrieval inhibition of hippocampal mRNA synthesis on retention of a spatial preference in the MWM.

MATERIALS AND METHODS

Subjects, Surgery, and Drug-Infusion Procedures

Three-month-old male Wistar rats weighing 220–280 g and raised in our animal facilities were used in the experiments. Animals were housed four or five to a cage and maintained at 21–23°C under a 12-h light/12-h dark cycle (lights on at 7:00 a.m.) with free access to food and water. To implant them with indwelling cannulae, rats were deeply anesthetized with thiopental (30–50 mg/kg, i.p.), and 27-gauge 9.0-mm

¹Centro de Memória, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6690, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil; ²Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Ramiro Barcelos 2400, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil; ³Laboratorio de Neuroreceptores, Instituto de Biología Celular y Neurociencias “Prof. Dr. Eduardo de Robertis”, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Paraguay 2155 3 Piso, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, CP1121, Argentina

*Correspondence to: Martín Cammarota, Centro de Memória, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 6690, Porto Alegre, RS 90610-000, Brasil.

E-mail: mcammaro@terra.com.br

Accepted for publication 20 July 2007

DOI 10.1002/hipo.20362

guide cannulae were stereotaxically aimed to the pyramidal cell layer of the dorsal CA1 region, using coordinates (A -4.2 , L ± 3.0 , V 2.0 from bregma) taken from the atlas of Paxinos and Watson (1986). The animals were allowed to recover from surgery during 4 days before submitting them to any other procedure. At the time of drug delivery, 30-gauge 10.0-mm infusion needles (extending 1.0 mm beyond guide cannulae) were tightly fitted into the guides. Infusions (0.8 $\mu\text{l}/\text{side}$) were carried out over 60 s and the infusion cannulae were left in place for 30 additional seconds to minimize backflow. Cannulae placement was verified postmortem: 2–4 h after the last behavioral test, 0.8 μl of a 4% methylene-blue solution was infused as described earlier, and the extension of the dye 30 min thereafter was taken as indicative of the presumable diffusion of the vehicle or drug previously given to each animal. Only data from animals with correct implants were included in the statistical analyses. All experiments were conducted blind to the treatment condition of the animals and following the guidelines of the National Institutes of Health of the USA for animal care and use, and were approved by the Animal Care and Ethical Committees of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul.

Drugs

α -amanitin (AMA) was purchased from Sigma and 5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB) was obtained from Calbiochem. Drugs were first dissolved in 100% DMSO and stored frozen at -20°C until the moment of use, when they were diluted to working concentration with saline.

Training in the Spatial Version of the MWM Learning Task

The water maze was a black circular pool (200 cm in diameter) conceptually divided into four equal imaginary quadrants for the purpose of data analysis. The water temperature was $21\text{--}23^\circ\text{C}$. Two centimeters beneath the surface of the water and hidden from the rat's view was a black circular platform (12 cm in diameter). It had a rough surface, which allowed the rats to climb onto it easily once detected. The swimming path of the animals was recorded using a video camera mounted above the center of the pool and analyzed using a video tracking and analysis system. The water maze was located in a well-lit white room with several posters and other distal visual stimuli hanging on the walls to provide spatial cues. Rats were handled 5 min per day for 3 days prior to training. Training using the spaced training protocol was carried out during 5 successive days. On each day, rats received eight consecutive training trials, during which the hidden platform was kept in a constant location. A different starting location was used on each trial, which consisted of a swim followed by a 30-s platform sit. Any rat that did not find the platform within 60 s was guided to it by the experimenter. Memory retention was evaluated in a 60-s probe trial carried out in the absence of the escape platform 24 h after the last training session. To evaluate the effect of mRNA synthesis inhibitors given after memory

reactivation, rats were trained for 5 days as indicated earlier, before being submitted to a probe test in the absence of the escape platform 24 h after the last training session. At different times after that, rats received intra-CA1 infusions of the drug under scrutiny or vehicle. Memory retention was evaluated in a second probe test carried out at 24 or 120 h after the first one. Training using the massed training protocol consisted of 16 consecutive trials in one session, during which the hidden platform was kept in a constant location. A different start position was used on each trial, which consisted of a swim followed by a 60-s (Trials 1–4), 40-s (Trials 5–8) or 20-s (Trials 9–16) stay on the escape platform. Any rat that did not find the platform within 120 s was guided to it by the experimenter.

Training in the Nonspatial Version of the MWM

For training in the nonspatial version of the MWM task, we used the same tank utilized for training in the spatial version of the task but surrounded it by a black curtain so there were no extra-pool spatial cues available. A white circular disk, 10 cm in diameter, was mounted on top of the hidden platform to cue the location of the submerged platform. Training in the cued version of the MWM was carried out during two consecutive days. On each day, rats received eight consecutive 60-s training trials with a 30 s inter-trial interval (ITI). The starting location was changed on each trial. The infusion of drugs was performed as stated earlier.

Statistical Analysis

Data were analyzed by a two-tailed Student's *t*-test, ANOVA, or two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc tests, as appropriate.

RESULTS

First we determined whether mRNA synthesis is required in the hippocampus for consolidation of spatial memory in the MWM using a spaced training protocol (Morris et al., 1986, 2006; Kogan et al., 1997; Spreng et al., 2002; Commins et al., 2003; Baldi et al., 2005; Bonini et al., 2007). Bilateral infusions of the RNA polymerase II inhibitor AMA (50 pmol/side) in the CA1 region of the dorsal hippocampus immediately ($F_{(1,15)} = 42.31$, $P < 0.005$; Fig. 1A) but not 3 h after each daily training session (Fig. 1B) blocked the improvement in escape latency seen in control animals. A probe test in the absence of the escape platform performed 24 h after the last training session confirmed that AMA impairs consolidation of spatial memory (Fig. 1C). During this probe test, rats that had received AMA immediately after each training session showed significantly longer latencies to swim over the previous location of the escape platform ($t_{(15)} = 3.35$, $P < 0.05$; Fig. 1D) and spent less time swimming in the target quadrant than those that had been given vehicle ($t_{(15)} = 5.29$, $P < 0.005$; Fig. 1E). The amnesic effect of AMA was entirely reversible. In fact,

