

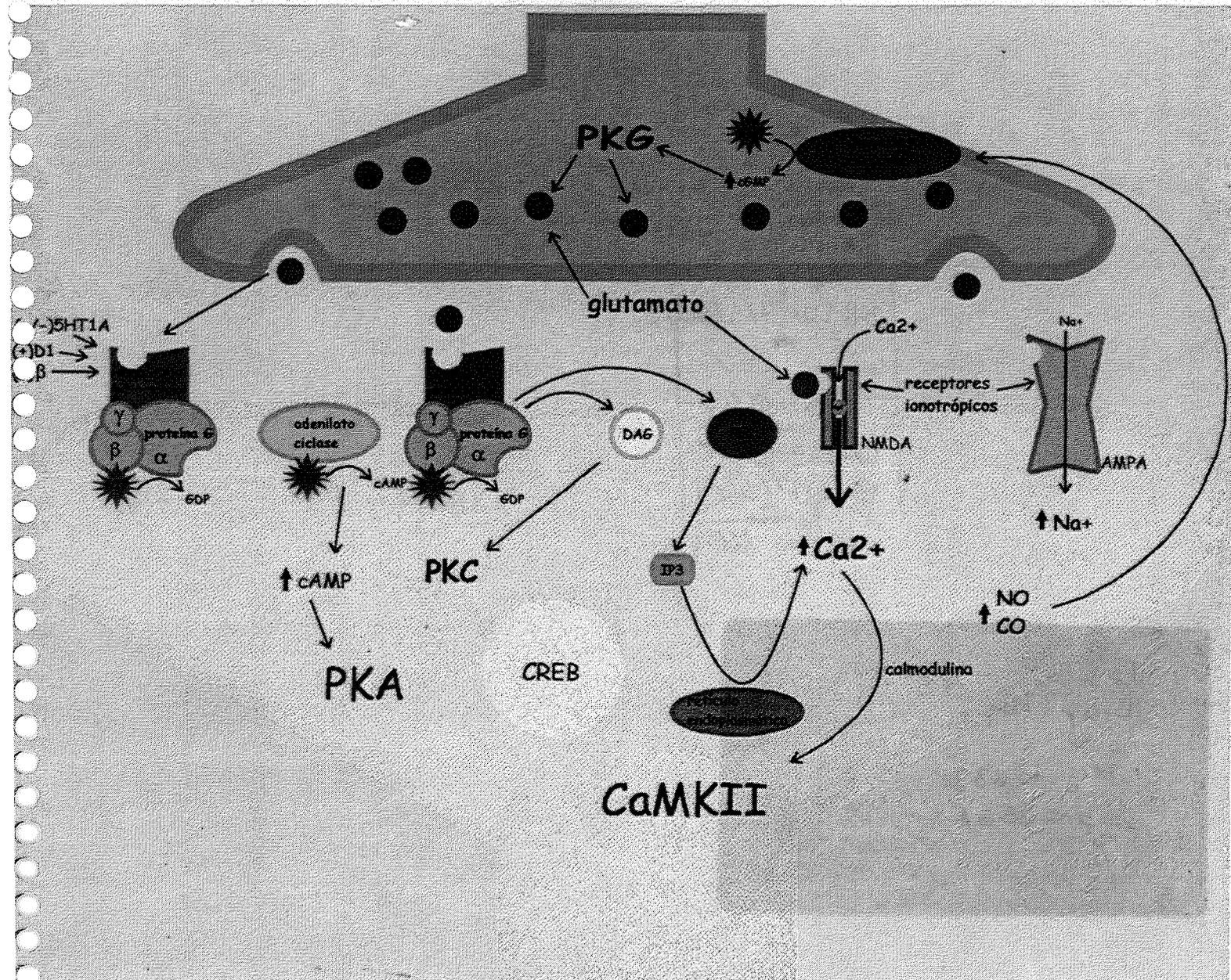
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Papel das Enzimas PKA e CaMKII na Formação da Memória

Luciana Adriana Izquierdo

Dissertação de Mestrado



Orientador: Prof. Dr. Iván Antonio Izquierdo

Porto Alegre, Fevereiro de 1999

Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao meu marido, Juan e ao meu filho, Felipe. O apoio e carinho destas duas pessoas especiais, foram o meu maior incentivo.

