

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**A consolidação da memória da tarefa de esquiva inibitória requer a  
atividade da p38MAPK na amígdala basolateral**

**Cristiano André Köhler**

**Orientador: Prof. Dr. Iván Antonio Izquierdo**

Tese de Doutorado

2012

### CIP - Catalogação na Publicação

Köhler, Cristiano André

A consolidação da memória da tarefa de esquiva inibitória requer a atividade da p38MAPK na amígdala basolateral / Cristiano André Köhler. -- 2012.  
55 f.

Orientador: Iván Antonio Izquierdo.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. memória. 2. p38MAPK. 3. amígdala basolateral. 4. consolidação. 5. esquiva inibitória. I. Izquierdo, Iván Antonio, orient. II. Título.

Dedico esta tese aos meus pais, Omar e Clotilde, e à minha irmã Karen.

Seu apoio incondicional tornou tudo isto possível.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo o apoio e ensinamentos que formaram meu caráter e personalidade. À minha irmã, à minha tia Marilda e meus primos, pelo apoio que se tornaram imprescindíveis na minha vida.

Ao Prof. Martin Cammarota, que se tornou meu grande exemplo científico. Embora não oficial, foi o orientador deste trabalho.

À Profa. Lia Bevilaqua e Profa. Janine Rossato, pelo apoio e ajuda na execução do projeto.

Ao Prof. Iván Izquierdo, pela oportunidade concedida.

À Profa. Márcia Lorena Fagundes Chaves, pelos ensinamentos e pela participação junto ao PPGCM.

Aos meus grandes amigos que fiz no laboratório, Juliana e Weber: mesmo distantes, nossa amizade persiste.

Aos colegas de laboratório que colaboraram em distintas fases deste projeto, especialmente Lucas, Jociane, Andressa, Ramón e Natália.

À Maria Ângela, técnica do Centro de Memória que ajudou no cuidado com os animais.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da FAMED-UFRGS, pela oportunidade. Agradecimento especial para a Vera Ribeiro, que nunca mediu esforços para orientar e auxiliar nas tarefas administrativas envolvidas com o curso.

A CAPES, pelo suporte financeiro.

A todos, muito obrigado.

**Cristiano André Köhler**

## LISTA DE ABREVIATÖES

<b>Arc</b>	– proteína associada ao citoesqueleto regulada pela atividade
<b>AB</b>	– núcleo basal acessório da amígdala
<b>AHA</b>	– área amígdalo-hipocampal
<b>AMPA</b>	– ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
<b>AMPC</b>	– adenosina monofosfato cíclico
<b>B</b>	– núcleo basal da amígdala
<b>BLA</b>	– núcleo basolateral da amígdala
<b>CaMKII</b>	– proteína-quinase dependente de calmodulina tipo II
<b>CREB</b>	– ligante do elemento responsivo ao AMPC
<b>DUSP10</b>	– fosfatase de especificidade dupla 10
<b>DUSP16</b>	– fosfatase de especificidade dupla 16
<b>EI</b>	– esquiva inibitória
<b>EIk1</b>	– fator de transcriçãõ semelhante ao E26(ETS) tipo 1
<b>GABA</b>	– ácido gama-aminobutírico
<b>JNK</b>	– quinase da extremidade N-terminal do fator c-Jun
<b>JNK-MAPK</b>	– MAPK da família JNK
<b>LA</b>	– núcleo lateral da amígdala
<b>LTD</b>	– depressãõ de longa duraçãõ
<b>LTM</b>	– memória de longa duraçãõ

- LTP** – potenciação de longa duração
- MAPK** – proteína-quinase ativada por mitógenos
- MAPKK** – quinase da MAPK
- MAPKKK** – quinase da quinase da MAPKK
- MKK3** – MAPKK 3 (MAPKK específica para a p38MAPK)
- MKK6** – MAPKK 6 (MAPKK específica para a p38MAPK)
- MSK** – quinase ativada por estresse ou mitógenos
- NMDA** – N-metil-D-aspartato
- p38MAPK** – MAPK da família p38
- PKA** – proteína-quinase dependente de AMPc
- PKC** – proteína-quinase dependente de cálcio
- PKG** – proteína-quinase dependente de GMPc
- RSK** – quinase ribossomal S6
- STM** – memória de curta duração

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>8</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1. A consolidação da memória e sua modulação pela amígdala.....</b>	<b>12</b>
<b>2.2. Papel da via de sinalização da proteína-quinase ativada por mitógenos         (MAPK) na consolidação da memória .....</b>	<b>17</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1. Objetivo geral.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2. Objetivos específicos .....</b>	<b>23</b>
<b>4. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>25</b>
<b>5. ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>31</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>54</b>

## RESUMO

A consolidação da memória da tarefa de esquiva inibitória (EI) requer a ativação de uma série de vias de sinalização intracelular com intuito de provocar modificações duradouras ao nível sináptico, as quais são responsáveis pela estabilização do traço mnemônico. Sabe-se que a amígdala basolateral (BLA), através de mecanismos que envolvem a liberação de noradrenalina, participa ativamente na modulação deste processo. A p38MAPK é uma enzima da família das proteína-quinases ativadas por mitógeno (MAPK) que participa de várias respostas neurofisiológicas ao estresse. Entretanto, seu papel nos mecanismos de plasticidade sináptica e no aprendizado de tarefas aversivas foi pouco estudado. O presente trabalho investiga a participação da p38MAPK na BLA no processo de consolidação da tarefa de EI em ratos adultos. A infusão do inibidor SB203580 na BLA imediatamente, mas não 180 minutos após o treinamento, impediu de uma maneira dose-dependente a formação da memória de longa duração, mas não da memória de curta duração, sem afetar a funcionalidade da amígdala, a locomoção ou a ansiedade. A infusão do seu análogo inativo SB202474 não teve efeito. O treino na EI também induziu um aumento rápido e transitório na fosforilação da p38MAPK na BLA, a qual foi revertida pela administração do antagonista dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos timolol, de uma maneira dose-dependente. Estes resultados indicam que a ativação da p38MAPK é essencial para a consolidação normal da tarefa de EI, sendo este processo controlado pelo sistema noradrenérgico na BLA.



## ABSTRACT

Memory consolidation associated with learning the step-down inhibitory avoidance (IA) task requires the activation of several signaling pathways in order to promote the lasting stabilization of the memory trace. It is well known that basolateral amygdala (BLA) modulates this process through noradrenergic mechanisms that are active in this structure. p38MAPK, a member of the mitogen activated protein kinases (MAPK) mediates several neurophysiological responses to stress. However, the role of this kinase in synaptic plasticity and fear-motivated learning has seldom been analyzed. The present study explores the participation of BLA p38MAPK in IA memory consolidation in adult male rats. Infusion of the p38MAPK inhibitor SB203580 into BLA immediately, but not 180 min after training, impaired long-term memory (LTM) in a dose-dependent manner without affecting short-term memory or BLA functionality. The SB203580 inactive analog SB202474 had no effect whatsoever on IA memory. IA training was accompanied by the rapid phosphorylation of p38MAPK in the BLA, which is  $\beta$ -adrenergic receptor-dependent. Our results indicate that activation of p38MAPK is essential for the normal consolidation of avoidance long-term memory and suggest that this process is controlled by the noradrenergic system in the BLA.

## 1. INTRODUÇÃO

O aprendizado é o processo resultante da interação do indivíduo com o meio (através de seus sistemas sensoriais) ou de representações internas (cognição, emoção), que possibilita tanto a aquisição de novas habilidades ou informações, como o estabelecimento de novas relações com aquilo que já foi previamente aprendido. Ele confere ao indivíduo a capacidade de modificar seu comportamento em consequência da prática ou da experiência (Izquierdo, 2002; Squire e Kandel, 2003).

A memória, por sua vez, compreende o conjunto de mecanismos que operam no sistema nervoso central (SNC) para que o aprendizado ocorra, e que levam, em última instância, ao estabelecimento de um traço duradouro (engrama). Este representa a unidade informacional relacionada a um aprendizado específico. Tais mecanismos operam em sequência, e correspondem às diferentes fases da memória. A primeira é a fase de aquisição, onde toda informação relacionada a um traço particular é reunida através dos sistemas sensoriais ou introspecção. Após a aquisição, estas informações devem ser codificadas e armazenadas, o que constitui a fase de consolidação. Como resultado, é estabelecido o engrama. Por fim, enquanto permanecerem armazenadas, as informações consolidadas podem ser acessadas, o que constitui a fase de evocação, e representa o ato de lembrar (McGaugh, 2000; Abel e Lattal, 2001).

Neste ponto, é importante ressaltar que nem todas as informações que chegam ao SNC são armazenadas permanentemente. A grande maioria não passa da fase de aquisição, e aquelas que iniciam o processo de consolidação podem não ser efetivamente retidas, dependendo de como esta fase é modulada. O estado de alerta, o estresse e a emoção atuam como filtros, tanto na aquisição como na consolidação, efetuando esta seleção. Por fim, muitas das memórias que são consolidadas acabam sendo esquecidas, especialmente aquelas que raramente são lembradas, de modo

que o esquecimento atua como filtro final. Deste modo, o SNC é capaz de formar e reter apenas as memórias que são consideradas relevantes dentro do contexto no qual o indivíduo está inserido (Izquierdo, 2002; Squire e Kandel, 2003).

As memórias podem ser classificadas utilizando-se diferentes critérios, sendo que os dois principais são o conteúdo ou a duração. De acordo com o conteúdo, as memórias são divididas em declarativas (também chamadas explícitas) ou procedurais (também chamadas implícitas). As memórias declarativas requerem a consciência para sua expressão, ao contrário das procedurais, que são inconscientes (Izquierdo, 2002; Squire e Kandel, 2003).

As memórias declarativas podem ser divididas em episódicas ou semânticas, de acordo com o tipo de informação que armazenam. As primeiras referem-se a eventos e acontecimentos importantes que ocorreram durante a vida do indivíduo (por exemplo, fatos marcantes durante a faculdade ou a festa de formatura), enquanto as últimas referem-se aos conhecimentos e informações generalizadas acerca do mundo (por exemplo, aquilo que foi aprendido nas disciplinas durante o curso de graduação). As estruturas cerebrais envolvidas no processamento da memória declarativa incluem o hipocampo e outras regiões do córtex cerebral. As memórias procedurais, por sua vez, correspondem aos hábitos e habilidades motoras (por exemplo, os movimentos necessários para realizar uma sutura durante uma cirurgia). As estruturas cerebrais onde ocorre o processamento deste tipo de memória são distintas daquelas necessárias para as memórias declarativas, e incluem a amígdala, os núcleos da base e o cerebelo (Izquierdo, 2002; Squire e Kandel, 2003).

De acordo com a sua duração, as memórias são divididas em três categorias: 1) memória de trabalho, que corresponde àquela que dura de segundos a poucos minutos, apenas para manter a informação ativa enquanto esta é preparada para ser codificada; 2) memória de curta duração (STM), que dura de minutos a

poucas horas, e funciona como uma memória temporária, permanecendo ativa apenas durante o tempo necessário para que a 3) memória de longa-duração (LTM), que dura horas, dias ou anos, seja formada em sua forma final. A STM e a LTM requerem as mesmas estruturas cerebrais, onde existem simultaneamente durante a fase de consolidação. Porém, os mecanismos responsáveis por cada uma são separados (Izquierdo, 2002).

Para a elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos nos processos de memória, tem-se empregado modelos animais baseados no aprendizado de tarefas comportamentais simples, geralmente utilizando roedores como sujeitos experimentais. Um modelo amplamente utilizado consiste na tarefa de esquiiva inibitória (EI), onde o animal, geralmente um rato, aprende que ao descer de uma plataforma recebe um choque. Este aprendizado requer um único treino e envolve a repressão específica da tendência natural dos ratos para explorar o ambiente além da plataforma (Izquierdo et al., 1998; Izquierdo et al., 2006). Assim, este paradigma comportamental é útil por permitir a separação de cada uma das fases da memória mencionadas acima, bem como a diferenciação entre STM e LTM. A combinação destas características com o emprego de ferramentas que possibilitam a manipulação dos mecanismos bioquímicos que operam em áreas cerebrais específicas possibilitou o avanço no conhecimento sobre o processo de consolidação (Izquierdo et al., 1998; Izquierdo et al., 2006).