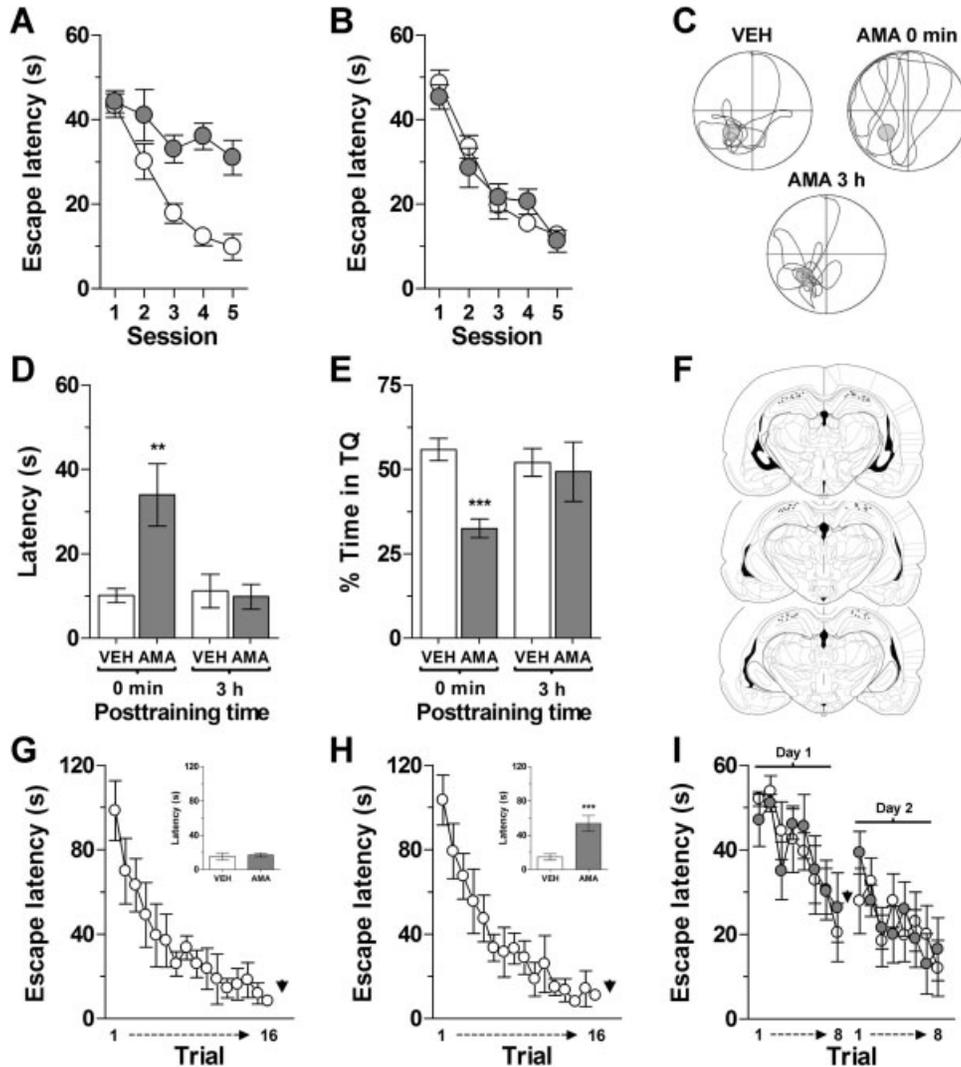


FIGURE 1. Intrahippocampal infusion of α -amanitin blocks long-term spatial memory consolidation without affecting short-term memory or nonspatial memory retention. (A) Mean escape latency during the 5 days of training in the spatial version of the MWM (spaced training protocol) for rats given α -amanitin (50 pmol/side; AMA, grey circles) or vehicle (VEH, white circles) in the CA1 region of the dorsal hippocampus immediately or (B) 3 h after each training session. Data are presented in blocks of eight trials as mean \pm SEM; $n = 8-9$ per group. (C) Representative swimming paths during a 60-s probe test carried out 24 h after the last training session for the animals showed in (A) and (B). (D) Latency to swim over the previous location of the escape platform and (E) Mean time spent in the target quadrant (TQ) during a 60 s probe test carried out 24 h after the last MWM training session for rats that received AMA (50 pmol/side) or VEH in the CA1 region as in (A) and (B). Data are presented as mean \pm SEM. ** $P < 0.05$ and *** $P < 0.005$ vs VEH in Student's t -test;

$n = 8-9$ per group. (F) Schematic drawings taken from the atlas of Paxinos and Watson (1986), showing the infusion sites in dorsal CA1 for the animals presented in A. (G,H) Animals trained in the spatial version of the MWM using the massed training protocol received bilateral intra-CA1 infusions of α -amanitin (50 pmol/side; AMA) or vehicle (VEH) immediately after the last training trial (the arrowheads indicate the moment of drug infusion) and were submitted to a probe test in the absence of the escape platform, either 3 h (G-inset) or 24 h later (H-inset). Data are presented as mean \pm SEM. *** $P < 0.005$ vs. VEH in Student's t -test; $n = 10$ per group. (I) Mean escape latency during two daily eight-trial training sessions in the nonspatial version of the Morris water maze for rats that received either AMA (50 pmol/side) or VEH in the CA1 region of the dorsal hippocampus immediately after the first session. The arrowhead indicates the moment of drug infusion. Data are presented as mean \pm SEM; $n = 8$ per group.

animals that had received intrahippocampal AMA immediately after each training session acquired the spatial preference as consistently as did control animals once the administration of AMA was stopped (not shown). Bilateral intra-CA1 infusion of AMA (50 pmol/side) immediately after training in the MWM

using a massed training protocol (Blum et al., 1999; Zhao et al., 1999; Hebert and Dash, 2002; Morris et al., 2006; Bonini et al., 2007) did not affect spatial memory when tested 3 h after training (Fig. 1G), but blocked retention as evaluated 24-h posttraining ($t_{(18)} = 3.96$, $P < 0.005$; Fig. 1H). These

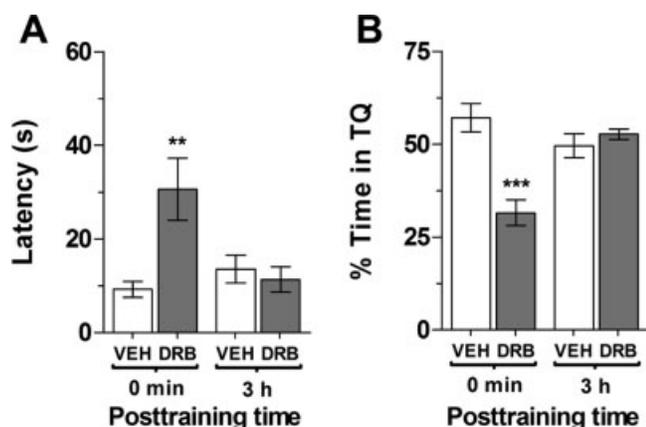


FIGURE 2. Intrahippocampal infusion of DRB blocks long-term spatial memory consolidation. (A) Latency to swim over the previous location of the escape platform and (B) mean time spent in the target quadrant (TQ) during a 60-s probe test in the absence of the escape platform carried out 24 h after the last training session in the MWM (spaced training protocol) for rats that received DRB (20 nmol/side) or VEH in the CA1 region immediately or 3 h after each training session. ** $P < 0.05$ and *** $P < 0.05$ vs. VEH in Student's t -test; $n = 8$ per group.

results indicate that the intrahippocampal administration of AMA does not affect short-term memory but specifically disrupt long-term spatial memory and suggest that the amnesic effect of this drug is not due to impairment of information processing but to a bonafide inhibitory action on memory consolidation. AMA had no effect on memory for the nonspatial version of the MWM task when infused in the CA1 region of the hippocampus immediately after training (Fig. 11).

To further determine whether synthesis of mRNA in dorsal hippocampus is necessary for consolidation of spatial memory, we examined the effect of DRB on retention. Like AMA, DRB reversibly inhibits mRNA synthesis (Sehgal et al., 1976; Tamm, 1977; Chodosh et al., 1989; Clement and Wilkinson, 2000) but has a different mechanism of action (Kedinger et al., 1970; Lindell et al., 1970; De Mercoyrol et al., 1989). As can be seen in Figure 2, DRB (20 nmol/side) also impaired spatial memory consolidation when infused into dorsal CA1 immediately after each training session ($t_{(14)} = 3.14$, $P < 0.05$ for latency to swim over the previous location of the escape platform and $t_{(14)} = 4.96$, $P < 0.005$ for time in target quadrant) but not when given 3-h posttraining.

To investigate whether inhibition of mRNA synthesis after spatial memory retrieval affects persistence of the reactivated trace, rats that had been trained for 5 days in the spatial version of the MWM using the spaced training protocol were submitted to a probe test in the absence of the escape platform 24 h after the last training session. Immediately or 3 h after the probe test, the animals received bilateral infusions of vehicle or AMA (50 pmol/side) in the dorsal hippocampus. Retention was evaluated in a second probe test carried out 24 h or 120 h after the first one. When given immediately after the first probe test, AMA significantly increased the latency to

swim over the previous location of the escape platform ($t_{(14)} = 2.70$, $P < 0.05$ for PT2 24 h after PT1; Fig. 3A and $t_{(14)} = 2.20$, $P < 0.05$ for PT2 120 h after PT1; Fig. 3C) and reduced to chance level the time spent in the target quadrant during the second probe test, regardless of the time elapsed between the two tests ($t_{(14)} = 2.87$, $P < 0.05$ for PT2 24 h after PT1; Fig. 3B and $t_{(14)} = 2.89$, $P < 0.05$ for PT2 120 h after PT1; Fig. 3D); AMA had no effect on retention when infused into CA1 3 h after the first probe test (Figs. 3E–H). Intrahippocampal infusion of AMA (50 pmol/side) following a probe test in the absence of the escape platform performed 24 h after training using the MWM-spaced training protocol did not affect memory retention during a second probe test carried out 3 h later (Fig. 4). This indicates that the amnesia induced by inhibition of hippocampal mRNA synthesis at the time of memory retrieval takes time to hold, suggesting that this effect is not caused by disruption of memory retrieval but is indeed due to impairment of a process that stabilizes the reactivated memory trace. Additionally, AMA did not affect spatial memory when given into dorsal CA1 24 h after the last training session in the absence of a behaviorally relevant event (Fig. 5), or when administered immediately after a test session in the presence of the escape platform carried out 24 h after training (Fig. 6).

As happened with AMA, bilateral infusions of DRB in the dorsal hippocampus (20 nmol/side) immediately (Figs. 7A–D) but not 3 h (Figs. 7E–H) after a probe test performed 24-h posttraining in the absence of the escape platform hindered spatial memory retention during a second probe test carried out either at 24 h ($t_{(14)} = 2.61$, $P < 0.05$ for latency and $t_{(14)} = 3.16$, $P < 0.05$ for time in target quadrant) or 120 h ($t_{(14)} = 3.10$, $P < 0.05$ for latency and $t_{(14)} = 2.43$, $P < 0.05$ for time in target quadrant) after the first one.