Ao Prof. Izquierdo, por toda sua paciência e compreensão e por ter confiado na minha capacidade.

À minha Mãe, Nona, irmãs, Sarina e Paola e irmão, Edgar por, mesmo de formas diferentes, terem me apoiado nestes 2 anos.

Ao pessoal do grupo que eu costumo chamar de "família": Patrícias (Ardenghi e Pereira), Cleverson, Márcias (Souza e Sant'Anna), Roger, Rafael, Nadja, Tadeu, Marino, Fernanda, Mônica, João, Beatriz, Olavo, Isabel, Flávio, Jennifer, Eugênio e Rafaela, por terem aturado meu humor "oscilante" nos últimos meses e, principalmente, à Daniela, que é muito mais que uma amiga, é uma "super amiga".

À Elke, por suas sábias palavras na hora em que precisei.

Ao Alex, Carla, Jorge, Bia, Renata e todas as pessoas que me acompanham desde 1987, e que me incentivaram a ingressar no Mestrado.

Aos funcionários da secretaria de Pós-graduação, por sua atenção às minhas infundáveis dúvidas.

Aos funcionários do reatário pela valorosa colaboração.

Índice

Abreviaturas	1
Resumo	3
Introdução	4
Ativação da PKA e CaMKII	6
Atividade da PKA	7
Atividade da CaMKII	8
Objetivos	9
Material e Métodos	10
Animais de Experimentação	10
Implantação de Cânulas	10
Tarefas	11
Figura 1	13
Figura 2	13
Figura 3	13
Drogas	14
Procedimentos de Infusão	16
Experimentos	17
Resultados	21
Localização Histológica dos Sítios de Infusão	25
Figura 4	25
Discussão	26
Conclusões	31

Referências Bibliográficas	33
Trabalhos que fazem parte desta tese	42
Anexos (1 - 7)	44

Abreviaturas

- ACTH - hormônio adrenocorticotrópico
AMI - amígdala
ATP - adenosina 5'-trifosfato
AMPA - receptor ionotrópico sensível ao ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolone propiônico
8-Br - 8-Br-cAMP, análogo do cAMP
 Ca^{2+} - íon cálcio
CA1 - região do hipocampo
CaMKII - proteína quinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina
cAMP - adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico
CE - córtex entorrinal
CEC - choque eletroconvulsivo
cGMP - guanosina 3', 5'-monofosfato cíclico
CNQX - 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2, 3-diona
CREB - elemento responsivo à união do cAMP
DAG - diacilglicerol
DPAT - 8-hidroxi-2-(di- η -propilamina) tetralina
EI - esquiva inibitória
 β -end - β -endorfina
ERK - quinase regulada extracelularmente
ESTAU - estaurosporina
 $GABA_A$ - ácido γ -aminobutírico tipo A
HAB - habituação
HAB 'WF" - habituação com "water finding"
HIPO - hipocampo
IP3 - "inositol 1, 4, 5- trifosfato
 K^+ - íon potássio
KN - 1-(*N*-*O*-bis(5-isoquinolinasulfonila-*N*-metil-L-tirosila)-4-fenil piperazina
KT - $C_{32}H_{31}N_3O_5$ hexilester de K252a
KT5823 - KT5823
LAV 0.1 - lavendustina 0,1 μ g, lado
LAV 0.5 - lavendustina 0,5 μ g, lado
LTM - memória de longa duração
LTP - potenciação de longa duração
LY - LY83,583

MAPK - proteína quinase ativada por mitogênio

Mg⁺ - íon magnésio

mGluR - receptor glutamatérgico metabotrópico

MUS - muscimol

NAN - 1-(2-metoxifenil)-4-(4-(2-ftalimido))butilpiperazina

NE - norepinefrina

NMDA - N-metil-D-aspartato

NO - óxido nítrico

PD - PD098059

PKA - proteína quinase dependente de cAMP

PKC - proteína quinase dependente de Ca²⁺-diacilglicerol

PLC - fosfolipase C

SCH - 7-cloro-2,3,4,5-tetrahydro-3-metil-5-fenil-1-*H*-3-benzazepina 7-ol

SKF - 2, 3, 4, 5-tetrahydro-7, 8-dihidroxi-1-fenil-1-*H*-3-benzazepina
hidroclorídio

STM - memória de curta duração

TIM - timolol

VASO - vasopressina

Resumo

Ratos machos *Wistar* foram submetidos ao implante bilateral de cânulas na região CA1 do hipocampo, no córtex entorrinal e na amígdala.