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1. A consolidação da memória e sua modulação pela amígdala**

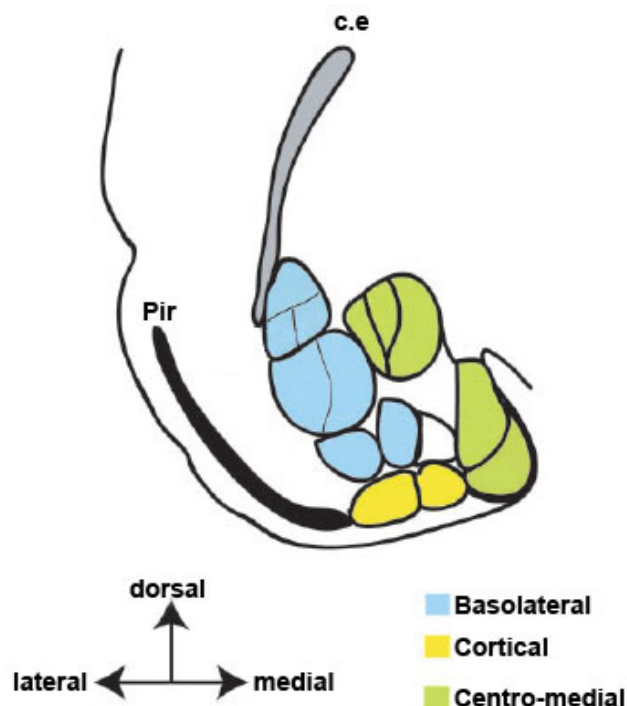
A consolidação é o processo responsável pela estabilização da memória após sua aquisição (McGaugh, 1966). Os mecanismos operantes durante a consolidação possibilitam que a memória passe de um estado lábil (STM) para um estado permanente (LTM) (Dudai, 1996; McGaugh, 2000). Os processos envolvidos na formação da LTM associada com a tarefa de EI no rato já estão bem estabelecidos. Resumidamente, o glutamato, atuando através de receptores NMDA, AMPA e metabotrópicos, induz um aumento nos níveis intracelulares de cálcio, que leva à ativação de várias vias de sinalização intracelular, as quais induzem a expressão gênica e a síntese de novas proteínas. Como resultado final deste processo, há o estabelecimento de modificações duradouras na morfologia e composição das sinapses dos neurônios envolvidos no aprendizado (Davis e Squire, 1984; Izquierdo e Medina, 1997; Lamprecht e LeDoux, 2004). Os eventos bioquímicos do processo de consolidação ocorrem de maneira sequencial e transitória em diversas áreas cerebrais, incluindo o hipocampo, córtex entorrinal e a amígdala. Esta última, por sua vez, possui um papel central na formação das memórias aversivas (Izquierdo e Medina, 1997; Izquierdo et al., 2006).

A amígdala é uma estrutura composta de aproximadamente 13 núcleos principais (constituindo o complexo amigdalóide), os quais são distinguidos em função da sua citoarquitetura, histoquímica e conexões (Krettek e Price, 1978; Petrovich et al., 2001). De acordo com o esquema de classificação mais recente (McDonald, 1998; Sah et al., 2003), os núcleos componentes da amígdala são separados em três grupos: 1) grupo profundo ou basolateral, que inclui os núcleos laterais, basais, e basal acessório; 2) grupo superficial, que inclui os núcleos corticais e núcleo do trato olfatório; e 3) o grupo centromedial, composto pelos núcleos mediais e centrais. Por

fim, os demais núcleos compõem uma categoria separada, pois não são facilmente classificados dentro de um desses critérios. Estes são as massas celulares intercaladas e a área amígdalo-hipocampal (AHA). Existem extensas conexões internucleares e intranucleares (Sah et al., 2003). A Figura 1 resume a distribuição anatômica destes três principais grupos no cérebro do rato.

O complexo basolateral consiste no núcleo lateral (LA), núcleo basal (B), e o núcleo basal acessório (AB). Costuma-se referir ao núcleo lateral e basal conjuntamente, como núcleo basolateral, enquanto o núcleo basal acessório é denominado núcleo basomedial. O LA está localizado dorsalmente na amígdala, e suas porções mais ventrais estão adjacentes ao núcleo basal. Ele é delimitado lateralmente pela cápsula externa e medialmente pelo núcleo central. O núcleo basal está localizado ventral ao LA, e o AB está localizado adjacente à AHA e ventral ao núcleo basal. Detalhes das subdivisões e interconexões entre os diferentes núcleos podem ser encontrados em revisões extensas dedicadas ao tema (Sah et al., 2003). Neste trabalho, ao utilizarmos a denominação amígdala basolateral (BLA), estaremos nos referindo ao núcleo basolateral (LA+B).

As aferências para a amígdala são separadas em dois grandes grupos: o primeiro compreende projeções corticais e do hipocampo, que fornecem informações provenientes de áreas sensoriais e dos sistemas de memória. O segundo compreende projeções do tronco cerebral e hipotálamo, e estão relacionadas com comportamento e sistemas autonômicos (Sah et al., 2003). A maior fonte de informação sensorial é o córtex cerebral, cujos neurônios piramidais da camada V atingem toda a amígdala através da cápsula externa, e transmitem informações uni ou polimodais provenientes de áreas associativas (Ottersen et al., 1986; Amaral e Insausti, 1992; Mascagni et al., 1993).



**Figura 1.** Principais subdivisões do complexo amigdalóide no rato e distribuição anatômica. *c.e* = cápsula externa, *Pir* = córtex piriforme (Sah et al., 2003).

Já as projeções que trazem informações das áreas relacionadas com os processos de memória se originam nos córtices perirrinal, entorrinal e parahipocampal, e no hipocampo (Milner et al., 1998). Projeções entre a amígdala e estas áreas são recíprocas e extensas (McDonald, 1998). A subdivisão medial da LA recebe a maioria das projeções provenientes do córtex perirrinal, embora estas também se estendam aos núcleos basal e cortical (Shi e Cassell, 1999). O córtex entorrinal possui uma projeção mais difusa, atingindo a maioria dos núcleos do complexo (McDonald e Mascagni, 1997). Por fim, aferências do hipocampo são provenientes da região subicular e possuem o núcleo basal como principal alvo (Canteras e Swanson, 1992).

As eferências oriundas da amígdala atingem todo o córtex cerebral, bem como as regiões hipotalâmicas e o tronco cerebral. O complexo basolateral (LA, B, AB) possui uma importante projeção para os sistemas de memória localizados no lobo

temporal medial, inervando o hipocampo e córtex perirrinal (Petrovich et al., 2001), e outra para o núcleo *accumbens* (McDonald, 1991). Estas projeções são glutamatérgicas e se originam de neurônios semelhantes aos neurônios piramidais corticais (Pare et al., 1995). O complexo central, por sua vez, emite projeções para o hipotálamo e tronco cerebral. De um modo geral, o complexo basolateral confere valor afetivo aos estímulos sensoriais que chegam através das aferências. Esta informação é processada localmente e, então, transmitida para o núcleo central, que é responsável por mediar respostas autonômicas e sinais comportamentais do medo (Sah et al., 2003).

O possível envolvimento da amígdala nos processos de aprendizado e memória foi sugerido após a avaliação do efeito de lesões cerebrais que envolvem esta estrutura, há mais de seis décadas (Weiskrantz, 1956). Entretanto, as primeiras evidências surgiram ao demonstrar-se que o aprendizado de uma tarefa aversiva é prejudicado após a estimulação elétrica da amígdala (Goddard, 1964; Kesner e Wilburn, 1974). Mais recentemente, empregou-se a infusão de fármacos na amígdala para investigar seu envolvimento na consolidação da memória. De um modo geral, a amígdala é responsável por mediar os efeitos que estímulos emocionalmente salientes ou estressantes possuem sobre a consolidação da memória (Izquierdo, 2002; Squire e Kandel, 2003).

Sabe-se que os estímulos aversivos ativam vários sistemas hormonais relacionados com o estresse (como os glicocorticóides e adrenalina), que atuam na amígdala modificando a liberação de vários neurotransmissores. Destes, o principal é a noradrenalina (Ma e Morilak, 2005; Morilak et al., 2005), que é liberada localmente a partir dos terminais axonais dos neurônios localizados no *locus coeruleus* e no núcleo do trato solitário (McIntyre et al., 2003; McGaugh, 2004). Estudos farmacológicos demonstraram que a transmissão noradrenérgica possui, de fato, papel central na mediação dos efeitos da amígdala sobre a consolidação da memória (Ma e Morilak,



2005). Assim, a infusão de antagonistas dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos após o treino prejudica o desempenho na tarefa de esquiva inibitória, o que foi revertido pela administração de noradrenalina (Ellis et al., 1983; Ellis e Kesner, 1983). Interessante ressaltar que tais efeitos não parecem ser devido a um efeito sobre a aquisição ou evocação (McGaugh e Petrinovich, 1965; McGaugh, 2004), sugerindo que as infusões intra-amígdala afetam especificamente a consolidação da memória (McGaugh, 1989; McGaugh, 2000). De fato, a demonstração de que outros tratamentos afetam a retenção da LTM, mas não da STM (Bianchin et al., 1999; Schafe e LeDoux, 2000; Barros et al., 2002), e que o treino na tarefa de esquiva inibitória induz um aumento transitório na liberação de noradrenalina, num período de tempo coincidente com a janela temporal da consolidação (McIntyre et al., 2003; McGaugh, 2004), indicam uma modulação seletiva da amígdala sobre este processo.

Ao nível celular, a noradrenalina liberada na amígdala atua tanto sobre receptores  $\alpha$ -adrenérgicos quanto  $\beta$ -adrenérgicos, que por sua vez exercem seus efeitos intracelulares através da modificação nos níveis de AMPc. Outros sistemas de neurotransmissores, como acetilcolina e glutamato atuam em um ponto posterior nas vias de sinalização induzidas pela ativação dos receptores adrenérgicos. Por fim, glicocorticóides e GABA induzem um aumento na liberação de noradrenalina a partir dos terminais axonais de neurônios noradrenérgicos, ou potencializam as respostas intracelulares iniciadas nos neurônios da amígdala a partir desta liberação (McIntyre et al., 2003; McGaugh, 2004).

Estes efeitos da amígdala sobre a consolidação da memória parecem ser exercidos seletivamente pela sua subdivisão basolateral. A consolidação é modulada pela ativação ou bloqueio pós-treino dos receptores NMDA ou AMPA da BLA (Rubin et al., 2001; Bonini et al., 2003), ao contrário do núcleo central adjacente, onde manipulações não parecem ter nenhum efeito significativo sobre a consolidação (Tomaz et al., 1992; Parent e McGaugh, 1994; Da Cunha et al., 1999). Assim, mesmo

infusões relativamente grandes dentro da amígdala (i.e., > 0,2  $\mu$ l, como utilizado nos trabalhos mais antigos, com volumes chegando até 1,0  $\mu$ l) provavelmente influenciam seletivamente a BLA, apesar de a difusão estender-se para vários núcleos componentes do complexo amigdalóide.

Uma das interpretações possíveis de todos estes achados é que estas manipulações descritas na amígdala afetam o processo de consolidação próprio desta estrutura. Entretanto, evidências mais recentes sugerem que a amnésia é resultado da modulação que a amígdala exerce sobre o processo de consolidação que ocorre em outras estruturas, já que a variação das condições de estímulo elétrico ou tratamento farmacológico possibilita tanto a facilitação quanto o prejuízo na tarefa de esQUIVA inibitória (Gold e Van Buskirk, 1975), e lesões da *stria terminalis* (uma das principais vias eferentes da amígdala) revertem a amnésia provocada pela estimulação elétrica (Liang e McGaugh, 1983) ou fármacos (McGaugh, 2004). Por fim, manipulações na amígdala são capazes de alterar a indução da LTP no hipocampo (McIntyre et al., 2003; McGaugh, 2004), uma forma de plasticidade sináptica que pode estar envolvida no processo de formação da LTM.