DISCUSSION

Our results show that (1) when infused in the dorsal hippocampus immediately but not 3 h after training in the MWM learning task, AMA impairs long-term spatial memory retention without affecting short-term memory. This amnesia was also observed after the administration of DRB, an mRNA synthesis blocker with a different mechanism of action. (2) AMA given in the dorsal hippocampus immediately but not 3 h after a probe test in the absence of the escape platform performed 24-h posttraining hinders spatial memory retention during a second probe test carried out 24 or 120 h later. Intrahippocampal AMA has no effect on retention of the reactivated trace when the second probe test was carried out 3 h after the first one. The amnesic effect of AMA is contingent on the nonreinforced reactivation of the mnemonic trace and is also evident after DRB infusion.

It has been shown that inhibition of mRNA synthesis impairs memory consolidation in different preparations. Most findings indicate the existence of a short critical period begin-

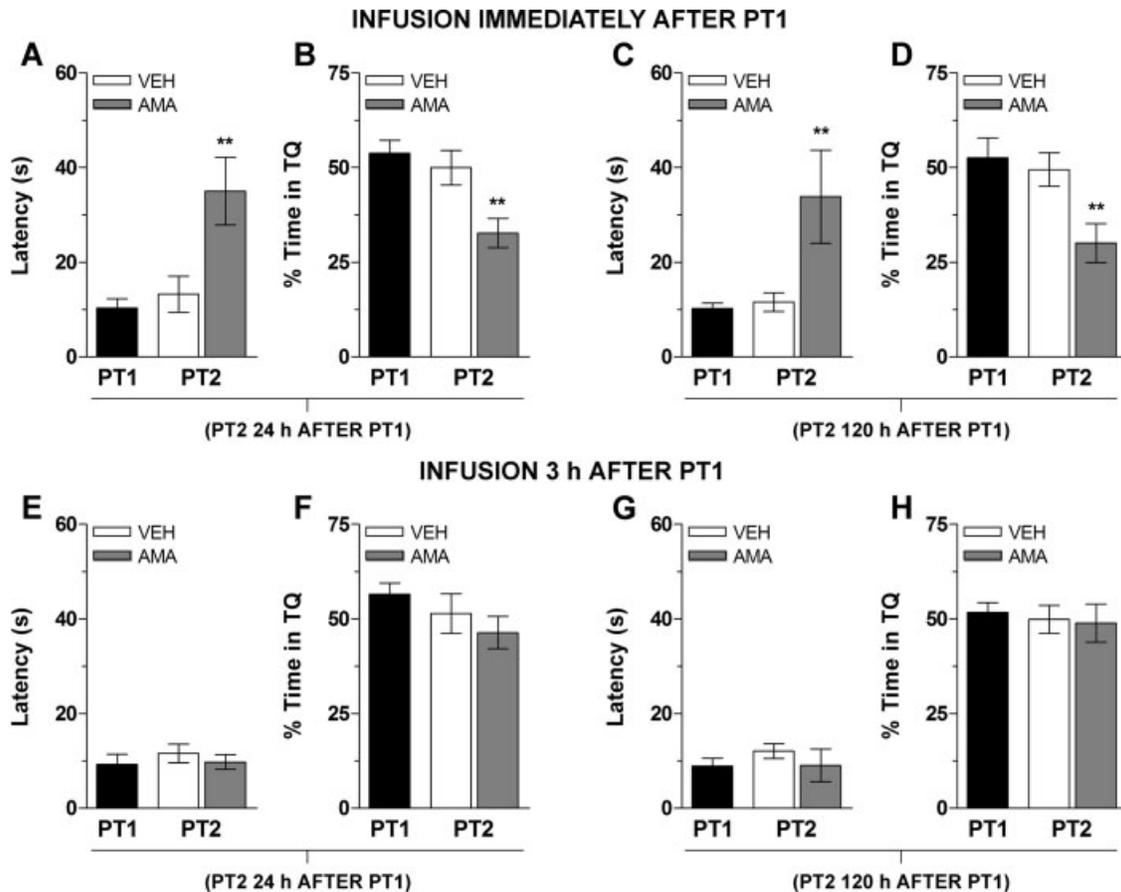


FIGURE 3. Intrahippocampal infusion of AMA immediately but not 3 h after nonreinforced retrieval hinders spatial memory retention as measured 24 h or 120 h after reactivation. Animals with infusion cannulae implanted in the CA1 region of the dorsal hippocampus were trained during 5 days in the spatial version of the MWM using the spaced training protocol. Twenty-four hours after the last training session, the animals were randomly assigned to one out of four experimental groups and submitted to a 60-s probe test in the absence of the escape platform (PT1). Immedi-

ately (A–D) or 3 h after PT1 (E–H) the animals received intrahippocampal infusions of α -amanitin (50 pmol/side; AMA) or vehicle (VEH). Memory retention was assessed in a second 60-s probe test (PT2) carried out 24 h (A, B, E, and F) or 120 h after PT1 (C, D, G, and H). Data are expressed as mean (\pm SEM) of the latency to swim over the previous location of the escape platform (A, C, E, and G) or as the percentage of swimming time spent in the target quadrant (TQ; B, D, F, and H). ** $P < 0.05$ vs. VEH during PT2; $n = 8$ per group.

ating right after training (Ohi, 1977; Strocchi et al., 1977; Rainbow, 1979; Pedreira et al., 1996; Crow et al., 1997; Lin et al., 2003; Fulton et al., 2005; Watanabe et al., 2005), although some reports also point to a second phase of sensitivity of memory to gene expression inhibition between 3- and 6-h posttraining (Igaz et al., 2002). In agreement with previous reports showing that spatial memory is disrupted after acute suppression of c-AMP-responsive element binding protein (CREB)-mediated gene transcription (Pittenger et al., 2002) and findings indicating that training in the MWM induces the rapid expression of several genes in different areas of the brain (Meiri et al., 1997; Venero et al., 2004; Aguilar-Valles et al., 2007), including the hippocampus (Guzowski et al., 2000; Cavallaro et al., 2002; Leil et al., 2003; Hou et al., 2004; Kim et al., 2004; Pascale et al., 2004), our experiments with two pharmacologically different mRNA synthesis blockers indicate that retention of long-term spatial memory requires gene expression in the dorsal hippocampus during a narrow time

window that begins right after training and lasts less than 3 h. This fact, together with the observation that inhibition of hippocampal mRNA synthesis does not affect short-term spatial memory or long-term nonspatial memory in the MWM, demonstrates that the amnesic effect of AMA and DRB is not due to disruption of hippocampal functionality, to an unspecific blockade of information processing, or to impaired motor/perceptual performance but to a true inhibitory action on memory consolidation.

Substantial evidence indicates that consolidated memories become again susceptible to disruption after nonreinforced retrieval and suggests that, to persist, the reactivated memory trace must undergo a restabilization process referred to as reconsolidation (Sara, 2000; Nader, 2003; Eisenberg and Dudai, 2004; Lee et al., 2004). A widely recognized property of memory reconsolidation is its requirement for protein synthesis in the same areas of the brain as consolidation. In this respect, we have recently shown that consolidation and reconso-

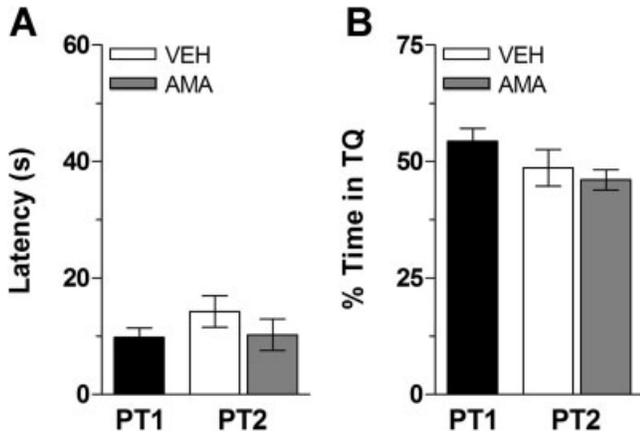


FIGURE 4. Intrahippocampal infusion of AMA immediately after nonreinforced retrieval does not affect spatial memory retention as measured 3 h after reactivation. Animals with infusion cannulae implanted in the CA1 region of the dorsal hippocampus were trained during 5 days in the spatial version of the MWM using the spaced training protocol. Twenty-four hours after the last training session, the animals were submitted to a 60-s probe test in the absence of the escape platform (PT1). Immediately after PT1, the animals received intrahippocampal infusions of α -amanitine (50 pmol/side; AMA) or vehicle (VEH). Memory retention was assessed in a second 60-s probe test (PT2) carried out 3 h after PT1. Data are expressed as mean (\pm SEM) of the latency to swim over the previous location of the escape platform (A) or as the percentage of swimming time spent in the target quadrant (TQ; B). $n = 8$ per group.