Os animais foram expostos à uma sessão de treino em diversas tarefas comportamentais e receberam infusões bilaterais de diversas drogas nas estruturas citadas acima em horários diferentes ou i.p. 10 min. antes do treino.

As drogas usadas foram àquelas que atuam diretamente nas duas enzimas (KT5720, KN62) ou indiretamente através de agonistas e antagonistas de receptores que ativam as cascatas metabólicas iniciadas pela PKA e pela CaMKII (SKF38393, SCH23390, norepinefrina, timolol, muscimol, 8-HO-DPAT, NAN-190, CNQX) e afetam passos para a ativação destas enzimas (8-Br-cAMP, LY83583) ou também que atuam em outras cascatas metabólicas (lavendustina A 0,1, lavendustina A 0,5, KT5823, estaurosporina, PD098059).

Os testes foram feitos 24 h após o treino ou em duas etapas: 1,5 h e 24 h após o treino, afim de medir a Memória de Curta Duração (STM) e a Memória de Longa Duração (LTM).

Os resultados dos experimentos demonstraram que as enzimas PKA e CaMKII atuam em tempos e formas diferentes na formação da memória nas três estruturas cerebrais e que a STM é um processo separado da LTM.

Introdução

O hipocampo (HIPO), a amígdala (AMI) e o córtex entorrinal (CE) estão interconectados por duas vias diferentes e, provavelmente, o papel destas três estruturas na formação da memória, principalmente aversiva, ocorra de maneira coordenada (21,24). O HIPO processa informações espacial e contextual (17,27), a AMI faz o mesmo com as informações de caráter emocional ou aversivo (27) e o CE integra as informações procedentes do HIPO e da AMI após a aprendizagem (53).

A aprendizagem de uma tarefa de esQUIVA inibitória (EI), dispara no HIPO do rato uma série de cascatas bioquímicas, as quais são necessárias para a memorização da mesma. Estes processos bioquímicos são similares tanto para os descritos para as fases de indução e manutenção da Potenciação de Longa Duração (LTP), como para outros tipos de mecanismos de plasticidade neuronal (4,9,16,34,35). A LTP representa uma modificação duradoura da eficiência sináptica, a qual tem sido proposta como um modelo molecular para o estudo de certas formas de memória (10).

As cascatas bioquímicas mencionadas acima, dão início à fosforilação proteica, um processo chave que regula a função celular (44).

As proteína quinases são enzimas que usam adenosina 5'-trifosfato (ATP) como doador do grupo fosfato (32) e são classificadas como proteína quinase serina-treonina, que fosforila substratos proteicos nos resíduos serina e treonina e como proteína quinase tirosina, que fosforila substratos proteicos no resíduo de tirosina. O íon magnésio (Mg^{+}), é requerido para esta reação (41). A introdução de um grupo fosfato, carregado negativamente, pode alterar a

conformação de uma proteína para que esta modifique a função de um substrato (e.g. enzimas, proteínas do citoesqueleto, subunidade de um canal de íon, ativador transcripcional).

As consequências da ativação de proteína quinases são diversas e incluem: potenciação ou redução da corrente mediada por receptor e dessensitização de receptores (43). A fosforilação de receptores parece ser necessária para a manutenção da integridade funcional de alguns receptores (41).

As proteína quinases melhores estudadas no cérebro são todas aquelas ativadas pelo sistema de segundo mensageiros como a proteína quinase dependente de cAMP (PKA), proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina tipo II (CaMKII), proteína quinase dependente de cGMP (PKG), proteína quinase dependente de cálcio, diacilglicerol (PKC), proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK) (41).