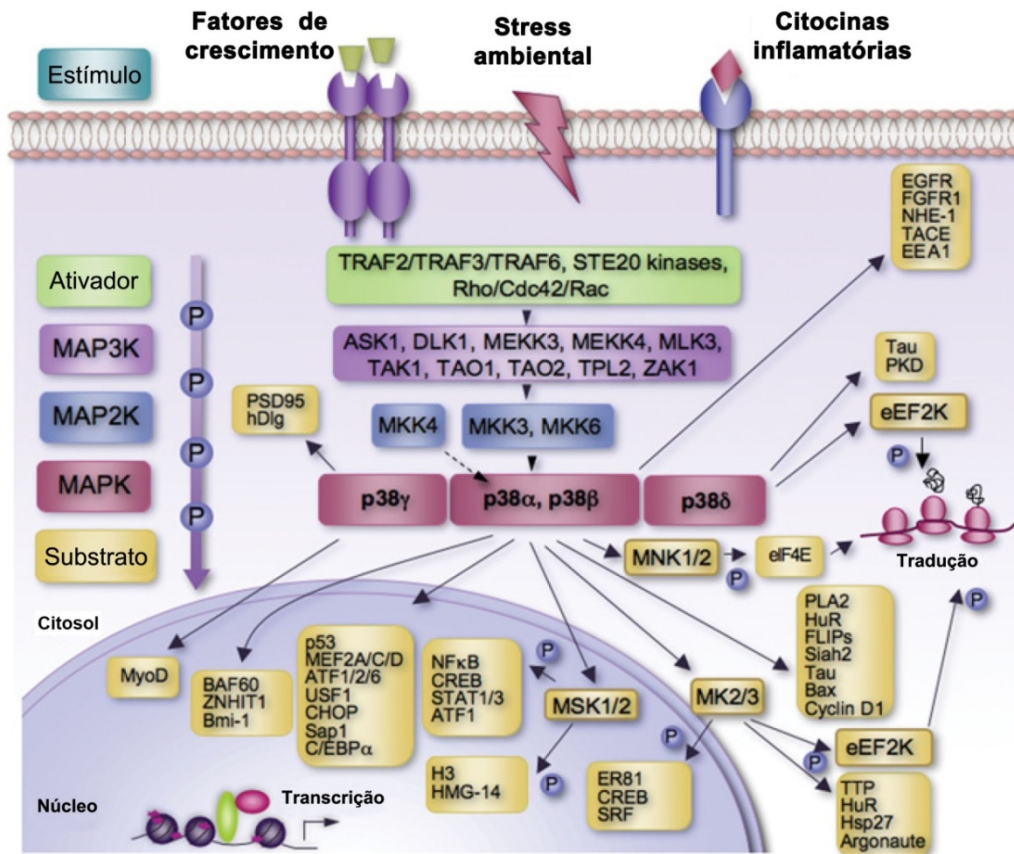
## **2.2. Papel da via de sinalização da proteína-quinase ativada por mitógenos (MAPK) na consolidação da memória**

A fosforilação de proteínas é uma das modificações pós-traducionais mais comuns que as células utilizam para responder aos estímulos extracelulares e para regular a função de várias proteínas, possuindo um papel importante nos processos de plasticidade sináptica e memória (Sweatt, 2001a). Trata-se de uma reação reversível, mediada por um tipo de enzima denominada quinase, a qual é definida em função do tipo de mensageiro que provoca sua ativação. As principais famílias de quinases que participam no processo de consolidação da memória da EI incluem a PKA, PKC, PKG, CaMKII e MAPK. Suas ações principais incluem ativação de fatores de transcrição

como CREB e a indução de genes imediatos (*c-fos*, *zif268*), controlando, dessa forma, a síntese proteica (Sweatt, 2001a).

Os membros da família da proteína-quinase ativada por mitógenos (MAPK, do inglês *mitogen activated protein kinases*) possuem um papel importante em diversos processos celulares. Três grandes famílias de MAPKs foram bem caracterizadas: a quinase regulada por sinais extracelulares (ERK), p38MAPK e JNK-MAPK (Johnson e Lapadat, 2002; Kumar et al., 2003; Cuadrado e Nebreda, 2010). As cascatas de sinalização destas vias caracterizam-se pela presença de três quinases que atuam de maneira sequencial: MAP quinase quinase quinase (MAPKKK) → MAP quinase quinase (MAPKK) → MAP quinase (MAPK) (Johnson e Lapadat, 2002). As MAPKKKs são serina/treonina quinases que, quando ativadas, fosforilam e ativam a próxima quinase na cadeia, a MAPKK. MAPKKs são quinases de dupla especificidade, que fosforilam ambos resíduos de treonina e tirosina nas MAPKs, resultando na sua ativação. Estas, por sua vez, são serina/treonina quinases que, quando ativadas, fosforilam um grande número de substratos na célula, incluindo vários fatores de transcrição e outras quinases. Já foram identificados vários membros dentro de cada família de MAPK (Widmann et al., 1999).

A p38MAPK possui quatro isoformas (p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  e p38 $\delta$ ), sendo a p38 $\alpha$  a isoforma mais comum. Ela é ativada através da fosforilação dupla na treonina 180 e tirosina 182 através de uma MAPKK imediatamente acima na sua via de sinalização, denominada MAP2K6 (também conhecida como MKK6). Há evidências sugerindo que outras MAPKKs, como a MAP2K3 (conhecida também por MKK3), também podem ativar a p38MAPK. A MAP2K6, por sua vez, é ativada por várias MAPKKKs, cuja ativação é iniciada por uma diversidade de estímulos (Roux e Blenis, 2004; Cuadrado e Nebreda, 2010). Isso demonstra a complexidade desta via de transdução de sinais, onde ocorre a integração de múltiplos sinais provenientes de diferentes vias (Figura 2).



**Figura 2.** Via de sinalização da p38MAPK (Cuadrado e Nebreda, 2010).

Interessante ressaltar que a p38MAPK pode ser ativada por mecanismos noradrenérgicos, embora isto foi demonstrado mais frequentemente em preparações *in vitro* de células que não pertencem ao SNC (Tsang e Rabkin, 2009; Lajevic et al., 2011), ou em células não-neuronais, como os pinealócitos (Chik et al., 2004). Nestes últimos, a noradrenalina atua através de receptores  $\beta$ -adrenérgicos e induz a elevação dos níveis intracelulares de cálcio e AMPc, o que ultimamente provoca a fosforilação da p38MAPK através da MKK3 e MKK6 (Chik et al., 2004).

Os substratos da p38MAPK incluem outras quinases, proteínas citosólicas e fatores de transcrição, como resumido na Figura 2. Estes substratos podem controlar o estado de fosforilação de outras proteínas, bem como a transcrição gênica e síntese de novas proteínas. A atividade da p38MAPK pode ser diminuída através de sua desfosforilação mediada por várias fosfatases, como a fosfatase de proteínas 2A.

Outros estudos sugerem que as fosfatases de especificidade dupla 16 (DUSP16, também conhecida como MAPK fosfatase-7 ou MKP7, 14,15) e 10 (DUSP10 ou MKP5) também podem reduzir a atividade da p38MAPK (Kyriakis e Avruch, 2001; Roux e Blenis, 2004; Cuadrado e Nebreda, 2010).

Inicialmente, descreveu-se o papel das MAPKs nas respostas induzidas por fatores de crescimento e respostas ao estresse (Segal e Greenberg, 1996; Ichijo, 1999; Zhang e Liu, 2002). Entretanto, evidências recentes mostram que essa via de sinalização também possui um papel importante no cérebro adulto, regulando várias formas de plasticidade sináptica e memória em sistemas que abrangem de invertebrados até mamíferos (Sweatt, 2001b; Sweatt, 2004).

A ERK é o membro da família de MAPKs cujo papel nestes processos foi mais bem caracterizado (Grewal et al., 1999; Sweatt, 2001b; Thiels e Klann, 2001; Adams e Sweatt, 2002; Sweatt, 2004; Thomas e Huganir, 2004). A atividade da ERK é necessária para o estabelecimento da LTP no hipocampo e na amígdala (English e Sweatt, 1997; Huang et al., 2000) e em outras regiões corticais (Di Cristo et al., 2001). Além disso, esta mesma via de sinalização é requerida para o estabelecimento da LTD no cerebelo (Kawasaki et al., 1999). Por fim, a ERK também participa na formação das memórias espaciais (Blum et al., 1999) e aversivas, como o condicionamento pelo medo (Atkins et al., 1998) e esquiva inibitória (Izquierdo, 2002; Izquierdo et al., 2006). Na EI, sua atividade é necessária tanto no hipocampo quanto na amígdala para a consolidação da LTM (Rossato et al., 2004).

Nos neurônios, a ERK é ativada em resposta à liberação do neurotransmissor glutamato (Fiore et al., 1993), em um mecanismo dependente da elevação intracelular de cálcio (mediado pelo receptor do tipo NMDA ou pelos canais de cálcio voltagem-dependentes) (Walker et al., 2003). Sua ativação provoca, então, mudanças na atividade e quantidade de receptores glutamatérgicos do tipo AMPA nas

sinapses (Zhu et al., 2002), bem como modificações estruturais na morfologia das espinhas dendríticas (Wu et al., 2001b). Estes dois mecanismos seriam a ligação entre a ativação da ERK e as alterações fisiológicas que ultimamente correspondem à formação da LTM (Thomas e Huganir, 2004).

A ERK é necessária para o controle da expressão gênica, e esta é provavelmente uma função essencial desta via de sinalização na regulação dos processos de plasticidade sináptica e memória. Algumas formas de potenciação que são bloqueadas por inibidores da ERK não ocorrem quando não há translocação da quinase para o núcleo. (Patterson et al., 2001). Dentre os fatores de transcrição que são substratos de fosforilação pela ERK, os cruciais para a consolidação da memória incluem Elk1 e CREB (Thomas e Huganir, 2004). Embora não seja capaz de ativá-lo diretamente, a ERK induz uma fosforilação prolongada o fator de transcrição CREB, através das quinases efetoras RSK e MSK. A ausência desta fosforilação prolongada impede a formação de uma LTM (Hardingham et al., 2001; Wu et al., 2001a).

Já o papel das outras duas famílias de MAPK (JNK-MAPK e p38MAPK), foi mais amplamente descrito nas respostas ao estresse e estímulos inflamatórios, e frequentemente em outros sistemas que não o SNC (Ashwell, 2006), embora os componentes das cascatas de sinalização destas outras formas de MAPK também são expressos nas estruturas cerebrais importantes para a memória e aprendizado (Lee et al., 2000). De fato, recentemente descobriu-se que a p38MAPK e a JNK-MAPK também estão envolvidas nos processos de plasticidade sináptica e memória (Bolshakov et al., 2000; Zhen et al., 2001; Alonso et al., 2003; Bevilaqua et al., 2003; Guan et al., 2003). Assim, a ativação da p38MAPK pode ser induzida por BDNF em fatias do hipocampo (Blanquet, 2000), e sua atividade é necessária em uma forma de LTP induzida por BDNF no giro denteado (Ying et al., 2002). Além disso, a p38MAPK pode regular uma forma de LTD dependente do receptor NMDA no hipocampo (Bolshakov et al., 2000) e a indução de LTP no córtex cingulado anterior (Toyoda et

al., 2007). Por fim, esta quinase é necessária no hipocampo para a consolidação da memória associada ao aprendizado da tarefa de esquiva inibitória (Alonso et al., 2003).

Apesar do extenso conhecimento acumulado sobre os neurotransmissores que são necessários e atuam na amígdala para que esta exerça seu papel modulador sobre a consolidação da memória, as vias de sinalização intracelular ainda foram pouco estudadas nesta estrutura. Embora já se demonstrou que a atividade da ERK é necessária na amígdala para formar a LTM de memórias aversivas, a participação de outras formas de MAPK, como a p38MAPK, ainda não foi investigada. Esta quinase é um alvo interessante, pois além de participar nas respostas induzidas por estímulos estressantes, existe uma potencial regulação de sua atividade por mecanismos dependentes de noradrenalina, neurotransmissor central no funcionamento da amígdala. Portanto, a participação da p38MAPK nos mecanismos de memória ainda necessita ser esclarecida em detalhes, e, em particular, seu possível papel na BLA durante a consolidação da tarefa de esquiva inibitória. Assim, este trabalho busca avançar no entendimento desta questão, através do cumprimento dos objetivos a seguir.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Investigar se a atividade da p38MAPK na BLA é necessária para a consolidação da tarefa de EI em ratos adultos.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Investigar se a p38MAPK é necessária na BLA para que ocorra a formação da LTM associada ao aprendizado da tarefa de EI, empregando-se a infusão local de diferentes doses do inibidor SB203580 ou do seu análogo inativo SB202474, em diferentes tempos após o treino.
- Investigar se a p38MAPK é necessária na BLA para que ocorra a formação da STM associada ao aprendizado da tarefa de EI, empregando-se a infusão local do inibidor SB203580 na dose e tempo onde a retenção da LTM foi prejudicada.
- Investigar se a funcionalidade da amígdala é afetada pelo SB203580, avaliando-se o reaprendizado da tarefa de EI em ratos onde a infusão do inibidor provocou amnésia.
- Investigar se a amnésia induzida pela inativação da p38MAPK é devida a mecanismos de dependência de estado.
- Investigar se o prejuízo na tarefa de EI após a inativação da p38MAPK na BLA não é devido a efeitos inespecíficos sobre a locomoção, avaliando-se o efeito da infusão local do SB203580 sobre o desempenho na tarefa de campo aberto.
- Investigar se o prejuízo na tarefa de EI após a inativação da p38MAPK na BLA não é resultado do aumento nos níveis de ansiedade, avaliando-se o efeito da infusão local do SB203580 no desempenho na tarefa de labirinto em cruz elevado.



- Investigar se o treino na EI induz a ativação da p38MAPK na BLA, através da quantificação da dupla fosforilação por *western blot* em diferentes tempos após o treino.
- Identificar a dose do antagonista dos receptores beta-adrenérgicos timolol que provoca amnésia para a LTM associada ao aprendizado da tarefa de EI.
- Investigar se a ativação da p38MAPK induzida na BLA pelo treino na tarefa de EI é dependente da ativação de receptores beta-adrenérgicos, através da infusão pós-treino do antagonista timolol na dose que provocou amnésia, e quantificação da fosforilação por *western blot*.