lidation of spatial memory require protein synthesis in the CA1 region of the hippocampus (Rossato et al., 2006). However, a key question that remains open concerning consolidation and reconsolidation is whether or not these processes share the same biochemical mechanisms. In particular, the dependence of reconsolidation on gene transcription is still a matter of debate. Reports using the general RNA synthesis blocker actinomycin D, both in vertebrate (Lee et al., 2004) and in invertebrate

preparations (Sangha et al., 2003), suggest that RNA synthesis is indeed necessary for memory reconsolidation. Nonetheless, the interpretation of these previous reports has been somehow complicated by the fact that they employed either a dose of actinomycin D able to produce irreversible lesions (Gomi et al., 1999; Lee et al., 2004) or reactivation protocols involving a retrieval session that included presentation of the original unconditioned stimulus and hence acted not just as a memory reactivation session but, more likely, as a retraining session. In the present report we overcame these methodological issues by using two pharmacologically different agents that specifically block RNA polymerase II-mediated transcription together with a behavioral protocol involving the nonreinforced reactivation of the original spatial trace. Moreover, with the proper control experiments, we ruled out the possibility that the impairment in retention caused by AMA and DRB given after memory reactivation was due to an unspecific or deleterious effect of this drug on performance. In fact, we found that the amnesic action of intra-CA1 AMA and DRB was time-dependent, was only seen after memory retrieval in the absence of the escape platform and lasted for several days, all of which suggests that it is not caused by a delayed inhibitory effect able to obliterate further retrieval but to inhibition of a process that operates to stabilize the reactivated trace. Contrary to our findings, some groups have reported that mRNA synthesis inhibition following memory reactivation has no effect on memory persistence. In particular, it has been shown that intrahippocampal infusion of CCAAT enhancer-binding protein β antisense oligonucleotides hinders inhibitory avoidance memory consolidation, but has no effect on subsequent retention when given after nonreinforced retrieval (Taubenfeld et al., 2001) and, recently, it has been suggested that reconsolidation of fear conditioning memory does not require mRNA synthesis in the amygdala (Parsons et al., 2006). In this respect, it must be bear in mind that these two experiments were carried out using either an avoidance learning task producing a memory trace that does not undergo

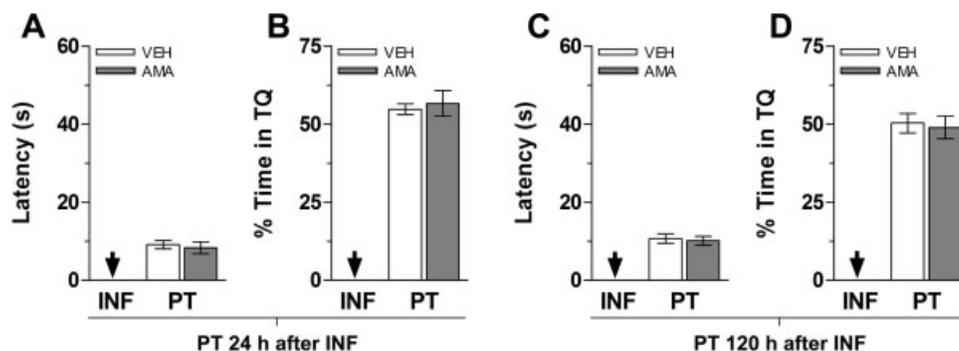


FIGURE 5. Late posttraining inhibition of hippocampal gene expression in the absence of relevant behavioral stimuli does not affect retention of long-term spatial memory. Animals with infusion cannulae implanted in the CA1 region of the dorsal hippocampus were trained during 5 days in the spatial version of the MWM using the spaced training protocol. Twenty-four hours after the last training session the animals received bilateral intrahippo-

campal infusions (INF) of AMA (50 pmol/side) or VEH. Memory retention was assessed in a 60-s probe test (PT) carried out 24 h (A and B) or 120 h after INF (C and D). Data are expressed as mean (\pm SEM) of the latency to swim over the previous location of the escape platform (A and C) or as the mean percentage time swimming in the target quadrant (TQ; B and D); $n = 8$ per group. The arrowheads indicate the moment of infusion.

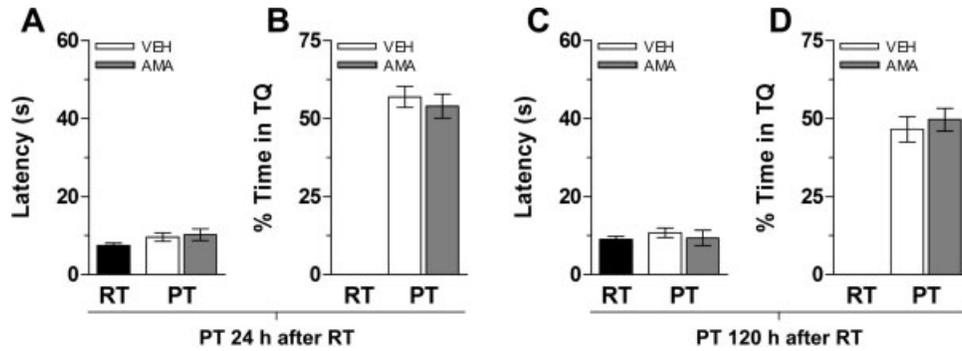


FIGURE 6. Inhibition of hippocampal gene expression immediately after a reinforced retrieval test does not affect subsequent retention of long-term spatial memory. Animals with infusion cannulae implanted in the CA1 region of the dorsal hippocampus were trained during 5 days in the spatial version of the MWM using the spaced training protocol. Twenty-four hours after the last training session the animals were submitted to a retraining test (RT) in the presence of the escape platform and immediately after

that received bilateral intrahippocampal infusions of AMA (50 pmol/side) or VEH. Memory retention was assessed in a probe test in the absence of the escape platform (PT) carried out at 24 h (A and B) or 120 h after RT (C and D). Data are expressed as mean (\pm SEM) of the latency to swim over the previous location of the escape platform (A and C) or of the swimming time spent in the target quadrant (TQ; B and D); $n = 8$ per group.

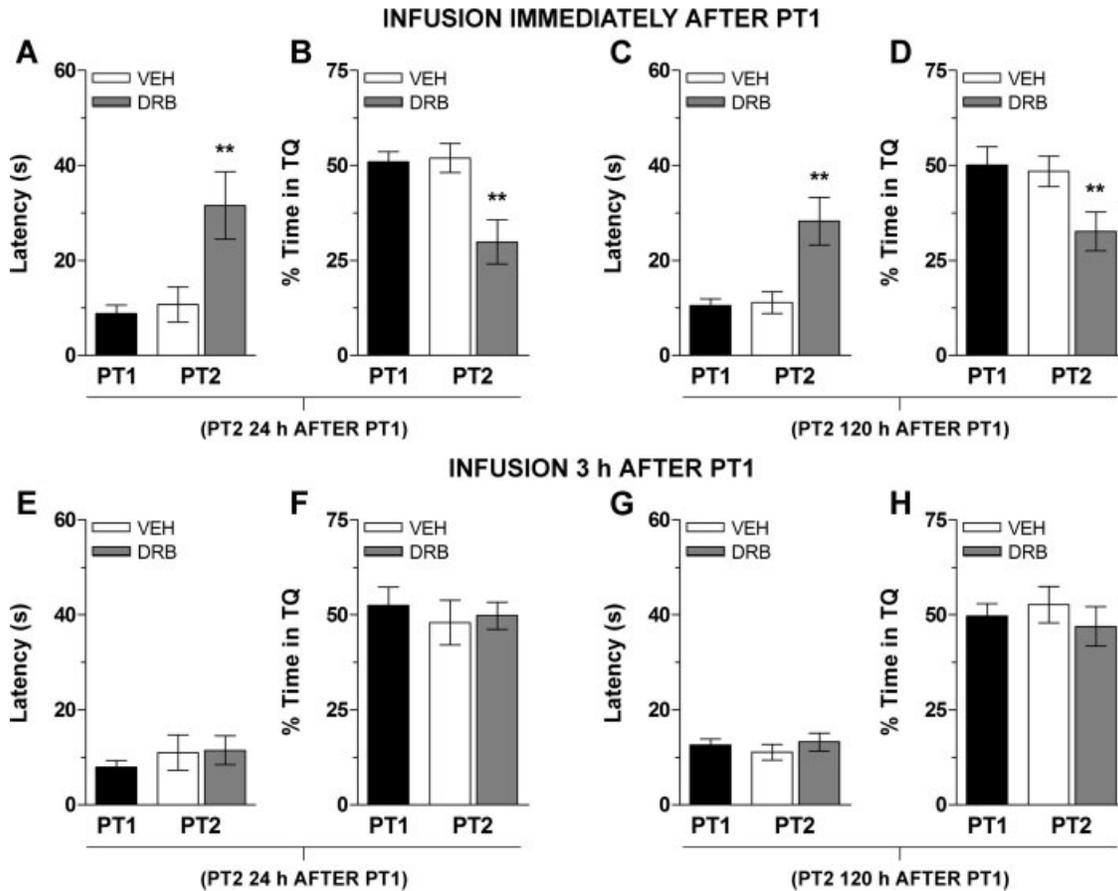


FIGURE 7. Intrahippocampal infusion of DRB immediately but not 3 h after nonreinforced retrieval hinders retention of long-term spatial memory. Animals with infusion cannulae implanted in the CA1 region of the dorsal hippocampus were trained during 5 days in the spatial version of the MWM using the spaced training protocol. Twenty-four hours after the last training session the animals were randomly assigned to one out of four experimental groups and submitted to a 60-s probe test in the absence of the escape platform (PT1). Immediately (A–D) or 3 h after PT1 (E–