Portanto, proteína quinases dependentes de sistemas de segundos mensageiros, não somente modificam proteínas pré existentes, como também podem induzir a síntese de novas proteínas, alterando a expressão gênica, podendo levar a outras mudanças durando dias que, provavelmente, são importantes para o desenvolvimento neuronal e para a LTM (32).

Oportunidades de interação ou *crosstalk* ocorrem, porque enzimas individuais, canais de íon ou enzimas do citoesqueleto podem ser modificadas em mais de um sítio na molécula por proteína quinases dependentes de diferentes segundo mensageiros (32).

Ativação da PKA e da CaMKII

O aminoácido glutamato é o transmissor excitatório mais abundante no cérebro e espinha dorsal (23,25). Ao ser liberado na fenda sináptica pela despolarização da membrana neuronal pré-sináptica, o glutamato se liga aos receptores ionotrópicos que produzem uma resposta sináptica rápida e aos receptores metabotrópicos que produzem uma resposta sináptica mais lenta.

Estes receptores pós-sinápticos são:

- o receptor ionotrópico AMPA (sensível ao ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolone-propiónico) cuja ativação permite a entrada de íons sódio na célula, causando despolarização da membrana;

- o receptor ionotrópico NMDA (sensível à N-metil-D-aspartato) que, com a membrana despolarizada, expulsa o íon Mg^+ que bloqueia seu canal, fazendo com que haja uma grande entrada de íons cálcio (Ca^{2+}) na célula;

- o receptor metabotrópico que, através da proteína G, estimula a adenilato ciclase, que aumenta os níveis de cAMP (adenosina 3', 5'-monofosfato cíclico) e, através da fosfolipase C (PLC), ativa o inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP3), que mobiliza as reservas de Ca^{2+} do retículo endoplasmático, contribuindo no aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular.

O aumento do cAMP ativa a PKA e o Ca^{2+} se liga à calmodulina ativando a CaMKII.

Atividade da PKA

A PKA é composta por subunidades catalítica e regulatória (onde se ligará o cAMP). Esta enzima fosforila os aminoácidos serina ou treonina em sítios específicos em várias proteínas (41), entre as quais, canais de Ca^{2+} , fosfolipase C (PLC) (que modulam a concentração de cálcio intracelular), proteína quinase quinase ativada por mitogênio (MAPKK) (2), elemento responsivo à união do cAMP (CREB), receptores glutamatérgicos AMPA (43), receptores noradrenérgicos β (atuando como *feedback* negativo).

A atividade da PKA tem dois picos. Um à 0 h e outro de 3 a 6 h após o treino em tarefa de EI (26).

Os sistemas modulatórios que têm receptores ligados à proteína G, que regulam a atividade da PKA através da estimulação ou inibição da adenilato ciclase são os noradrenérgico (receptores β) e dopaminérgico (receptores D1) que estimulam e o serotoninérgico (receptores 5HT1A) que inibe sua atividade entre 3 e 6 h após o treino em EI (5,8). Em *Aplysia*, a serotonina produz uma excitação sináptica lenta, fechando os canais de K^+ , ativando a produção de cAMP (41).

A PKA pode ser ativada indiretamente, através da estimulação da adenilato ciclase tipo II, abundante no hipocampo e córtex, pela PKC (54).

Atividade da CaMKII

A enzima CaMKII tem um domínio regulatório que, em estado basal, se liga ao domínio catalítico, inibindo-o. Esta inibição é desfeita, quando o Ca^{2+} /calmodulina liga-se ao domínio regulatório/ ativando a enzima (41).

A CaMKII é a proteína quinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina melhor caracterizada de sua família. Esta enzima fosforila tirosina hidroxilase, sinapsina I, canais de Ca^{2+} , fatores de transcrição e receptores glutamatérgicos, entre outras proteínas (44). O receptor Ras é fosforilado pela CaMKII, ativando a cascata da MAPK (41).

A atividade da CaMKII mantém-se alta nas 2 h seguintes ao treino em tarefa de EI e seu pico é visto imediatamente após o treino (6).