#### 4. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

Abel T, Lattal KM (2001). Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Curr Opin Neurobiol* 11(2): 180-187.

Adams JP, Sweatt JD (2002). Molecular psychology: roles for the ERK MAP kinase cascade in memory. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42: 135-163.

Alonso M, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Medina JH, Cammarota M (2003). Memory formation requires p38MAPK activity in the rat hippocampus. *Neuroreport* 14(15): 1989-1992.

Amaral DG, Insausti R (1992). Retrograde transport of D-[3H]-aspartate injected into the monkey amygdaloid complex. *Exp Brain Res* 88(2): 375-388.

Ashwell JD (2006). The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 6(7): 532-540.

Atkins CM, Selcher JC, Petraitis JJ, Trzaskos JM, Sweatt JD (1998). The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nat Neurosci* 1(7): 602-609.

Barros DM, Pereira P, Medina JH, Izquierdo I (2002). Modulation of working memory and of long- but not short-term memory by cholinergic mechanisms in the basolateral amygdala. *Behav Pharmacol* 13(2): 163-167.

Bevilaqua LR, Kerr DS, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M (2003). Inhibition of hippocampal Jun N-terminal kinase enhances short-term memory but blocks long-term memory formation and retrieval of an inhibitory avoidance task. *Eur J Neurosci* 17(4): 897-902.

Bianchin M, Mello e Souza T, Medina JH, Izquierdo I (1999). The amygdala is involved in the modulation of long-term memory, but not in working or short-term memory. *Neurobiol Learn Mem* 71(2): 127-131.

Blanquet PR (2000). Identification of two persistently activated neurotrophin-regulated pathways in rat hippocampus. *Neuroscience* 95(3): 705-719.

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* 19(9): 3535-3544.

Bolshakov VY, Carboni L, Cobb MH, Siegelbaum SA, Belardetti F (2000). Dual MAP kinase pathways mediate opposing forms of long-term plasticity at CA3-CA1 synapses. *Nat Neurosci* 3(11): 1107-1112.

Bonini JS, Rodrigues L, Kerr DS, Bevilaqua LR, Cammarota M, Izquierdo I (2003). AMPA/kainate and group-I metabotropic receptor antagonists infused into different brain areas impair memory formation of inhibitory avoidance in rats. *Behav Pharmacol* 14(2): 161-166.

Canteras NS, Swanson LW (1992). Projections of the ventral subiculum to the amygdala, septum, and hypothalamus: a PHAL anterograde tract-tracing study in the rat. *J Comp Neurol* 324(2): 180-194.

Chik CL, Mackova M, Price D, Ho AK (2004). Adrenergic regulation and diurnal rhythm of p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation in the rat pineal gland. *Endocrinology* 145(11): 5194-5201.

Cuadrado A, Nebreda AR (2010). Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J* 429(3): 403-417.

Da Cunha C, Roozendaal B, Vazdarjanova A, McGaugh JL (1999). Microinfusions of flumazenil into the basolateral but not the central nucleus of the amygdala enhance memory consolidation in rats. *Neurobiol Learn Mem* 72(1): 1-7.

Davis HP, Squire LR (1984). Protein synthesis and memory: a review. *Psychol Bull* 96(3): 518-559.

Di Cristo G, Berardi N, Cancedda L, Pizzorusso T, Putignano E, Ratto GM, Maffei L (2001). Requirement of ERK activation for visual cortical plasticity. *Science* 292(5525): 2337-2340.

Dudai Y (1996). Consolidation: fragility on the road to the engram. *Neuron* 17(3): 367-370.

Ellis ME, Berman RF, Kesner RP (1983). Amnesia attenuation specificity: propranolol reverses norepinephrine but not cycloheximide-induced amnesia. *Pharmacol Biochem Behav* 19(5): 733-736.

Ellis ME, Kesner RP (1983). The noradrenergic system of the amygdala and aversive information processing. *Behav Neurosci* 97(3): 399-415.

English JD, Sweatt JD (1997). A requirement for the mitogen-activated protein kinase cascade in hippocampal long term potentiation. *J Biol Chem* 272(31): 19103-19106.

Fiore RS, Murphy TH, Sanghera JS, Pelech SL, Baraban JM (1993). Activation of p42 mitogen-activated protein kinase by glutamate receptor stimulation in rat primary cortical cultures. *J Neurochem* 61(5): 1626-1633.

Goddard GV (1964). Amygdaloid Stimulation and Learning in the Rat. *J Comp Physiol Psychol* 58: 23-30.

Gold PE, Van Buskirk RB (1975). Facilitation of time-dependent memory processes with posttrial epinephrine injections. *Behav Biol* 13(2): 145-153.

Grewal SS, York RD, Stork PJ (1999). Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons. *Curr Opin Neurobiol* 9(5): 544-553.

Guan Z, Kim JH, Lomvardas S, Holick K, Xu S, Kandel ER, Schwartz JH (2003). p38 MAP kinase mediates both short-term and long-term synaptic depression in aplysia. *J Neurosci* 23(19): 7317-7325.

Hardingham GE, Arnold FJ, Bading H (2001). A calcium microdomain near NMDA receptors: on switch for ERK-dependent synapse-to-nucleus communication. *Nat Neurosci* 4(6): 565-566.

Huang YY, Martin KC, Kandel ER (2000). Both protein kinase A and mitogen-activated protein kinase are required in the amygdala for the macromolecular synthesis-dependent late phase of long-term potentiation. *J Neurosci* 20(17): 6317-6325.

Ichijo H (1999). From receptors to stress-activated MAP kinases. *Oncogene* 18(45): 6087-6093.

Izquierdo, I. *Memória*. Artmed Editora S.A., 2002.

Izquierdo I, Bevilaqua 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(9): 496-505.

Izquierdo I, Izquierdo LA, Barros DM, Mello e Souza T, de Souza MM, Quevedo J, Rodrigues C, Sant'Anna MK, Madruga M, Medina JH (1998). Differential involvement of cortical receptor mechanisms in working, short-term and long-term memory. *Behav Pharmacol* 9(5-6): 421-427.

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(3): 285-316.

Johnson GL, Lapadat R (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298(5600): 1911-1912.

Kawasaki H, Fujii H, Gotoh Y, Morooka T, Shimohama S, Nishida E, Hirano T (1999). Requirement for mitogen-activated protein kinase in cerebellar long term depression. *J Biol Chem* 274(19): 13498-13502.

Kesner RP, Wilburn MW (1974). A review of electrical stimulation of the brain in context of learning and retention. *Behav Biol* 10(3): 259-293.

Krettek JE, Price JL (1978). A description of the amygdaloid complex in the rat and cat with observations on intra-amygdaloid axonal connections. *J Comp Neurol* 178(2): 255-280.

Kumar S, Boehm J, Lee JC (2003). p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2(9): 717-726.

Kyriakis JM, Avruch J (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81(2): 807-869.

Lajevic MD, Suleiman S, Cohen RL, Chambers DA (2011). Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by norepinephrine in T-lineage cells. *Immunology* 132(2): 197-208.

Lamprecht R, LeDoux J (2004). Structural plasticity and memory. *Nat Rev Neurosci* 5(1): 45-54.

Lee SH, Park J, Che Y, Han PL, Lee JK (2000). Constitutive activity and differential localization of p38alpha and p38beta MAPKs in adult mouse brain. *J Neurosci Res* 60(5): 623-631.

Liang KC, McGaugh JL (1983). Lesions of the stria terminalis attenuate the amnesic effect of amygdaloid stimulation on avoidance responses. *Brain Res* 274(2): 309-318.

Ma S, Morilak DA (2005). Norepinephrine release in medial amygdala facilitates activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in response to acute immobilisation stress. *J Neuroendocrinol* 17(1): 22-28.

- Mascagni F, McDonald AJ, Coleman JR (1993). Corticoamygdaloid and corticocortical projections of the rat temporal cortex: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study. *Neuroscience* 57(3): 697-715.
- McDonald AJ (1991). Topographical organization of amygdaloid projections to the caudatoputamen, nucleus accumbens, and related striatal-like areas of the rat brain. *Neuroscience* 44(1): 15-33.
- McDonald AJ (1998). Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog Neurobiol* 55(3): 257-332.
- McDonald AJ, Mascagni F (1997). Projections of the lateral entorhinal cortex to the amygdala: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat. *Neuroscience* 77(2): 445-459.
- McGaugh JL (1966). Time-dependent processes in memory storage. *Science* 153(3742): 1351-1358.
- McGaugh JL (1989). Involvement of hormonal and neuromodulatory systems in the regulation of memory storage. *Annu Rev Neurosci* 12: 255-287.
- McGaugh JL (2000). Memory--a century of consolidation. *Science* 287(5451): 248-251.
- McGaugh JL (2004). The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu Rev Neurosci* 27: 1-28.
- McGaugh JL, Petrinovich LF (1965). Effects of drugs on learning and memory. *Int Rev Neurobiol* 8: 139-196.
- McIntyre CK, Power AE, Roozendaal B, McGaugh JL (2003). Role of the basolateral amygdala in memory consolidation. *Ann N Y Acad Sci* 985: 273-293.
- Milner B, Squire LR, Kandel ER (1998). Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* 20(3): 445-468.
- Morilak DA, Barrera G, Echevarria DJ, Garcia AS, Hernandez A, Ma S, Petre CO (2005). Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29(8): 1214-1224.
- Ottersen OP, Fischer BO, Rinvik E, Storm-Mathisen J (1986). Putative amino acid transmitters in the amygdala. *Adv Exp Med Biol* 203: 53-66.
- Pare D, Smith Y, Pare JF (1995). Intra-amygdaloid projections of the basolateral and basomedial nuclei in the cat: Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin anterograde tracing at the light and electron microscopic level. *Neuroscience* 69(2): 567-583.
- Parent MB, McGaugh JL (1994). Posttraining infusion of lidocaine into the amygdala basolateral complex impairs retention of inhibitory avoidance training. *Brain Res* 661(1-2): 97-103.
- Patterson SL, Pittenger C, Morozov A, Martin KC, Scanlin H, Drake C, Kandel ER (2001). Some forms of cAMP-mediated long-lasting potentiation are associated with release of BDNF and nuclear translocation of phospho-MAP kinase. *Neuron* 32(1): 123-140.

Petrovich GD, Canteras NS, Swanson LW (2001). Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. *Brain Res Brain Res Rev* 38(1-2): 247-289.

Rossato JI, Bonini JS, Coitinho AS, Vianna MR, Medina JH, Cammarota M, Izquierdo I (2004). Retrograde amnesia induced by drugs acting on different molecular systems. *Behav Neurosci* 118(3): 563-568.

Roux PP, Blenis J (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 68(2): 320-344.

Rubin MA, Stiegemeier JA, Volkweis MA, Oliveira DM, Fenili AC, Boemo RL, Jurach A, Mello CF (2001). Intra-amygdala spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. *Eur J Pharmacol* 423(1): 35-39.

Sah P, Faber ES, Lopez De Armentia M, Power J (2003). The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev* 83(3): 803-834.

Schafe GE, LeDoux JE (2000). Memory consolidation of auditory pavlovian fear conditioning requires protein synthesis and protein kinase A in the amygdala. *J Neurosci* 20(18): RC96.

Segal RA, Greenberg ME (1996). Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci* 19: 463-489.

Shi CJ, Cassell MD (1999). Perirhinal cortex projections to the amygdaloid complex and hippocampal formation in the rat. *J Comp Neurol* 406(3): 299-328.

Squire LR, Kandel ER. *Memória: da mente às moléculas*, Porto Alegre, Artmed Editora S.A, 2003.

Sweatt JD (2001a). Memory mechanisms: the yin and yang of protein phosphorylation. *Curr Biol* 11(10): R391-394.

Sweatt JD (2001b). The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J Neurochem* 76(1): 1-10.

Sweatt JD (2004). Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Neurobiol* 14(3): 311-317.

Thiels E, Klann E (2001). Extracellular signal-regulated kinase, synaptic plasticity, and memory. *Rev Neurosci* 12(4): 327-345.

Thomas GM, Huganir RL (2004). MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 5(3): 173-183.

Tomaz C, Dickinson-Anson H, McGaugh JL (1992). Basolateral amygdala lesions block diazepam-induced anterograde amnesia in an inhibitory avoidance task. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(8): 3615-3619.

Toyoda H, Zhao MG, Xu H, Wu LJ, Ren M, Zhuo M (2007). Requirement of extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase for long-term potentiation in adult mouse anterior cingulate cortex. *Mol Pain* 3: 36.

Tsang MY, Rabkin SW (2009). p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) is activated by noradrenaline and serves a cardioprotective role, whereas adrenaline induces p38 MAPK dephosphorylation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 36(8): e12-19.