H) the animals received bilateral intrahippocampal infusions of DRB (20 nmol/side) or vehicle (VEH). Memory retention was assessed in a second 60-s probe test (PT2) carried out 24 h (A, B, E and F) or 120 h after PT1 (C, D, G, and H). Data are expressed as mean (\pm SEM) of the latency to swim over the previous location of the escape platform (A, C, E, and G) or as the percentage of swimming time spent in the target quadrant (TQ; B, D, F, and H). ** $P < 0.05$ vs. VEH during PT2; $n = 8$ per group.

protein synthesis-dependent reconsolidation (Taubenfeld et al., 2001; Cammarota et al., 2003, 2004, 2005a) or a reminder session that, because of its length, precluded the unambiguous distinction between reconsolidation and memory extinction (Lee et al., 2006), an inhibitory process also induced by non-reinforced retrieval that prevents expression of the original fear-conditioning memory through a mechanism requiring the functional participation of the amygdala (Santini et al., 2001; Herry and Mons, 2004; Barad et al., 2006; Berlau and McGaugh, 2006).

Does reconsolidation involve recapitulation of molecular events that occurred during initial consolidation? And, if it indeed does so, which are the genes whose expression is required in the hippocampus for the normal proceeding of these two processes? It is now clear that reconsolidation is not a second round of consolidation or entails further consolidation of the original mnemonic trace (Alberini, 2005; Dudai, 2006; Boccia et al., 2006; Bucherelli et al., 2006). Despite this, several lines of evidence indicate that consolidation and reconsolidation use similar signaling pathways in the same areas of the brain. For example, the well-documented requirement for NMDA receptors during the early stages of memory consolidation (Morris et al., 1986; Rickard et al., 1994; Riedel et al., 2003; Tronel and Sara, 2003; Bevilaqua et al., 2005; Izquierdo et al., 2006; Robbins and Murphy, 2006) has also been reported during reconsolidation of different types memory in vertebrate (Przybylski and Sara, 1997; Summers et al., 1997; Torras-Garcia et al., 2005) and invertebrate species (Pedreira et al., 2002; Rose and Rankin, 2006). Activation of ERK1/2-mediated signaling in the amygdala was described during consolidation and reconsolidation (Duvarci et al., 2005) and a late phase of sensitivity to β -adrenergic drugs has also been found for both processes (Roulet and Sara, 1998; Przybylski et al., 1999; Sara et al., 1999; Sara, 2000). A common property of all these signaling pathways is that they modulate the activation state of a variety of transcription factors including, notably, CREB. CREB phosphorylation is a key event during memory consolidation (Dash et al., 1990; Bernabeu et al., 1997; Guzowski and McGaugh, 1997), and it has been recently shown that activation of this protein is essential for the stability of auditory and contextual fear memories after retrieval, suggesting that the induction of CREB-mediated transcription also plays an important role during postretrieval stabilization. Additional studies are in due course to unravel the participation of this transcription factor in spatial memory reconsolidation.

At this stage, a cautionary remark is mandatory. Although the study of reconsolidation has been extended to several animal species and different learning tasks, reconsolidation hypotheses are still controversial. In fact, several laboratories (Hernandez and Kelley, 2004; Blum et al., 2006; Power et al., 2006; Yim et al., 2006), including ours (Cammarota et al., 2003, 2004), have failed to disrupt retention of some types of memories after retrieval, or have found that the disruption is only transitory (Anokhin et al., 2002; Lattal and Abel, 2004; Prado-Alcala et al., 2006) fuelling the debate on the causes and consequences of postreactivation amnesia. In the case of this

report, although a possible damaging effect of AMA and DRB on hippocampal functionality was discarded with suitable experiments, it is true that we cannot conclusively reject the possibility that the amnesia induced by the postretrieval administration of mRNA synthesis blockers represents just a prolonged, but anyhow temporary performance effect. Methodological constraints inherent to the task and to survival of cannulated animals prevented us from evaluating memory retrieval at longer periods than those we reported.

An alternative explanation for our results is that the amnesia induced by AMA and DRB given after memory reactivation is due to facilitation of extinction. As reconsolidation, extinction is also initiated by nonreinforced retrieval, and it is expressed as a reduction in the probability of emission of a previously learned response. However, extinction is currently understood as an active learning process (Quirk, 2002; Susuki et al., 2004; Bouton et al., 2006; Myers and Davis, 2007), an hypothesis supported by several reports indicating the dependence of extinction on NMDA and AMPA receptors (Falls et al., 1992; Baker and Azorlosa, 1996; Mead et al., 1999; Walker and Davis, 2002; Mao et al., 2006; Burgos-Robles et al., 2007; Zushida et al., 2007), protein synthesis (Santini et al., 2004; Cammarota et al., 2005b; Runyan and Dash, 2005; Akirav et al., 2006; Berger-Sweeney et al., 2006; Bevilaqua et al., 2006), and gene expression (Cammarota et al., 2003; Herry and Mons, 2004; Lattal et al., 2006; Bredy et al., 2007) in different areas of the brain. Taking this into account, it is hard to envisage how mRNA synthesis inhibitors could possibly enhance a process that, if something, they should be expected to block.

REFERENCES

- Aguilar-Valles A, Sanchez E, de Gortari P, Garcia-Vazquez AI, Ramirez-Amaya V, Bermudez-Rattoni F, Joseph-Bravo P. 2007. The expression of TRH, its receptors and degrading enzyme is differentially modulated in the rat limbic system during training in the Morris water maze. *Neurochem Int* 50:404–417.
- Akirav I, Khatsrinov V, Vouimba RM, Merhav M, Ferreira G, Rosenblum K, Maroun M. 2006. Extinction of conditioned taste aversion depends on functional protein synthesis but not on NMDA receptor activation in the ventromedial prefrontal cortex. *Learn Mem* 13:254–258.
- Alberini CM. 2005. Mechanisms of memory stabilization: Are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends Neurosci* 28:51–56.
- Anokhin KV, Tiunova AA, Rose SP. 2002. Reminder effects—Reconsolidation or retrieval deficit? Pharmacological dissection with protein synthesis inhibitors following reminder for a passive-avoidance task in young chicks. *Eur J Neurosci* 15:1759–1765.
- Baker JD, Azorlosa JL. 1996. The NMDA antagonist MK-801 blocks the extinction of Pavlovian fear conditioning. *Behav Neurosci* 110:618–620.
- Baldi E, Efoudebe M, Lorenzini CA, Bucherelli C. 2005. Spatial navigation in the Morris water maze: Working and long lasting reference memories. *Neurosci Lett* 378:176–180.
- Barad M, Gean PW, Lutz B. 2006. The role of the amygdala in the extinction of conditioned fear. *Biol Psychiatry* 60:322–328.