Objetivos

Este trabalho tem por objetivo analisar o papel das enzimas PKA e CaMKII na formação da memória, através de infusão intracerebral em vários tempos, no hipocampo, córtex entorrinal e amígdala, de agonistas e antagonistas de receptores envolvidos, direta ou indiretamente, em suas cascatas; bem como de ativadores e inibidores destas enzimas na memória de tarefas diversas.

O curso dos experimentos 1, 2 e 3, nos levou a estudar a divisão da memória STM e LTM. Define-se a STM, como àquela que se encarrega da função mnemônica durante o longo período de formação da LTM, que é de 3 a 6 h após o treino em tarefa de EI (26,37).

Conseguimos demonstrar que a STM e a LTM obedecem a processos separados, respondendo, assim, uma pergunta de mais de 100 anos (31,37).

Material e Métodos

Animais de Experimentação

Foram usados ratos machos Wistar, de 2,5 a 3 meses de idade, pesando entre 220 e 340 g, provenientes dos Biotérios do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS e do Departamento de Bioquímica da UFRGS. Os animais receberam água e ração padronizada "ad libitum" e foram submetidos a um ciclo claro,escuro de 12 horas. A temperatura foi mantida constante em torno de 23° C.

Implantação de Cânulas

Os animais foram anestesiados com tionembutal e submetidos ao implante bilateral de cânulas-guia de aço inoxidável calibre 30-gauge, 1 mm acima das seguintes estruturas:

- junção entre o núcleo central e basolateral da amígdala, AMI (A-2.3, L+4.5, V5>4);
- área CA1 do hipocampo dorsal, CA1 (A-4.3, L+4.0, V3.4);
- córtex entorrinal, CE (A-7.0, I5.0, V8.4).
- As coordenadas estão em mm, de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (42) e são idênticas às empregadas em estudos anteriores (27).

Tarefas

Tarefa de Esquiva Inibitória (EI). O aparato da EI consiste em uma caixa de madeira com a parte frontal de acrílico transparente, medindo 50x25x25 cm. O assoalho da caixa é uma grade de barras de bronze paralelas de 0,1 cm de calibre, separadas entre si por 1 cm. Na parte esquerda, sobre a grade, há uma plataforma de fórmica com 7 cm de largura e 2,5 cm de altura. A tarefa consiste em colocar o animal na plataforma, virado para o fundo da caixa até que ele desça para a grade. Neste instante, o animal recebe um choque de 0,3 ou 0,4 mA por 2 seg. O tempo da descida do animal com as quatro patas da plataforma na grade é chamado de latência. Na sessão de teste, 24 h após o treino, o choque é omitido e o teto da latência é de 180 seg. O aumento da latência entre as sessões de treino e teste, é usado como uma medida de memória (Fig. 1).

Tarefa de Habituação ao Campo Aberto (Hab). O aparato da Hab é uma caixa de madeira com a parte frontal de vidro transparente, medindo 60 cm de largura, 40 cm de profundidade e 50 cm de altura. O chão é dividido em 12 quadrados com linhas pretas.

A tarefa consiste em colocar o animal no quadrante esquerdo do fundo virado para o canto e deixar que ele explore a caixa livremente por 2 min. O tempo para sair do primeiro quadrante, o nº de cruzamentos das linhas pretas no chão e o nº de respostas de *rearing* são registrados. A diminuição do nº de cruzamentos e respostas de *rearing* entre as sessões de treino e teste, é usada como uma medida de habituação (Fig. 2).

Tarefa de Habituação ao Campo Aberto com *water finding* (Hab WF).

O aparato da Hab WF é o mesmo descrito acima, porém com um tubo de metal adaptado na parede do fundo da caixa, a 10 cm do chão. Este tubo está acoplado a uma garrafa de vidro com água, colocada fora da caixa, idêntica às usadas pelos animais diariamente.

Nesta tarefa, é medida a habituação e o tempo gasto para achar o tubo de água. Após o treino, os animais são privados de água até a sessão de teste, 24 h após. A diminuição da latência de achar o tubo de água entre as sessões, é usada como uma medida de memória desta tarefa (Fig. 3).