Walker SA, Cullen PJ, Taylor JA, Lockyer PJ (2003). Control of Ras cycling by Ca<sup>2+</sup>. *FEBS Lett* 546(1): 6-10.

Weiskrantz L (1956). Behavioral changes associated with ablation of the amygdaloid complex in monkeys. *J Comp Physiol Psychol* 49(4): 381-391.

Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 79(1): 143-180.

Wu GY, Deisseroth K, Tsien RW (2001a). Activity-dependent CREB phosphorylation: convergence of a fast, sensitive calmodulin kinase pathway and a slow, less sensitive mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(5): 2808-2813.

Wu GY, Deisseroth K, Tsien RW (2001b). Spaced stimuli stabilize MAPK pathway activation and its effects on dendritic morphology. *Nat Neurosci* 4(2): 151-158.

Ying SW, Futter M, Rosenblum K, Webber MJ, Hunt SP, Bliss TV, Bramham CR (2002). Brain-derived neurotrophic factor induces long-term potentiation in intact adult hippocampus: requirement for ERK activation coupled to CREB and upregulation of Arc synthesis. *J Neurosci* 22(5): 1532-1540.

Zhang W, Liu HT (2002). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* 12(1): 9-18.

Zhen X, Du W, Romano AG, Friedman E, Harvey JA (2001). The p38 mitogen-activated protein kinase is involved in associative learning in rabbits. *J Neurosci* 21(15): 5513-5519.

Zhu JJ, Qin Y, Zhao M, Van Aelst L, Malinow R (2002). Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Cell* 110(4): 443-455.

## 5. ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados obtidos ao final desta Tese de Doutorado foram submetidos para publicação no periódico *Neurobiology of Learning and Memory*. O artigo encontra-se reproduzido a partir da página seguinte.



## Consolidation of inhibitory avoidance memory requires p38MAPK activation in the basolateral amygdala

Cristiano A. Köhler<sup>1,3</sup>, Lia R. Bevilaqua<sup>1,3</sup>, Janine I. Rossato<sup>1,3</sup>, Iván Izquierdo<sup>2,3</sup>, and Martín Cammarota<sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Neuroquímica & Neurofisiologia da Memória, and <sup>2</sup>Laboratório de Neurofarmacologia da Memória, Centro de Memória, Instituto do Cérebro, Pontifícia Universidade Católica de Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga, 6690 – Andar 2, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil, <sup>3</sup>Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Neurociência Translacional, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil.

**\*To whom correspondence should be addressed:** Martín Cammarota at Laboratório de Neuroquímica & Neurofisiologia da Memória, Centro de Memória, Instituto do Cérebro, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 6690 – 2<sup>nd</sup> floor, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil. Phone: +55 51 3320 3403. Fax: +55 51 3320 3312. E-mail: [mcammaro@terra.com.br](mailto:mcammaro@terra.com.br) or [martin.cammarota@gmail.com](mailto:martin.cammarota@gmail.com)

**Abstract**

p38MAPK mediates several neurophysiological responses to stress. However, the role of this kinase in synaptic plasticity and fear-motivated learning has seldom been analyzed. The present study explores the participation of p38MAPK in step-down inhibitory avoidance (IA) memory consolidation in the basolateral amygdala (BLA) of adult male rats. Infusion of the p38MAPK inhibitor SB203580 into BLA immediately but not 180 min after training impaired long-term memory in a dose-dependent manner without affecting BLA functionality or short-term memory retention. The SB203580 inactive analog SB202474 had no effect whatsoever on IA memory. IA training was accompanied by the rapid and  $\beta$ -adrenergic receptor-dependent phosphorylation of p38MAPK in the BLA. Our results indicate that activation of p38MAPK is essential for the normal consolidation of avoidance long-term memory and suggest that this process is controlled by the noradrenergic system in the BLA.

## Introduction

The step-down inhibitory avoidance learning paradigm (IA) is commonly employed for studying the neurobiological basis of fear-motivated memory in rodents. During IA training, stepping down from a platform located in a fear-conditioning training box is paired with a footshock. Thus, in a single and very short training session, animals learn to refrain from stepping down when placed again on the platform. The sequence of molecular events involved in the consolidation of IA memory in the hippocampus has been extensively described (Izquierdo, Bevilaqua, Rossato, Bonini, Medina, & Cammarota, 2006). However, although several reports indicate that the basolateral amygdala (BLA) is also necessary for avoidance memory retention (Gallagher, Kapp, Musty, & Driscoll, 1977; McGaugh, 2004), comparatively little is known about the signaling cascades activated in BLA during IA memory processing.

The p38 family of mitogen-activated protein kinases (p38MAPK) was originally described as a group of Ser-Thr kinases chiefly involved with modulation of the responses to stressful and pro-inflammatory stimuli (Ashwell, 2006). However, reports showing that brain-derived neurotrophic factor (BDNF) activates p38MAPK in hippocampal slices (Blanquet et al., 2000), and that BDNF-induced long-term potentiation (LTP) of perforant path–granule cell synapses leads to p38MAPK activation (Ying, Futter, Rosenblum, Webber, Hunt, Bliss, & Bramham, 2002), suggest that p38MAPK plays a key role in synaptic plasticity. Indeed, pharmacological manipulations of p38MAPK modify the effect of different agents on plasticity (Butler, O'Connor, & Moynagh, 2004; Gisabella, Rowan, & Anwyl, 2003; Kelly, Vereker, Nolan, Brady, Barry, Loscher, Mills, & Lynch, 2003; Rush, Wu, Rowan, & Anwyl, 2002; Wang, Walsh, Rowan, Selkoe, & Anwyl, 2004), and these kinases are highly expressed in brain regions that are essential for memory processing, including the BLA (Lee, Park, Che, Han, & Lee, 2000). Despite these facts, the participation of p38MAPK in associative learning has seldom been studied (Alonso, Bevilaqua, Izquierdo, Medina, & Cammarota, 2003; Blum, Moore, Adams, & Dash, 1999; Zhen, Du, Romano, Friedman, & Harvey, 2001). In particular, the possible role of p38MAPK in BLA during the consolidation of IA memory has not yet been investigated. In order to do that we used the specific p38MAPK inhibitor 4-(4-fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazole (SB203580; Cuenda, Rouse, Doza, Meier, Cohen, Gallagher, Young, & Lee, 1995; Jiang, Van Cleemput, Sheerin, Ji, Zhang, Saucier, Corcoran, & Zhang, 2005;

Young, McLaughlin, Kumar, Kassis, Doyle, McNulty, Gallagher, Fisher, McDonnell, Carr, Huddleston, Seibel, Porter, Livi, Adams, & Lee, 1997).

## **Materials & Methods**

*Animals, surgery and drug infusion procedure:* A total of 204 naïve male Wistar rats (3-month-old 280-300 g) bought at FEPPS (Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil) were used. The animals were housed 5 to a cage and kept with free access to food and water under a 12/12 light/dark cycle, with light onset at 7:00 AM. The temperature of the animal room was maintained at 22-24°C. To implant them with indwelling cannulas, rats were deeply anesthetized with thiopental (i.p., 30-50 mg/Kg) and 22-gauge cannulas stereotaxically aimed to the BLA (A -2.4, L  $\pm$ 5.1, V -3.1, mm) in accordance with coordinates taken from the atlas of Paxinos & Watson (1986). Animals were allowed to recover from surgery for 4 days before submitting them to any other procedure. At the time of drug delivery, 30-gauge infusion cannulas were tightly fitted into the guides. Infusions (0.5  $\mu$ l/side) were carried out over 60 s with an infusion pump and the cannulas were left in place for 60 additional seconds to minimize backflow. The placement of the cannulas was verified postmortem: 2-4 h after the behavioral test, 0.5  $\mu$ l of 4% methylene-blue were infused as described above and the extension of the dye 30 min thereafter was taken as an indication of the presumable diffusion of the vehicle or drug previously given to each animal. Only data from animals with correct implants were analyzed. All procedures were conducted in accordance with the "Principles of laboratory animal care" (NIH publication N° 85-23, revised 1996). Every effort was made to reduce the number of animals used and to minimize their suffering.

*Inhibitory avoidance learning task:* Rats were trained in a one-trial, step-down inhibitory avoidance during the light phase of the subjective day (between 9.00-11.00 h. The training apparatus was a 50 x 25 x 25 cm plexiglass box with a 5 cm-high, 8 cm-wide and 25 cm long platform on the left end of a series of bronze bars which made up the floor of the box. For training, animals were gently placed on the platform facing the left rear corner of the training box. When they stepped down and placed their four paws on the grid, received a 2 s, 0.8 mA scrambled footshock and were immediately withdrawn from the training box. Long-term memory retention was evaluated in a non-reinforced test session carried out at 24 hours training. In the

test session, the animals were placed back on the training box platform until they eventually stepped down to the grid. The latency to step-down during the test session was taken as an indicator of long-term memory retention. In some experiments, short term memory was evaluated 3 h after training using a different set of animals.

*Open field and plus maze tests:* To analyze their exploratory and locomotor activities, animals were placed on the left rear quadrant of a 50×50×39 cm open field with plywood walls and a floor divided into 12 equal squares. The numbers of line crossings and the number of rearings were measured over 5 min and taken as indicators of locomotor and exploratory activities, respectively. To evaluate their anxiety state, rats were exposed to an elevated plus maze. The total number of entries into the four arms, the number of entries and the time spent into the open arms were recorded over a 5 min session. Twenty-four hours before exposure to the open field or the plus maze, the animals received bilateral 0.5 µl infusions in the BLA.

*Immunoblot Assays:* Animals were killed by decapitation and BLA rapidly dissected out and homogenized in ice-chilled buffer (20 mM Tris-HCL, pH 7.4, 0.32 M sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 10 µg/ml aprotinin, 15 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml bacitracin, 10 µg/ml pepstatin, 15 µg/ml trypsin inhibitor, 50 mM NaF, and 1 mM sodium orthovanadate). Protein concentration was determined using the BCA protein assay. Equal amounts of protein were fractionated by SDS-PAGE and electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes (PVDF). After verification of protein transfer by Ponceau S staining, the blots were blocked in Tween-Tris buffer saline (TTBS; 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 0.9% NaCl and 0.1% Tween 20) and incubated overnight with primary antibodies. Blots were washed in TTBS and incubated with HRP-coupled anti-IgG antibody, washed again and the immunoreactivity detected using the ECL-Prime GE kit. Densitometric analysis was carried out in an ImageQuant RT-ECL system.

*Chemicals:* SB203580 and SB202474 were from Calbiochem (USA). Timolol was bought from Sigma-Aldrich (USA). p<sup>Thr180/pTyr182</sup>p38MAPK and p38MAPK antibodies were from Cell Signaling (USA). Drugs were dissolved in saline or DMSO and stored protected from light at -20°C until use. Right before that an aliquot was thawed and diluted to working concentration with 0.1% DMSO in saline (pH 7.2). The doses utilized were determined based on pilot experiments and

on previous studies showing the effect of each compound on learning or behavioral performance.

*Statistics:* Since a ceiling of 300 s was imposed to step-down latency during test sessions, IA data were analyzed using the Kruskal-Wallis non-parametric test followed by Dunn's comparisons or the Mann-Whitney U test, as appropriate. Data from immunoblots and open field and elevated plus maze experiments were analyzed using repeated measures ANOVA followed by Dunnett's comparison test or Student's t-test, as appropriate.