- Berger-Sweeney J, Zearfoss NR, Richter JD. 2006. Reduced extinction of hippocampal-dependent memories in CPEB knockout mice. *Learn Mem* 13:4–7.
- Berlau DJ, McGaugh JL. 2006. Enhancement of extinction memory consolidation: The role of the noradrenergic and GABAergic systems within the basolateral amygdala. *Neurobiol Learn Mem* 86:123–132.
- Bernabeu R, Bevilacqua L, Ardenghi P, Bromberg E, Schmitz P, Bianchin M, Izquierdo I, Medina JH. 1997. Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:7041–7046.
- Bevilacqua LR, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. 2005. Memory consolidation induces *N*-methyl-D-aspartic acid-receptor- and Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II-dependent modifications in α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor properties. *Neuroscience* 136:397–403.
- Bevilacqua LR, Bonini JS, Rossato JI, Izquierdo LA, Cammarota M, Izquierdo I. 2006. The entorhinal cortex plays a role in extinction. *Neurobiol Learn Mem* 85:192–197.
- Blum S, Moore AN, Adams F, Dash PK. 1999. A mitogen-activated protein kinase cascade in the CA1/CA2 subfield of the dorsal hippocampus is essential for long-term spatial memory. *J Neurosci* 9:3535–3544.
- Blum S, Hebert AE, Dash PK. 2006. A role for the prefrontal cortex in recall of recent and remote memories. *Neuroreport* 17:341–344.
- Bocchia MM, Blake MG, Acosta GB, Baratti CM. 2006. Post-retrieval effects of icv infusions of hemicholinium in mice are dependent on the age of the original memory. *Learn Mem* 13:376–381.
- Bonini JS, Da Silva WC, Bevilacqua LR, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. 2007. On the participation of hippocampal PKC in acquisition, consolidation and reconsolidation of spatial memory. *Neuroscience* 147:37–45.
- Bouton ME, Westbrook RF, Corcoran KA, Maren S. 2006. Contextual and temporal modulation of extinction: behavioral and biological mechanisms. *Biol Psychiatry* 60:352–360.
- Bredy TW, Wu H, Crego C, Zellhoefer J, Sun YE, Barad M. 2007. Histone modifications around individual BDNF gene promoters in prefrontal cortex are associated with extinction of conditioned fear. *Learn Mem* 14:268–276.
- Bucherelli C, Baldi E, Mariottini C, Passani MB, Blandina P. 2006. Aversive memory reactivation engages in the amygdala only some neurotransmitters involved in consolidation. *Learn Mem* 13:426–430.
- Bures J, Fenton AA, Kaminsky Y, Zinyuk L. 1997. Place cells and place navigation. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:343–350.
- Burgos-Robles A, Vidal-Gonzalez I, Santini E, Quirk GJ. 2007. Consolidation of fear extinction requires NMDA receptor-dependent bursting in the ventromedial prefrontal cortex. *Neuron* 53:871–880.
- Cammarota M, Bevilacqua LR, Kerr D, Medina JH, Izquierdo I. 2003. Inhibition of mRNA and protein synthesis in the CA1 region of the dorsal hippocampus blocks reinstatement of an extinguished conditioned fear response. *J Neurosci* 23:737–741.
- Cammarota M, Bevilacqua LR, Medina JH, Izquierdo I. 2004. Retrieval does not induce reconsolidation of inhibitory avoidance memory. *Learn Mem* 11:572–578.
- Cammarota M, Bevilacqua LR, Barros DM, Vianna MR, Izquierdo LA, Medina JH, Izquierdo I. 2005a. Retrieval and the extinction of memory. *Cell Mol Neurobiol* 25:465–474.
- Cammarota M, Bevilacqua LR, Rossato JI, Ramirez M, Medina JH, Izquierdo I. 2005b. Relationship between short- and long-term memory and short- and long-term extinction. *Neurobiol Learn Mem* 84:25–32.
- Cavallaro S, D'Agata V, Manickam P, Dufour F, Alkon DL. 2002. Memory-specific temporal profiles of gene expression in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:16279–16284.
- Chodosh LA, Fire A, Samuels M, Sharp PA. 1989. 5,6-Dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole inhibits transcription elongation by RNA polymerase II in vitro. *J Biol Chem* 264:2250–2257.
- Clement JQ, Wilkinson MF. 2000. Rapid induction of nuclear transcripts and inhibition of intron decay in response to the polymerase II inhibitor DRB. *J Mol Biol* 299:1179–1191.
- Commins S, Cunningham L, Harvey D, Walsh D. 2003. Massed but not spaced training impairs spatial memory. *Behav Brain Res* 139:215–223.
- Crow T, Siddiqi V, Dash PK. 1997. Long-term enhancement but not short-term in *Hermisenda* is dependent upon mRNA synthesis. *Neurobiol Learn Mem* 68:343–350.
- Dash PK, Hochner B, Kandel ER. 1990. Injection of the cAMP-responsive element into the nucleus of *Aplysia* sensory neurons blocks long-term facilitation. *Nature* 345:718–721.
- De Hoz L, Martin SJ, Morris RG. 2004. Forgetting, reminding, and remembering: The retrieval of lost spatial memory. *PLoS Biol* 2:E225.
- De Mercoyrol L, Job C, Job D. 1989. Studies on the inhibition by α -amanitin of single-step addition reactions and productive RNA synthesis catalysed by wheat-germ RNA polymerase II. *Biochem J* 258:165–169.
- Dudai Y. 2006. Reconsolidation: The advantage of being refocused. *Curr Opin Neurobiol* 16:174–178.
- Duvarci S, Nader K, LeDoux JE. 2005. Activation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase cascade in the amygdala is required for memory reconsolidation of auditory fear conditioning. *Eur J Neurosci* 21:283–289.
- Eisenberg M, Dudai Y. 2004. Reconsolidation of fresh, remote, and extinguished fear memory in Medaka: Old fears don't die. *Eur J Neurosci* 20:3397–3403.
- Falls WA, Miserendino MJ, Davis M. 1992. Extinction of fear-potentiated startle: Blockade by infusion of an NMDA antagonist into the amygdala. *J Neurosci* 12:854–863.
- Fulton D, Kemenes I, Andrew RJ, Benjamin PR. 2005. A single time-window for protein synthesis-dependent long-term memory formation after one-trial appetitive conditioning. *Eur J Neurosci* 21:1347–1358.
- Gomi H, Sun W, Finch CE, Itoharu S, Yoshimi K, Thompson RF. 1999. Learning induces a CDC2-related protein kinase, KKIAMRE. *J Neurosci* 19:9530–9537.
- Guzowski JF, McGaugh JL. 1997. Antisense oligodeoxynucleotide-mediated disruption of hippocampal cAMP response element binding protein levels impairs consolidation of memory for water maze training. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:2693–2698.
- Guzowski JF, Lyford GL, Stevenson GD, Houston FP, McGaugh JL, Worley PF, Barnes CA. 2000. Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *J Neurosci* 20:3993–4001.
- Hall J, Thomas KL, Everitt BJ. 2001. Cellular imaging of zif268 expression in the hippocampus and amygdala during contextual and cued fear memory retrieval: Selective activation of hippocampal CA1 neurons during the recall of contextual memories. *J Neurosci* 21:2186–2193.
- Hebert AE, Dash PK. 2002. Extracellular signal-regulated kinase activity in the entorhinal cortex is necessary for long-term spatial memory. *Learn Mem* 9:156–166.
- Hernandez PJ, Kelley AE. 2004. Long-term memory for instrumental responses does not undergo protein synthesis-dependent reconsolidation upon retrieval. *Learn Mem* 11:748–754.
- Herry C, Mons N. 2004. Resistance to extinction is associated with impaired immediate early gene induction in medial prefrontal cortex and amygdala. *Eur J Neurosci* 20:781–790.
- Hou Q, Gao X, Zhang X, Kong L, Wang X, Bian W, Tu Y, Jin M, Zhao G, Li B, Jing N, Yu L. 2004. SNAP-25 in hippocampal CA1 region is involved in memory consolidation. *Eur J Neurosci* 20:1593–1603.