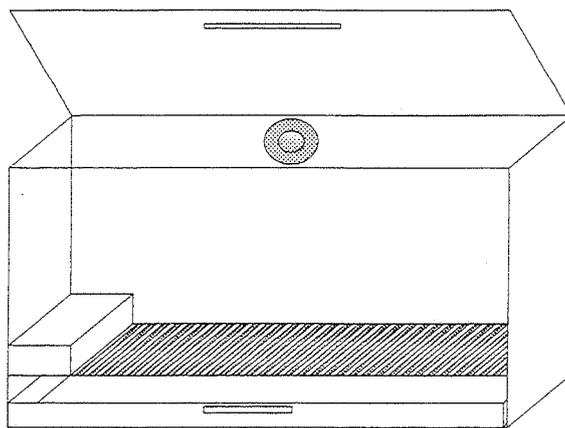


Fig. 1: Aparato de Esquiva Inibitória

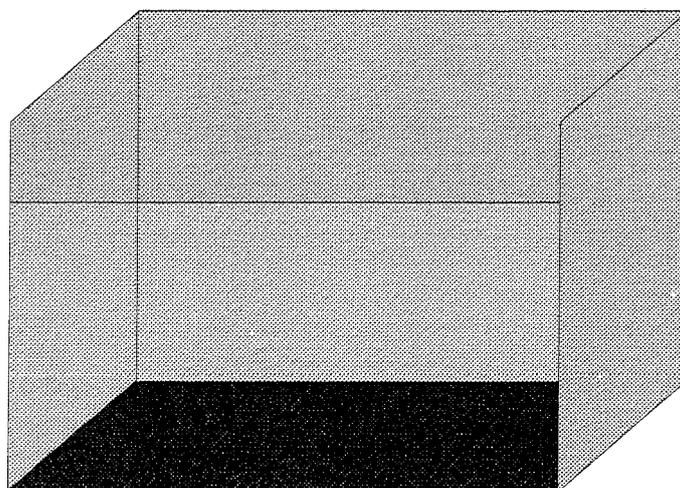


Fig. 2: Aparato de Habituação

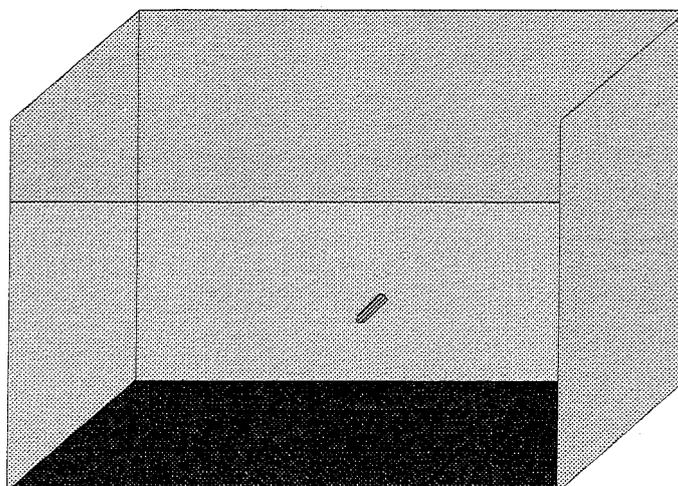


Fig. 3: Aparato de Habituação com "water finding"

Drogas

O volume de infusão de todas as drogas infundidas bilateralmente em qualquer das regiões acima citadas foi de 0,5 μ l/lado e as injetadas i.p. foi de 1 ml/kg.

Drogas diluídas em salina (SAL)

ACTH - hormônio adrenocorticotrópico, ACTH₁₋₂₄ (0,2 μ g/kg)

VASO - peptídeo neurohipofisário, lisina-vasopressina (10 μ g/kg)

β -end - peptídeo opióide, β -endorfina (1 mg/kg)

SKF - SKF38393 - agonista de receptores dopaminérgicos tipo D1 (7,5 μ g/lado)

SCH -SCH23390- antagonista de receptores dopaminérgicos tipo D1 (0,5 μ g/lado)

NE - Norepinefrina C1H (0,3 μ g/lado)

TIM - Timolol C1H - bloqueador de receptores noradrenérgicos tipo β (0,3 μ g/lado)