## Results

To analyze the effect of p38MAPK inhibition on aversive memory processing, male Wistar rats were trained in a one-trial, step-down inhibitory avoidance task (IA) and immediately after that received bilateral intra-BLA infusions of vehicle (VEH; 0.1% DMSO in saline) or SB203580. Retention of IA long-term memory (LTM) was evaluated in a non-reinforced test session carried out 24 h after training. SB203580 (2-200  $\mu$ M/side) hindered LTM in a dose-dependent manner (Fig 1 – 0 min;  $H = 11.52$ ,  $p < 0.01$  for 200  $\mu$ M vs. VEH group in Dunn's multiple comparison after Kruskal-Wallis test). No significant effect on IA LTM was observed when SB203580 was given in the BLA 180 min posttraining (Fig 1 – 180 min). The intra-BLA infusion of SB202474 (200  $\mu$ M), an inactive analog of SB203580 (Cocolakis, Lemay, Ali, & Lebrun, 2001; Ho, Price, Mackova, & Chik, 2001), did not affect IA LTM regardless the moment of infusion (Fig 1). The amnesia caused by intra-BLA infusion of SB203580 was entirely reversible as the animals normally acquired the IA response when submitted to a second IA training session 48 h after the first one (Fig 2A;  $U = 5.0$ ,  $p < 0.05$  vs. VEH in Mann-Whitney U test), suggesting that SB203580 does not leave any residual effect or cause any functional damage to the BLA. Moreover, the amnesic action of SB203580 was not due to a protracted influence on locomotor activity and anxiety state since, as can be seen in Table 1, SB203580 (200  $\mu$ M) did not modify the number of crossings and rearings in an open field or changed the total number of entries into the four arms and the number of entries and the time spent in the open arms of an elevated plus maze when given in the BLA 24 h before the respective behavioral session (Table 1). The amnesic effect of p38MAPK inhibition was not due to state-dependency either. Immediate posttraining intra-BLA infusion of SB203580 (200  $\mu$ M) was amnesic in rats given VEH or

SB203580 (200  $\mu$ M) 15 min before a LTM test session carried out 24 h after training (Fig 2B;  $H = 15.18$ ,  $p < 0.05$  vs VEH/VEH group in Dunn's multiple comparison after Kruskal-Wallis test). Please, note that SB203580 (200  $\mu$ M) did not affect LTM expression when given 15 min before the test session to rats that received VEH immediately posttraining (Fig 2B; VEH/SB group). In addition, SB203580 did not have any effect in short-term memory retentions, as tested 3 h after training (Fig 2C). The best-characterized mechanism for activating p38MAPK is dual phosphorylation of a Thr-Gly-Tyr motif by upstream MAPK kinases. Therefore, in order to analyze IA whether learning of the IA response was accompanied by activation of p38MAPK signaling, we used an antibody that detects p38MAPK only when dually phosphorylated at Thr180/Tyr182 (i.e. when active; (Freshney, Rawlinson, Guesdon, Jones, Cowley, Hsuan, & Saklatvala, 1994; Mittelstadt, Salvador, Fornace, & Ashwell, 2005; Raingeaud, Gupta, Rogers, Dickens, Han, Ulevitch, & Davis, 1995). Training in IA caused a rapid increase in the phosphorylation levels of p38MAPK in BLA. p38MAPK phosphorylation peaked 30 min posttraining and returned to control levels 180 min after the training session (Fig 3A;  $F(3,21) = 4.41$ ;  $p < 0.05$ ). No change in total p38MAPK was detected at any posttraining time studied (Fig 3A). p38MAPK signaling is controlled by  $\beta$ -adrenergic receptors in different experimental systems (Chik, Mackova, Price, & Ho, 2004; Morioka, Tanabe, Inoue, Dohi, & Nakata, 2009; Steinle, Chin, Williams, & Panjala, 2008), and several reports suggest that noradrenergic activation of the BLA is essential for consolidation of fear-motivated memories (Canal, Chang, & Gold, 2008; LaLumiere, Buen, & McGaugh, 2003; McIntyre, Hatfield, & McGaugh, 2002; Radwanska, Nikolaev, & Kaczmarek, 2010). Indeed, when given in the BLA immediately after training, the  $\beta$ -adrenergic receptor antagonist timolol (0.05-5 mM) hindered IA LTM retention (Fig 3B;  $H = 10.02$ ;  $p < 0.05$  vs. V group in Kruskal-Wallis followed by Dunn's test), and blocked the IA training-induced phosphorylation of p38MAPK (Fig 3C;  $t(4) = 3.524$ ;  $p < 0.05$  in paired Student's t-test).

## Discussion

It has been previously reported that training in an eyeblink conditioning learning task activates p38MAPK in the cerebellar vermis but not in the hippocampus of rabbits (Zhen et al., 2001), and that activation of p38MAPK signaling pathway in the nucleus accumbens plays a key role in the

acquisition of conditioned place-preference responses (Gerdjikov, Ross, & Beninger, 2004; Zhang, Cui, Chen, Na, Chen, Wei, Li, Liu, & Xin, 2011). In addition, p38MAPK seems to mediate the protective effect of adenosine A<sub>2A</sub> receptor blockade on the amnesia caused by administration of beta-amyloid peptides (Canas, Porciuncula, Cunha, Silva, Machado, Oliveira, Oliveira, & Cunha, 2009). This kinase is also necessary for the induction of NMDA receptor-dependent long-term potentiation in the anterior cingulate cortex (Toyoda, Zhao, Xu, Wu, Ren, & Zhuo, 2007), and for in vitro conditioning in a preparation from the pond turtle *Pseudemys scripta elegans* (Keifer, Zheng, & Zhu, 2007). However, there have been very few studies of the involvement of p38MAPK in fear memory processing, and no one of them analyzed the upstream factors controlling its putative activation during memory consolidation. In this study, we trained rats in step-down inhibitory avoidance and gave them intra-BLA infusions of the specific p38MAPK inhibitor SB203580 at different posttraining times. We found that SB203580 did not affect short-term avoidance memory but impaired long-term IA memory in a dose-dependent manner only when given immediately but not 180 min h after training. Control experiments indicate that this amnesia was not due to unspecific behavioral alterations, drug lingering effects, BLA damage, inhibition of memory retrieval, or state dependency. Moreover, the SB203580 inactive analog had no effect whatsoever on IA memory retention, confirming that the amnesic action of SB203580 was due to bona fide impairment of p38MAPK enzymatic activity. We also found that IA training was accompanied by the rapid, reversible and timolol-sensitive upregulation of p38MAPK in BLA. Together, our results demonstrate that BLA p38MAPK is necessary for IA LTM consolidation during a restricted posttraining time window lasting less than 3 h, and that this signaling pathway is controlled by the noradrenergic system. The positive effects of noradrenaline on p38MAPK signaling in several biological systems are well documented. Thus, beta-adrenergic receptor agonists stimulate p38MAPK in T-cells (Lajevic, Suleiman, Cohen, & Chambers, 2011), cardiomyocytes (Tsang & Rabkin, 2009), endothelial cells (Fu, Yin, Chi, Hwang, & Hsu, 2006), vascular smooth muscle cells (Kalyankrishna & Malik, 2003), and pinealocytes (Chik et al., 2004) through a mechanism involving upregulation of adenylate cyclase activity, cAMP production, PKA activation and a rise in intracellular Ca<sup>2+</sup> levels. Since it has been previously reported that stimulation of the cAMP/PKA pathway via activation of  $\beta$ -adrenergic receptors in BLA improves fear memory



retention (Ferry, Roozendaal, & McGaugh, 1999; Roozendaal, Schelling, & McGaugh, 2008), it is tempting to suggest that such a pathway also controls p38MAPK signaling during IA memory consolidation in the BLA. At this stage, we can only speculate about the biochemical and physiological mechanism modulated by the  $\beta$ -adrenergic receptor-p38MAPK tandem during this process. Although originally described as a kinase predominantly involved in the stress-induced up-regulation of neuronal transcriptional activity (Mielke & Herdegen, 2000), more recent reports showing that p38MAPK mediates group I metabotropic glutamate receptor-dependent plasticity and chemically-induced long-term potentiation (Coogan & O'Connor, 1999; Rush et al., 2002), maybe through modulation of AMPA receptor internalization (Boudreau, Reimers, Milovanovic, & Wolf, 2007; Zhong, Liu, Gu, & Yan, 2008), points to a role for p38MAPK in the mechanisms controlling the efficacy of glutamatergic synapses. Indeed, it has been recently demonstrated that modulation of AMPA-receptor turnover in the amygdala is essential for fear memory consolidation (Joels & Lamprecht, 2010) and that emotion enhances learning via noradrenaline regulation of AMPA-receptor trafficking (Hu, Real, Takamiya, Kang, Ledoux, Huganir, & Malinow, 2007). Experiments to assess whether a mechanism such as that operates to modulate the lasting storage of avoidance memory in the BLA are presently under way.

### **Acknowledgements**

CAK is a PhD Fellow from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) at Programa de Pós-Graduação em Medicina – Ciências Médicas of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and CAPES to M.C. We thank Lucas L. Bitencourt and Maria Ângela Silva dos Santos for technical assistance.

## References

Alonso, M., Bevilaqua, L. R., Izquierdo, I., Medina, J. H., & Cammarota, M. (2003). Memory formation requires p38MAPK activity in the rat hippocampus. *Neuroreport*, *14*, 1989-1992.

Ashwell, J. D. (2006). The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system. *Nat Rev Immunol*, *6*, 532-540.

Blanquet, P. R. (2000). Identification of two persistently activated neurotrophin-regulated pathways in rat hippocampus. *Neuroscience*, *95*, 705-719.

Blum, S., Moore, A. N., Adams, F., & Dash, P. K. (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*, *19*, 3535-3544.

Boudreau, A. C., Reimers, J. M., Milovanovic, M., & Wolf, M. E. (2007). Cell surface AMPA receptors in the rat nucleus accumbens increase during cocaine withdrawal but internalize after cocaine challenge in association with altered activation of mitogen-activated protein kinases. *J Neurosci*, *27*, 10621-10635.

Butler, M. P., O'Connor, J. J., & Moynagh, P. N. (2004). Dissection of tumor-necrosis factor- $\alpha$  inhibition of long-term potentiation (LTP) reveals a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism which maps to early-but not late-phase LTP. *Neuroscience*, *124*, 319-326.

Canal, C. E., Chang, Q., & Gold, P. E. (2008). Intra-amygdala injections of CREB antisense impair inhibitory avoidance memory: role of norepinephrine and acetylcholine. *Learn Mem*, *15*, 677-686.

Canas, P. M., Porciuncula, L. O., Cunha, G. M., Silva, C. G., Machado, N. J., Oliveira, J. M., Oliveira, C. R., & Cunha, R. A. (2009). Adenosine A2A receptor blockade prevents

synaptotoxicity and memory dysfunction caused by beta-amyloid peptides via p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurosci*, 29, 14741-14751.

Chik, C. L., Mackova, M., Price, D., & Ho, A. K. (2004). Adrenergic regulation and diurnal rhythm of p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation in the rat pineal gland. *Endocrinology*, 145, 5194-5201.

Cocolakis, E., Lemay, S., Ali, S., & Lebrun, J. J. (2001). The p38 MAPK pathway is required for cell growth inhibition of human breast cancer cells in response to activin. *J Biol Chem*, 276, 18430-18436.

Coogan, A. N., & O'Connor, J. J. (1999). Interleukin-1beta inhibits a tetraethylammonium-induced synaptic potentiation in the rat dentate gyrus in vitro. *Eur J Pharmacol*, 374, 197-206.

Cuenda, A., Rouse, J., Doza, Y. N., Meier, R., Cohen, P., Gallagher, T. F., Young, P. R., & Lee, J. C. (1995). SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett*, 364, 229-233.

Ferry, B., Roozendaal, B., & McGaugh, J. L. (1999). Basolateral amygdala noradrenergic influences on memory storage are mediated by an interaction between beta- and alpha1-adrenoceptors. *J Neurosci*, 19, 5119-5123.

Freshney, N. W., Rawlinson, L., Guesdon, F., Jones, E., Cowley, S., Hsuan, J., & Saklatvala, J. (1994). Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell*, 78, 1039-1049.

Fu, Y. C., Yin, S. C., Chi, C. S., Hwang, B., & Hsu, S. L. (2006). Norepinephrine induces apoptosis in neonatal rat endothelial cells via a ROS-dependent JNK activation pathway. *Apoptosis*, 11, 2053-2063.

Gallagher, M., Kapp, B. S., Musty, R. E., & Driscoll, P. A. (1977). Memory formation: evidence for a specific neurochemical system in the amygdala. *Science*, *198*, 423-425.

Gerdjikov, T. V., Ross, G. M., & Beninger, R. J. (2004). Place preference induced by nucleus accumbens amphetamine is impaired by antagonists of ERK or p38 MAP kinases in rats. *Behav Neurosci*, *118*, 740-750.

Gisabella, B., Rowan, M. J., & Anwyl, R. (2003). Mechanisms underlying the inhibition of long-term potentiation by preconditioning stimulation in the hippocampus in vitro. *Neuroscience*, *121*, 297-305.

Ho, A. K., Price, L., Mackova, M., & Chik, C. L. (2001). Potentiation of cyclic AMP and cyclic GMP accumulation by p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK) inhibitors in rat pinealocytes. *Biochem Pharmacol*, *62*, 1605-1611.

Hu, H., Real, E., Takamiya, K., Kang, M. G., Ledoux, J., Huganir, R. L., & Malinow, R. (2007). Emotion enhances learning via norepinephrine regulation of AMPA-receptor trafficking. *Cell*, *131*, 160-173.

Izquierdo, I., Bevilaqua, L. R., Rossato, J. I., Bonini, J. S., Medina, J. H., & Cammarota, M. (2006). Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends Neurosci*, *29*, 496-505.

Jiang, W., Van Cleemput, J., Sheerin, A. H., Ji, S. P., Zhang, Y., Saucier, D. M., Corcoran, M. E., & Zhang, X. (2005). Involvement of extracellular regulated kinase and p38 kinase in hippocampal seizure tolerance. *J Neurosci Res*, *81*, 581-588.