- Igaz LM, Vianna MR, Medina JH, Izquierdo I. 2002. Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. *J Neurosci* 22:6781–6789.
- Izquierdo I, Bevilacqua LR, Rossato JI, Bonini JS, Medina JH, Cammarota M. 2006. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends Neurosci* 29:496–505.
- Kedinger C, Gniazdowski M, Mandel JL Jr, Gissinger F, Chambon P. 1970. α -Amanitin: A specific inhibitor of one of two DNA-dependent RNA polymerase activities from calf thymus. *Biochem Biophys Res Commun* 38:165–171.
- Kida S, Josselyn AS, de Ortiz SP, Kogan JH, Chevere I, Masushige S, Silva AJ. 2002. CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. *Nat Neurosci* 5:348–355.
- Kim IH, Park SK, Sun W, Kang Y, Kim HT, Kim H. 2004. Spatial learning enhances the expression of inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase A in the hippocampal formation of rat. *Brain Res Mol Brain Res* 124:12–19.
- Kogan JH, Frankland PW, Blendy JA, Coblenz J, Marowitz Z, Schutz G, Silva AJ. 1997. Spaced training induces normal long-term memory in CREB mutant mice. *Curr Biol* 7:1–11.
- Lattal KM, Abel T. 2004. Behavioral impairments caused by injections of the protein synthesis inhibitor anisomycin after contextual retrieval reverse with time. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:4667–4672.
- Lattal KM, Radulovic J, Lukowiak K. 2006. Extinction: Does it or doesn't it? The requirement of altered gene activity and new protein synthesis. *Biol Psychiatry* 60:344–351.
- Lee JL, Everitt BJ, Thomas KL. 2004. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science* 304:839–843.
- Lee JL, Milton AL, Everitt BJ. 2006. Reconsolidation and extinction of conditioned fear: Inhibition and potentiation. *J Neurosci* 26:10051–10056.
- Leil TA, Ossadachi A, Nichols TE, Leahy RM, Smith DJ. 2003. Genes regulated by learning in the hippocampus. *J Neurosci Res* 71:763–768.
- Lin CH, Yeh SH, Lu HY, Gean PW. 2003. The similarities and diversities of signal pathways leading to consolidation of conditioning and consolidation of extinction of fear memory. *J Neurosci* 23:8310–8317.
- Lindell TJ, Weinberg F, Morris PW, Roeder RG, Rutter WJ. 1970. Specific inhibition of nuclear RNA polymerase II by α -amanitin. *Science* 170:447–449.
- Mao SC, Hsiao YH, Gean PW. 2006. Extinction training in conjunction with a partial agonist of the glycine site on the NMDA receptor erases memory trace. *J Neurosci* 26:8892–8899.
- McGaugh JL. 1966. Time-dependent processes in memory storage. *Science* 153:1351–1358.
- Mead AN, Vasilaki A, Spyraiki C, Duka T, Stephens DN. 1999. AMPA-receptor involvement in c-fos expression in the medial prefrontal cortex and amygdala dissociates neural substrates of conditioned activity and conditioned reward. *Eur J Neurosci* 11:4089–4098.
- Meiri N, Rosenblum K. 1998. Lateral ventricle injection of the protein synthesis inhibitor anisomycin impairs long-term memory in a spatial memory task. *Brain Res* 789:48–55.
- Meiri N, Ghelardini C, Tesco G, Galeotti N, Dahl D, Tomic D, Cavallaro S, Quattrone A, Capaccioli S, Bartolini A, Alkon DL. 1997. Reversible antisense inhibition of Shaker-like Kv1.1 potassium channel expression impairs associative memory in mouse and rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:4430–4434.
- Merlo E, Freudenthal R, Maldonado H, Romano A. 2005. Activation of the transcription factor NF- κ B by retrieval is required for long-term memory reconsolidation. *Learn Mem* 12:23–29.
- Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M. 1986. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319:774–776.
- Morris RG, Inglis J, Ainge JA, Olverman HJ, Tulloch J, Dudai Y, Kelly PA. 2006. Memory reconsolidation: Sensitivity of spatial memory to inhibition of protein synthesis in dorsal hippocampus during encoding and retrieval. *Neuron* 50:479–489.
- Myers KM, Davis M. 2007. Mechanisms of fear extinction. *Mol Psychiatry* 12:120–150.
- Nader K. 2003. Memory traces unbound. *Trends Neurosci* 26:65–72.
- Nader K, Schafe GE, Le Doux JE. 2000. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* 406:722–726.
- Ohi S. 1977. Effects of actinomycin D on brain RNA synthesis and discrimination learning in the goldfish (*Carassius auratus*). *Physiol Behav* 19:261–264.
- Parsons RG, Gafford GM, Baruch DE, Riedner BA, Helmstetter FJ. 2006. Long-term stability of fear memory depends on the synthesis of protein but not mRNA in the amygdala. *Eur J Neurosci* 23:1853–1859.
- Pascale A, Gusev PA, Amadio M, Dottorini T, Govoni S, Alkon DL, Quattrone A. 2004. Increase of the RNA-binding protein HuD and posttranscriptional up-regulation of the GAP-43 gene during spatial memory. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:1217–1222.
- Pedreira ME, Dimant B, Maldonado H. 1996. Inhibitors of protein and RNA synthesis block context memory and long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Pharmacol Biochem Behav* 54:611–617.
- Pedreira ME, Perez-Cuesta LM, Maldonado H. 2002. Reactivation and reconsolidation of long-term memory in the crab *Chasmagnathus*: Protein synthesis requirement and mediation by NMDA-type glutamatergic receptors. *J Neurosci* 22:8305–8311.
- Pittenger C, Huang YY, Palezki RF, Bourchouladze R, Scanlin H, Vronskaya S, Kandel ER. 2002. Reversible inhibition of CREB/ATF transcription factors in region CA1 of the dorsal hippocampus disrupts hippocampus-dependent spatial memory. *Neuron* 34:447–462.
- Power AE, Berlau DJ, McGaugh JL, Steward O. 2006. Anisomycin infused into the hippocampus fails to block “reconsolidation” but impairs extinction: The role of re-exposure duration. *Learn Mem* 13:27–34.
- Prado-Alcala RA, Diaz del Guante MA, Garin-Aguilar ME, Diaz-Trujillo A, Quirarte GL, McGaugh JL. 2006. Amygdala or hippocampus inactivation after retrieval induces temporary memory deficit. *Neurobiol Learn Mem* 86:144–149.
- Przybylski J, Sara SJ. 1997. Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behav Brain Res* 84:241–246.
- Przybylski J, Rouillet P, Sara SJ. 1999. Attenuation of emotional and nonemotional memories after their reactivation: Role of β adrenergic receptors. *J Neurosci* 19:6623–6628.
- Quirk GJ. 2002. Memory for extinction of conditioned fear is long-lasting and persists following spontaneous recovery. *Learn Mem* 9:402–407.
- Rainbow TC. 1979. Role of RNA and protein synthesis in memory formation. *Neurochem Res* 4:297–312.
- Redish AD, Touretzky DS. 1998. The role of the hippocampus in solving the Morris water maze. *Neural Comput* 10:73–111.
- Rickard NS, Poot AC, Gibbs ME, Ng KT. 1994. Both non-NMDA and NMDA glutamate receptors are necessary for memory consolidation in the day-old chick. *Behav Neural Biol* 62:33–40.
- Riedel G, Platt B, Micheau J. 2003. Glutamate receptor function in learning and memory. *Behav Brain Res* 140:1–47.
- Robbins TW, Murphy ER. 2006. Behavioural pharmacology: 40+ years of progress, with a focus on glutamate receptors and cognition. *Trends Pharmacol Sci* 27:141–148.
- Rose JK, Rankin CH. 2006. Blocking memory reconsolidation reverses memory-associated changes in glutamate receptor expression. *J Neurosci* 26:11582–11587.