PD - PD098059 - inibidor da proteína quinase ativada por mitogênio, MAPKK (0,05 μ g/lado)

MUS - Muscimol - agonista de receptores gabaérgicos GABA_A (ácido γ -aminobutírico tipo A) (0,5 μ g/lado)

Drogas diluídas em veículo (VEI) (20% de dimetilsulfoxido em salina)

8-Br - 8-Br-cAMP - análogo do cAMP (adenosina 3',5' monofosfato) (1,25 μ g/lado)

KT - KT5720 - inibidor da proteína quinase dependente de cAMP, PKA (0,5 µg/lado)

KN - KN62 - inibidor da proteína quinase dependente de Ca²⁺/calmodulina, CaMKII (3,5 µg/lado)

DPAT - 8-HO-DPAT (8-hidroxi-2-(di-η-propilamino) tetralina) agonista de receptores serotoninérgicos tipo 5HT_{1A} (5-hidroxi triptofano tipo A) (2,5 µg/lado)

NAN - NAN-190 (1-(2-metoxifenil)-4-(4-(2-fetalimido)) butilpiperazina) antagonista de receptores serotoninérgicos tipo 5HT_{1A} (2,5 µg/lado)

CNQX - (6-ciana-7-nitroquinoxalina-2, 3-diona), antagonista de receptores glutamatérgicos AMPA (sensível ao ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolone propiônico) (0,5 µg/lado)

LY - LY83583 - inibidor da enzima guanilil ciclase (2,5 µg/lado)

LAV 0,1 - Lavendustina A 0,1 - inibidor da tirosina proteína quinase (0,1 µg/lado)

LAV 0,5 - Lavendustina A 0,5 - inibidor da proteína quinase dependente de cGMP (guanosina 3', 5'-monofosfato cíclico), PKG (0,5 µg/lado)

KT5823 - KT5823 - inibidor da proteína quinase dependente de cGMP, PKG (2 µg/lado)

ESTAU - Estaurosporina - inibidor da proteína quinase dependente de Ca²⁺, diacilglicerol, PKC (2,5 µg/lado)

Procedimento de Infusão

Uma cânula de infusão, calibre 30-gauge, acoplada a uma seringa *Hamilton*, foi introduzida primeiro em uma cânula-guia por 30 s, afim de que a droga difundisse no sítio de infusão e, logo após, na outra cânula.

Experimentos

Experimento 1

Os animais foram treinados e testados 24 h após em tarefa de EI. Os ratos de todos os grupos receberam, 10 min antes do teste, injeção i.p. de SAL ou ACTH ou VASO, dissolvidas em salina.

Grupo 1: os animais receberam injeção i.p. de SAL ou β -end imediatamente após o treino.

Grupo 2: os animais receberam choque eletroconvulsivo, CEC (15 mA, 60 Hz, 2 seg), transmitido através de eletrodos transcorneais, imediatamente após o treino. Nos ratos controles, foram colocados os eletrodos, porém o choque foi omitido.

Grupo 3: os animais receberam infusão bilateral no CA1 de VEI ou KN, imediatamente após o treino.

Grupo 4: os animais receberam infusão bilateral no CA1 de VEI ou KT, 3 h após o treino.

Experimento 2

Os animais treinados e testados 24 h após em tarefa de EI. No grupo 1, os animais foram implantados bilateralmente no CA1 e na AMI.

Grupo 1: os animais receberam infusão bilateral imediatamente após o treino, na AMI, de VEI ou KN e, 3 h após o treino, no CA1, de 8-Br, SKF, NE ou VEI.

Experimento 3

Os animais foram submetidos às tarefas de Hab WF e Hab, com duração de 2 min. cada e com intervalo de 24 h entre treino e teste em cada tarefa.

Grupo 1: os animais foram colocados na caixa de Hab WF e deixados explorando a área por 2 min. mais o tempo gasto no tubo de água. Imediatamente após o treino, os animais receberam infusão intrahipocampal de KN ou VEI e foram privados de água até a hora da sessão de teste.

Grupo 2: idem ao grupo 1, porém sem o tubo de água.

Grupo 3: os animais receberam infusão bilateral de KN ou VEI no CA1, foram privados de água por 24 h e expostos à uma sessão de Hab.