Joels, G., & Lamprecht, R. (2010). Interaction between N-ethylmaleimide-sensitive factor and GluR2 is essential for fear memory formation in lateral amygdala. *J Neurosci*, *30*, 15981-15986.

Kalyankrishna, S., & Malik, K. U. (2003). Norepinephrine-induced stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase is mediated by arachidonic acid metabolites generated by activation of cytosolic phospholipase A(2) in vascular smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther*, *304*, 761-772.

Keifer, J., Zheng, Z. Q., & Zhu, D. (2007). MAPK signaling pathways mediate AMPA receptor trafficking in an in vitro model of classical conditioning. *J Neurophysiol*, *97*, 2067-2074.

Kelly, A., Vereker, E., Nolan, Y., Brady, M., Barry, C., Loscher, C. E., Mills, K. H., & Lynch, M. A. (2003). Activation of p38 plays a pivotal role in the inhibitory effect of lipopolysaccharide and interleukin-1 beta on long term potentiation in rat dentate gyrus. *J Biol Chem*, *278*, 19453-19462.

Lajevic, M. D., Suleiman, S., Cohen, R. L., & Chambers, D. A. (2011). Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by norepinephrine in T-lineage cells. *Immunology*, *132*, 197-208.

LaLumiere, R. T., Buen, T. V., & McGaugh, J. L. (2003). Post-training intra-basolateral amygdala infusions of norepinephrine enhance consolidation of memory for contextual fear conditioning. *J Neurosci*, *23*, 6754-6758.

Lee, S. H., Park, J., Che, Y., Han, P. L., & Lee, J. K. (2000). Constitutive activity and differential localization of p38alpha and p38beta MAPKs in adult mouse brain. *J Neurosci Res*, *60*, 623-631.

McGaugh, J. L. (2004). The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu Rev Neurosci*, *27*, 1-28.

McIntyre, C. K., Hatfield, T., & McGaugh, J. L. (2002). Amygdala norepinephrine levels after training predict inhibitory avoidance retention performance in rats. *Eur J Neurosci*, *16*, 1223-1226.

Mielke, K., & Herdegen, T. (2000). JNK and p38 stresskinases--degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system. *Prog Neurobiol*, *61*, 45-60.

Mittelstadt, P. R., Salvador, J. M., Fornace, A. J., Jr., & Ashwell, J. D. (2005). Activating p38 MAPK: new tricks for an old kinase. *Cell Cycle*, *4*, 1189-1192.

Morioka, N., Tanabe, H., Inoue, A., Dohi, T., & Nakata, Y. (2009). Noradrenaline reduces the ATP-stimulated phosphorylation of p38 MAP kinase via beta-adrenergic receptors-cAMP-protein kinase A-dependent mechanism in cultured rat spinal microglia. *Neurochem Int*, *55*, 226-234.

Paxinos G., & Watson C. (1986). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (2nd ed.). San Diego: Academic Press.

Radwanska, K., Nikolaev, E., & Kaczmarek, L. (2010). Central noradrenergic lesion induced by DSP-4 impairs the acquisition of avoidance reactions and prevents molecular changes in the amygdala. *Neurobiol Learn Mem*, *94*, 303-311.

Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J. S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R. J., & Davis, R. J. (1995). Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem*, *270*, 7420-7426.

Roosendaal, B., Schelling, G., & McGaugh, J. L. (2008). Corticotropin-releasing factor in the basolateral amygdala enhances memory consolidation via an interaction with the beta-adrenoceptor-cAMP pathway: dependence on glucocorticoid receptor activation. *J Neurosci*, *28*, 6642-6651.

Rush, A. M., Wu, J., Rowan, M. J., & Anwyl, R. (2002). Group I metabotropic glutamate receptor (mGluR)-dependent long-term depression mediated via p38 mitogen-activated protein kinase is inhibited by previous high-frequency stimulation and activation of mGluRs and protein kinase C in the rat dentate gyrus in vitro. *J Neurosci*, *22*, 6121-6128.

Steinle, J. J., Chin, V. C., Williams, K. P., & Panjala, S. R. (2008). Beta-adrenergic receptor stimulation modulates iNOS protein levels through p38 and ERK1/2 signaling in human retinal endothelial cells. *Exp Eye Res*, *87*, 30-34.

Toyoda, H., Zhao, M. G., Xu, H., Wu, L. J., Ren, M., & Zhuo, M. (2007). Requirement of extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase for long-term potentiation in adult mouse anterior cingulate cortex. *Mol Pain*, *3*, 36.

Tsang, M. Y., & Rabkin, S. W. (2009). p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) is activated by noradrenaline and serves a cardioprotective role, whereas adrenaline induces p38 MAPK dephosphorylation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, *36*, e12-19.

Wang, Q., Walsh, D. M., Rowan, M. J., Selkoe, D. J., & Anwyl, R. (2004). Block of long-term potentiation by naturally secreted and synthetic amyloid beta-peptide in hippocampal slices is mediated via activation of the kinases c-Jun N-terminal kinase, cyclin-dependent kinase 5, and p38 mitogen-activated protein kinase as well as metabotropic glutamate receptor type 5. *J Neurosci*, *24*, 3370-3378.

Ying, S. W., Futter, M., Rosenblum, K., Webber, M. J., Hunt, S. P., Bliss, T. V., & Bramham, C. R. (2002). Brain-derived neurotrophic factor induces long-term potentiation in intact adult hippocampus: requirement for ERK activation coupled to CREB and upregulation of Arc synthesis. *J Neurosci*, *22*, 1532-1540.

Young, P. R., McLaughlin, M. M., Kumar, S., Kassis, S., Doyle, M. L., McNulty, D., Gallagher, T. F., Fisher, S., McDonnell, P. C., Carr, S. A., Huddleston, M. J., Seibel, G., Porter, T. G., Livi, G. P., Adams, J. L., & Lee, J. C. (1997). Pyridinyl imidazole inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase bind in the ATP site. *J Biol Chem*, *272*, 12116-12121.

Zhang, X. Q., Cui, Y., Chen, Y., Na, X. D., Chen, F. Y., Wei, X. H., Li, Y. Y., Liu, X. G., & Xin, W. J. (2011). Activation of p38 signaling in the microglia in the nucleus accumbens contributes to the acquisition and maintenance of morphine-induced conditioned place preference. *Brain Behav Immun*.

Zhen, X., Du, W., Romano, A. G., Friedman, E., & Harvey, J. A. (2001). The p38 mitogen-activated protein kinase is involved in associative learning in rabbits. *J Neurosci*, *21*, 5513-5519.

Zhong, P., Liu, W., Gu, Z., & Yan, Z. (2008). Serotonin facilitates long-term depression induction in prefrontal cortex via p38 MAPK/Rab5-mediated enhancement of AMPA receptor internalization. *J Physiol*, *586*, 4465-4479.



## Legends

**Figure 1. Inhibition of p38MAPK activity in BLA hinders IA LTM.** Rats trained in the IA task received intra-BLA infusions of vehicle (VEH), the p38MAPK inhibitor SB203508 (SB, 2-200  $\mu$ M) or its inactive analog SB202474 (200  $\mu$ M) immediately (0 min) or 180 min posttraining. Retention for IA long-term memory was evaluated in a non-reinforced test session carried out 24 h after training. \*\* =  $p < 0.01$  vs. VEH in Kruskal-Wallis test followed by Dunn's comparison. Data are presented as median  $\pm$  interquartile range;  $n=9$  per group.

**Figure 2. The amnesic effect of SB203508 is not due to reduced functionality of the BLA or state-dependency.** (A) Rats trained in IA received intra-BLA infusions of vehicle (VEH) or SB203508 (SB; 200  $\mu$ M) immediately after training. Long-term memory was evaluated in a test session carried out 24 h later (T1). \* =  $p < 0.05$  vs. VEH in Mann-Whitney U test). Immediately after T1, animals were re-trained, and retention was reassessed 24 h later (T2). Data are presented as median  $\pm$  interquartile range;  $n = 9$  per group. (B) Rats trained in IA received posttraining infusions as in (A), but were given intra-BLA infusions of VEH or SB 15 min before a retention test session carried out 24 h posttraining. \*\* =  $p < 0.01$  in Kruskal-Wallis test followed by Dunn's comparison. Data are presented as median  $\pm$  interquartile range;  $n = 8$  per group. (C) Rats were trained and treated as in (A), but short-term memory retention was evaluated 3 h after training. Data are presented as mean  $\pm$  interquartile range;  $n=9$  per group.

**Figure 3. IA training induces the  $\beta$ -adrenergic receptor-dependent activation of p38MAPK in BLA.** (A) Rats trained in IA were killed immediately (0 min), 30 min or 180 min after training, BLA dissected-out and the levels of total and dually phosphorylated p38MAPK were quantified by immunoblot. \*\* =  $p < 0.01$  vs naïve control animals in repeated measures ANOVA followed by Dunnett's comparison. Data are presented as mean  $\pm$  SEM;  $n = 8$  per group. (B) Rats trained in IA received intra-BLA infusions of vehicle (V) or of the  $\beta$ -adrenergic receptor antagonist timolol (T; 0.05-5 mM) immediately posttraining. Long-term memory was evaluated 24h later. Data are presented as median  $\pm$  interquartile range;  $n=7-8$  per group; \* =  $p < 0.05$  vs. V in Kruskal-Wallis test followed by Dunn's comparison. (C) Rats were trained as in (A) and immediately after training received intra-BLA vehicle (T 30 min) or timolol (+TIM; 5 mM). Thirty

min later, animals were sacrificed and the phosphorylation state of BLA p38MAPK was evaluated as in (B). \* =  $p < 0.05$  in paired Student's t-test. Data are presented as mean  $\pm$  SEM; n = 5 per group.

**Table 1: Intra-BLA infusion of SB203580 does not affect locomotor and exploratory activities or anxiety state.** SB203580 (200  $\mu$ M) was bilaterally infused (0.5  $\mu$ l) in the BLA 24 h before submitting rats to an open field or a plus maze behavioral session. Data are expressed as mean ( $\pm$  SEM) of the total number of entries, the number of entries into the open arms and the time spent in the open arms (Plus maze), and of the number of crossings and rearings (Open field). VEH = vehicle; n=7-8.

Figure 1  
[Click here to download high resolution image](#)

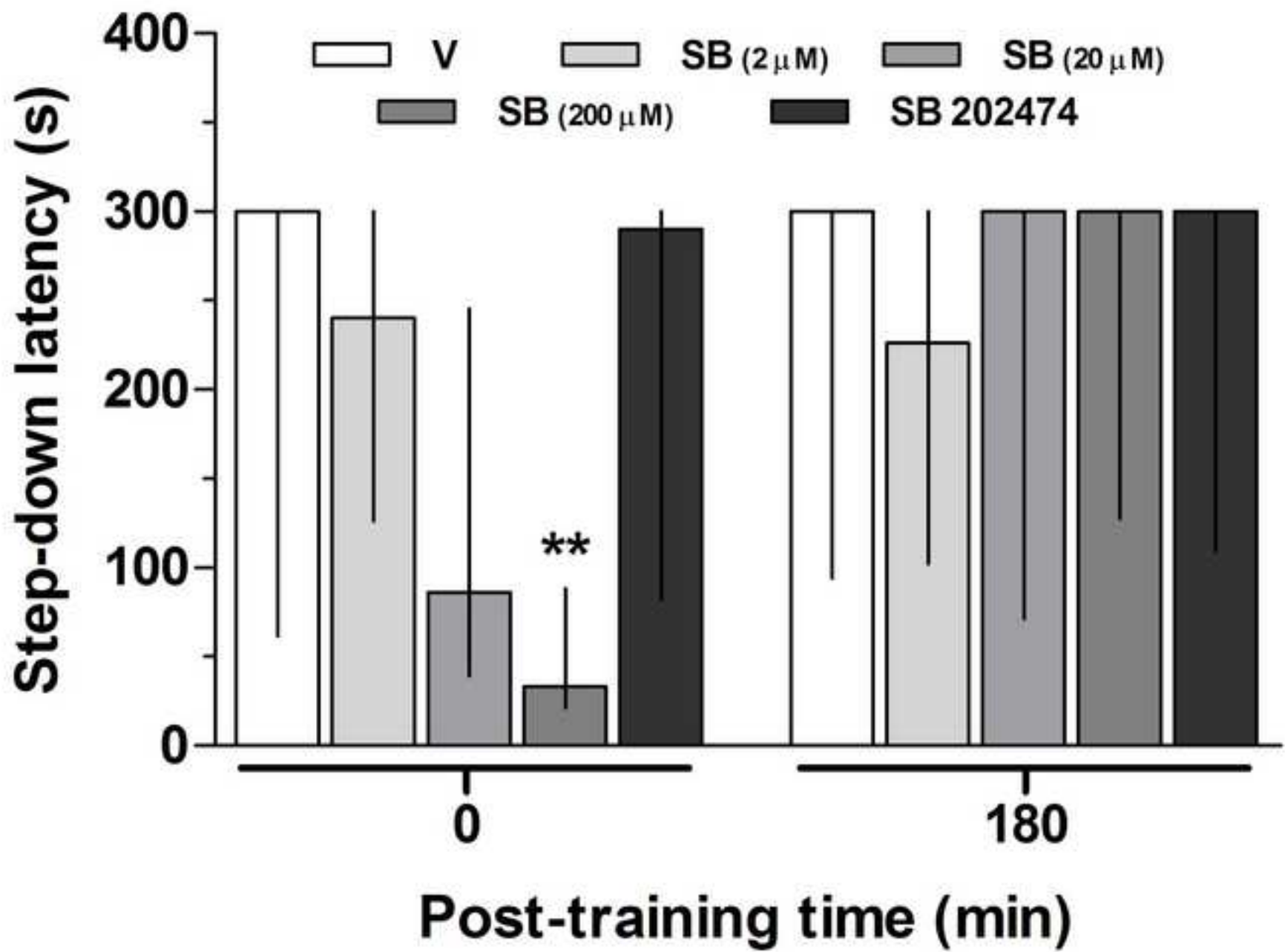


Figure 2  
[Click here to download high resolution image](#)