- Rossato JI, Bevilacqua LR, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. 2006. Retrieval induces hippocampal-dependent reconsolidation of spatial memory. *Learn Mem* 13:431–440.
- Roullet P, Sara S. 1998. Consolidation of memory after its reactivation: Involvement of β noradrenergic receptors in the late phase. *Neural Plast* 6:63–68.
- Runyan JD, Dash PK. 2005. Inhibition of hippocampal protein synthesis following recall disrupts expression of episodic-like memory in trace conditioning. *Hippocampus* 15:333–339.
- Sangha S, Scheibenstock A, Lukowiak K. 2003. Reconsolidation of a long-term memory in *Lymnaea* requires new protein and RNA synthesis and the soma of right pedal dorsal 1. *J Neurosci* 23:8034–8040.
- Santini E, Muller RU, Quirk GJ. 2001. Consolidation of extinction learning involves transfer from NMDA-independent to NMDA-dependent memory. *J Neurosci* 21:9009–9017.
- Santini E, Ge H, Ren K, Pena de Ortiz S, Quirk GJ. 2004. Consolidation of fear extinction requires protein synthesis in the medial prefrontal cortex. *J Neurosci* 24:5704–5710.
- Sara SJ. 2000. Retrieval and reconsolidation: Toward a neurobiology of remembering. *Learn Mem* 7:73–84.
- Sara SJ, Roullet P, Przybyslawski J. 1999. Consolidation of memory for odor-reward association: β -Adrenergic receptor involvement in the late phase. *Learn Mem* 6:88–96.
- Schimanski LA, Nguyen PV. 2004. Multidisciplinary approaches for investigating the mechanisms of hippocampus-dependent memory: A focus on inbred mouse strains. *Neurosci Biobehav Rev* 28:463–483.
- Sehgal PB, Darnell JE Jr, Tamm I. 1976. The inhibition by DRB (5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole) of hnRNA and mRNA production in HeLa cells. *Cell* 9:473–480.
- Spreng M, Rossier J, Schenk F. 2002. Spaced training facilitates long-term retention of place navigation in adult but not in adolescent rats. *Behav Brain Res* 128:103–108.
- Strocchi P, Montanaro N, Dall'olio R. 1977. Effect of α -amanitin on brain RNA and protein synthesis and on retention of avoidance conditioning. *Pharmacol Biochem Behav* 6:433–437.
- Summers MJ, Crowe SF, Ng KT. 1997. Administration of DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid (AP5) induces transient inhibition of reminder-activated memory retrieval in day-old chicks. *Brain Res Cogn Brain Res* 5:311–321.
- Suzuki A, Josselyn SA, Frankland PW, Masushige S, Silva AJ, Kida S. 2004. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J Neurosci* 24:4787–4795.
- Tamm I. 1977. Definition of subclasses of nucleoplasmic RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5011–5015.
- Taubenfeld SM, Milekic MH, Monti B, Alberini CM. 2001. The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBP β . *Nat Neurosci* 4:813–818.
- Torras-Garcia M, Lelong J, Tronel S, Sara SJ. 2005. Reconsolidation after remembering an odor-reward association requires NMDA receptors. *Learn Mem* 12:18–22.
- Tronel S, Sara SJ. 2003. Blockade of NMDA receptors in prelimbic cortex induces an enduring amnesia for odor-reward associative learning. *J Neurosci* 23:5472–5476.
- Tronson NC, Taylor JR. 2007. Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nat Rev Neurosci* 8:262–275.
- Venero C, Tilling T, Hermans-Borgmeyer I, Herrero AI, Schachner M, Sandi C. 2004. Water maze learning and forebrain mRNA expression of the neural cell adhesion molecule L1. *J Neurosci Res* 75:172–181.
- Walker DL, Davis M. 2002. The role of amygdala glutamate receptors in fear learning, fear-potentiated startle, and extinction. *Pharmacol Biochem Behav* 71:379–392.
- Watanabe H, Takaya T, Shimoi T, Ogawa H, Kitamura Y, Oka K. 2005. Influence of mRNA and protein synthesis inhibitors on the long-term memory acquisition of classically conditioned earthworms. *Neurobiol Learn Mem* 83:151–157.
- Yim AJ, Moraes CR, Ferreira TL, Oliveira MG. 2006. Protein synthesis inhibition in the basolateral amygdala following retrieval does not impair expression of morphine-associated conditioned place preference. *Behav Brain Res* 171:162–169.
- Zhao W, Chen H, Xu H, Moore E, Meiri N, Quon MJ, Alkon DL. 1999. Brain insulin receptors and spatial memory. Correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. *J Biol Chem* 274:34893–34902.
- Zushida K, Sakurai M, Wada K, Sekiguchi M. 2007. Facilitation of extinction learning for contextual fear memory by PEPA: A potentiator of AMPA receptors. *J Neurosci* 27:158–166.

CAPÍTULO 4: CONSIDERAÇÕES GERAIS

Nossos resultados mostram que:

1) Quando a amanitina é infundida bilateralmente no hipocampo dorsal de ratos imediatamente após cada uma das sessões de treino na tarefa do LAM, a amanitina prejudica a retenção da memória espacial de longa duração, sem afetar a memória de curta duração. O mesmo não ocorre quando a infusão de amanitina é feita 3 horas após cada sessão de treino. Também não há prejuízo no desempenho dos ratos quando se utiliza um protocolo de aprendizado não-espacial [Fig 1 do artigo].

2) O efeito prejudicial sobre a consolidação da memória espacial de longa duração verificado no item anterior também é verificado quando infunde-se DRB bilateralmente no hipocampo dorsal de ratos imediatamente após cada uma das sessões de treino na tarefa do LAM. Igualmente, o mesmo não ocorre quando a infusão de DRB é feita 3 horas após cada sessão de treino [Fig 2 do artigo]. O DRB é um inibidor da síntese de mRNA com mecanismo de ação diferente do da amanitina.

Isso indica fortemente que o efeito prejudicial observado sobre a consolidação da memória espacial de longa duração foi causado pela inibição da transcrição gênica no hipocampo dorsal de ratos, e não devido a um outro efeito farmacológico de cada um desses fármacos que não a inibição da transcrição gênica. Também fica evidente que esse efeito é tempo-específico, e que a consolidação de uma memória espacial de longa duração em ratos possui pelo menos uma janela temporal de sensibilidade à inibição hipocampal de transcrição gênica, que se inicia imediatamente após a aquisição, e termina em algum momento antes de 3 horas após o início da aquisição.

Como a amanitina não afeta a memória espacial de curta duração, fica evidente que apenas a retenção da memória espacial de longa duração requer síntese hipocampal de mRNA, e também que amanitina, na dose empregada neste trabalho, não perturba a funcionalidade hipocampal, visto que a expressão da memória de curta duração necessita que o hipocampo esteja funcional [Rolls, 2000]. Também fica claro que não houve qualquer efeito prejudicial da amanitina sobre a atividade locomotora ou perceptual dos ratos, visto que ambos os grupos de animais, infundidos ou com amanitina ou com salina, apresentaram o mesmo desempenho em uma versão não-espacial de treino no LAM.

3) Quando a amanitina é infundida bilateralmente no hipocampo dorsal de ratos imediatamente após uma sessão única de teste sem a presença da plataforma de escape, realizada 24 horas a última sessão de treino na tarefa do LAM, a amanitina prejudica a retenção da memória espacial de longa duração, aferida em uma segunda sessão única de teste realizada 24 horas ou 120 horas após a primeira sessão de teste. Este efeito não ocorre quando a infusão de amanitina é feita 3 horas após a primeira sessão única de teste [Fig 3 do artigo].

4) O efeito prejudicial sobre a reconsolidação da memória espacial de longa duração verificado no item anterior também é verificado quando infunde-se DRB ao invés de amanitina [Fig 7 do artigo].

5) A infusão intra-hipocampal de amanitina não teve efeito sobre a retenção do traço mnemônico reativado quando a segunda sessão de teste foi realizada 3 horas após a primeira [Fig 4 do artigo].

6) Não houve efeito sobre a retenção do traço mnemônico aferido em uma sessão de teste realizada 24 ou 120 após apenas a infusão bilateral intra-hipocampal de

amanitina realizada 24 horas após a última sessão de treino, sem a realização neste dia de uma sessão de teste [Fig 5 do artigo].

7) A infusão intra-hipocampal de amanitina não teve efeito sobre a retenção do traço mnemônico reativado quando a segunda sessão de teste realizada 24 ou 120 após a primeira sessão de teste, quando esta primeira sessão de teste ocorreu com a presença da plataforma de escape [Fig 6 do artigo].

Assim como na consolidação, o efeito prejudicial da inibição da transcrição gênica tanto pela amanitina quanto pelo DRB sobre a retenção de uma memória espacial de longa duração após sua reativação é tempo-específico, e que a reconsolidação de uma memória espacial de longa duração em ratos possui pelo menos uma janela temporal de sensibilidade à inibição de transcrição gênica, que se inicia imediatamente após a evocação, e termina em algum momento antes de 3 horas após o início desta evocação.

Como o efeito amnésico da amanitina sobre a retenção do traço mnemônico não foi verificado 3 horas após sua reativação, mais uma vez fica claro que a amanitina não perturbou a funcionalidade hipocampal, na dose empregada neste trabalho.

Por fim, o efeito amnésico da amanitina sobre a retenção do traço mnemônico logo após sua evocação só ocorre se a infusão intra-hipocampal for contingente com esta reativação não reforçada do traço mnemônico. A simples infusão de amanitina sem a realização do teste não teve efeito sobre a retenção do traço mnemônico, desta forma descartando a possibilidade de estar havendo um efeito tardio da amanitina sobre a consolidação deste traço, o que estaria mascarado nos experimentos em que uma sessão única de teste precedia a infusão de amanitina. Também não houve efeito sobre a retenção do traço mnemônico quando a infusão de amanitina ocorreu após a realização do

teste com a plataforma de escape presente. Este achado sugere que a reativação de um traço mnemônico já consolidado só se torna sensível a inibição de transcrição gênica se houver alguma mudança no contexto da reativação em relação ao contexto de aprendizado, neste caso a ausência da plataforma de escape, que estava presente no mesmo local durante todos os dias de treino. Isto pode ser útil como um mecanismo que permitiria a atualização em nível celular da resposta dos neurônios componentes da rede neural que subjaz o traço mnemônico, tornando possível modificá-lo de forma a torná-lo mais adaptável as diferentes exigências ambientais de comportamento ao longo do tempo.

Em suma, esses resultados indicam fortemente que tanto a consolidação quanto a reconsolidação de uma memória espacial de longa duração em ratos é dependente de transcrição gênica no hipocampo dorsal, e que o desencadeamento destes processos dependentes de transcrição gênica ocorre imediatamente após a aquisição, no caso da consolidação, ou após a evocação da informação sem presença de reforço, no caso da reconsolidação.