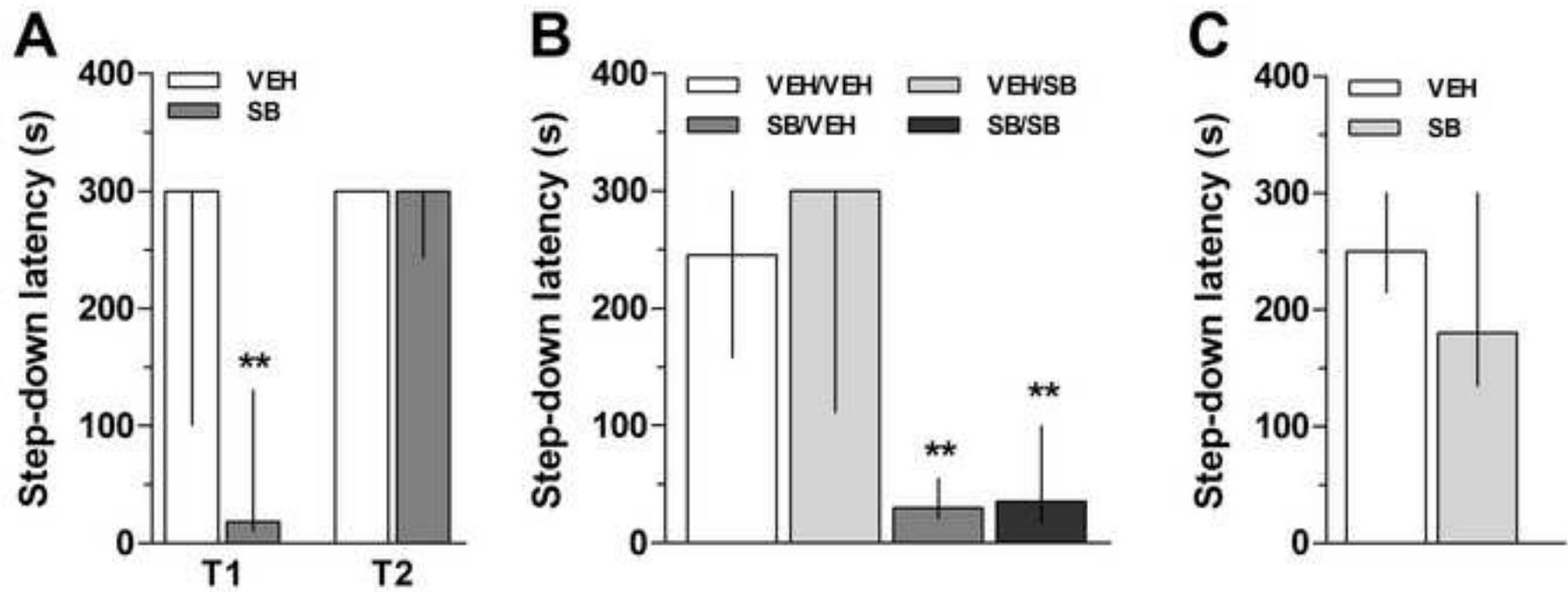
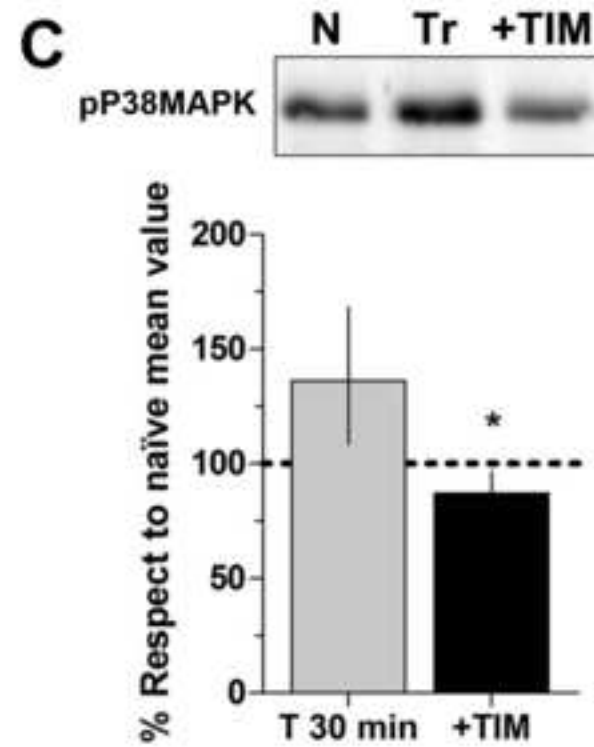
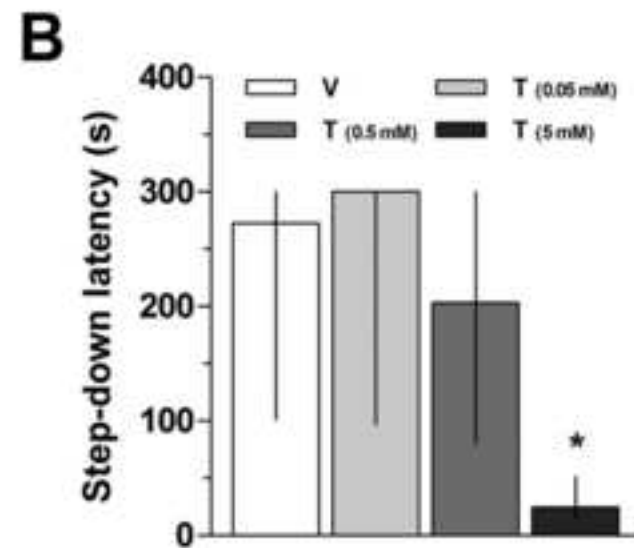
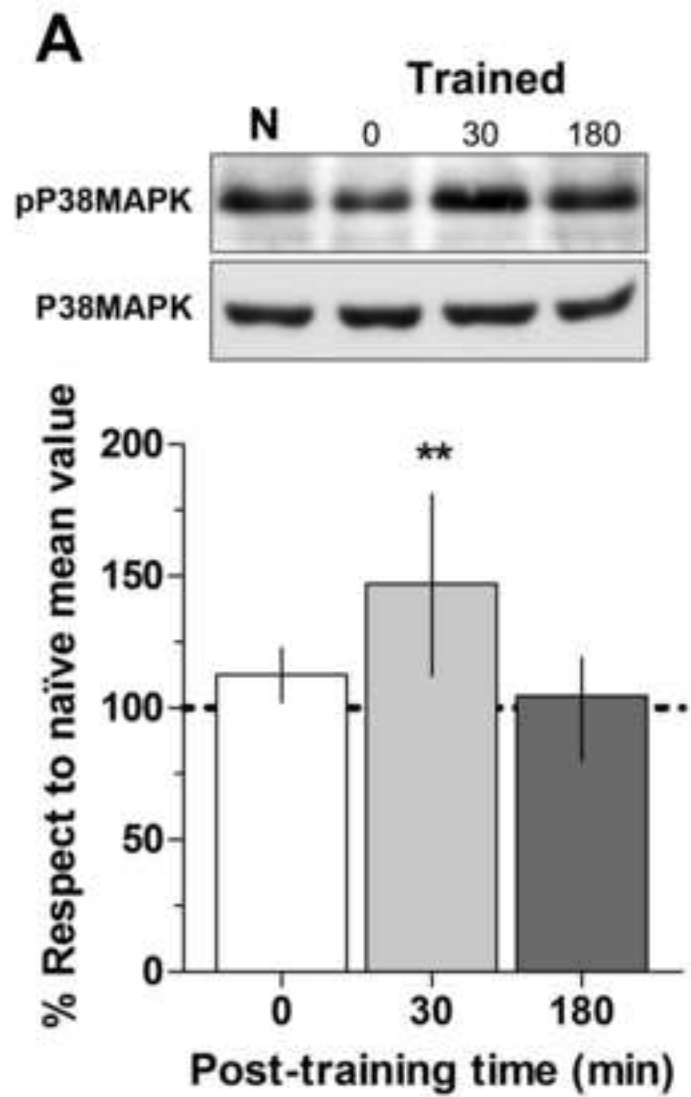


Figure 3  
[Click here to download high resolution image](#)



**Table 1**

	<b>VEH</b>	<b>SB203580</b>
<b>Total Entries</b>	15.3 ± 1.1	16.9 ± 1.6
<b>Entries in Open Arms</b>	7.6 ± 0.8	7.2 ± 0.9
<b>% Time in Open Arms</b>	28.3 ± 2.9	26.1 ± 3.7
<b>Crossings</b>	63.1 ± 5.8	69.2 ± 6.8
<b>Rearings</b>	20.3 ± 3.1	19.6 ± 2.9

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em resumo, os achados deste trabalho nos permitem concluir que:

- A atividade da p38MAPK é necessária na BLA imediatamente, mas não 180 minutos após o treino, para que ocorra a consolidação da LTM associada ao aprendizado da EI no rato adulto. Isto é sugerido pelo fato de que o inibidor SB203580 provocou amnésia de maneira dose-dependente, sem efeito do seu análogo inativo SB202474, em um teste 24 horas após o treino (Fig. 1 do artigo).
- A atividade da p38MAPK não é necessária na BLA para a formação da STM associada com a EI, uma vez que o inibidor SB203580 não provocou amnésia quando o teste foi executado 3 horas após o treino (Fig. 2C do artigo).
- A evocação da LTM associada com a EI não requer a atividade da p38MAPK na amígdala. Isto é sugerido pelo fato que a infusão pré-teste do inibidor SB203580 não provocou amnésia (Fig. 2B do artigo).
- A amnésia provocada pela inativação da p38MAPK na BLA não é devido a mecanismos de dependência de estado, uma vez que os animais que receberam o inibidor SB203580 pós-treino foram amnésicos independente de receberem veículo ou SBS203580 pré-teste (Fig. 2B do artigo).
- A amnésia provocada pela inativação da p38MAPK não é devido à destruição da integridade da BLA, uma vez que esta pôde ser revertida através do retreino na tarefa (Fig. 2A do artigo).
- A inativação da p38MAPK na BLA não afeta os níveis de ansiedade, nem prejudica a atividade locomotora, de modo que a amnésia observada não é devido a efeitos inespecíficos, pois o inibidor SB203580 administrado 24 horas antes do teste nas tarefas de campo aberto e labirinto em cruz elevado não teve nenhum efeito (Tabela 1 do artigo).

- O treino na EI induz um aumento rápido (em até 30 minutos) e transitório (menor do que 180 minutos), nos níveis de p38MAPK fosforilada na BLA (Fig. 3A do artigo).
- A fosforilação da p38MAPK na BLA induzida pelo treino na EI é provocada pelo sistema noradrenérgico, através da ativação de receptores beta-adrenérgicos. Isto é sugerido pela inibição da fosforilação da p38MAPK pelo antagonista timolol (Fig. 3C do artigo).

Estes achados confirmam a participação da p38MAPK na amígdala basolateral durante a formação de uma memória aversiva, e demonstram, pela primeira vez, que esta ativação é mediada pelos receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Os mecanismos bioquímicos que ocorrem após a ativação destes receptores, entretanto, ainda precisam ser investigados detalhadamente. Devido ao padrão de ativação precoce da quinase, restrito aos momentos iniciais após o treino na EI, pode-se especular que a fosforilação do fator de transcrição CREB, e a indução de genes imediatos como *c-fos*, *zif268* e *Arc* (também dependentes da ativação de CREB), sejam possíveis substratos da p38MAPK. Estes, em última instância, podem regular a transmissão glutamatérgica através da modificação da atividade ou inserção de receptores AMPA nas sinapses ou alterações na sua morfologia.