Experimento 4

Os animais foram submetidos à tarefa de EI.

Grupo 1: os animais receberam infusão bilateral imediatamente após o treino, no CA1 e CE, de SAL ou VEI ou CNQX ou MUS ou DPAT ou NAN e foram testados 1,5 h e 24 h após o treino, para medir a STM e a LTM, respectivamente.

Grupo 2: os animais receberam infusão bilateral imediatamente após o treino das drogas que deprimiram a STM nas duas estruturas (DPAT no CA1 e MUS, CNQX e NAN no CE) e foram testados 1,5, 3 e 4,5 h após o treino.

Experimento 5

Os animais foram submetidos à tarefa de EI.

Grupo 1: os animais receberam infusão bilateral imediatamente após o treino, no CA1 e no CE, de SAL ou VEI ou SKF ou SCH ou TIM ou DPAT ou NAN ou NE e foram testados 1,5 h e 24 h após o treino, para medir a STM e a LTM, respectivamente.

Grupo 2: os animais receberam infusão bilateral das drogas que deprimiram a STM nas duas estruturas (DPAT no CA1 e MUS, CNQX e NAN no CE), 6 min. antes do teste de STM e receberam infusão bilateral das drogas que tiveram algum efeito na STM nas duas estruturas (SKF, SCH e 8-HO-DPAT no CA1 e SKF, SCH, NE, TIM, DPAT e NAN no CE) 1,5 h antes do teste de LTM.

Experimento 6

Os animais foram submetidos à tarefa de EI.

Grupo 1: os animais receberam infusão bilateral imediatamente após o treino no CA1 e no CE de LY ou LAV 0,1 ou LAV 0,5 ou KT5823 ou ESTAU ou KN ou KT ou PD ou SAL ou VEI e foram testados 1,5 h e 24 h após o treino, para medir a STM e a LTM, respectivamente.

Grupo 2: os animais receberam infusão bilateral 10 min. antes do teste de STM, da droga que inibiu a STM sem afetar a LTM.

Experimento 7

Os animais foram submetidos à tarefa de EI.

Grupo 1: os animais receberam infusão bilateral de KT ou VEI a 0, 22 ou 45 min após o treino no CA1 e foram testados 1,5 e 24 h após o treino, para medir a STM e a LTM, respectivamente.

Grupo 2: os animais receberam infusão bilateral de KT ou VEI aos 90, 135 ou 175 min após o treino no CA1 e foram testados 3 e 24 h após o treino, para medir a STM e a LTM, respectivamente.

Resultados

Experimento 1

Grupo 1: a injeção pré-teste de ACTH ou VASO, reverteu o efeito amnésico causado pela administração de β -end imediatamente após o treino (Anexo 1, fig. 1).

Grupo 2: a injeção pré-teste de ACTH ou VASO, reverteu o efeito amnésico causado pelo CEC dado imediatamente após o treino (Anexo 1, fig. 1).

Grupo 3: a injeção pré-teste de ACTH ou VASO não reverteu o efeito amnésico causado pela infusão de KN, imediatamente após o treino (Anexo 1, fig. 2).

Grupo 4: a injeção pré-teste de ACTH ou VASO não reverteu o efeito amnésico causado pela infusão de KT, 3 h após o treino (Anexo 1, fig. 2).

Experimento 2

Grupo 1: a infusão no CA1 de 8-Br, NE e SKF, 3 h após o treino, causou um aumento da memória dos animais que receberam infusão na AMI de KN, imediatamente após o treino (Anexo 2, fig. 2).

Grupo 2: a infusão no CA1 de 8-Br, NE e SKF, 3 h após o treino, não alterou o efeito amnésico causado pela infusão de KN no CA1, imediatamente após o treino (Anexo 2, fig. 3).

Experimento 3

Grupo 1: a infusão bilateral no CA1 de KN, prejudicou a tarefa de *water finding*, mas não a tarefa de Hab (Anexo 3, fig. 1 e 2a).

Grupo 2: a infusão bilateral no CA1 de KN, prejudicou a tarefa de Hab (Anexo 3, fig. 2b).

Grupo 3: a performance de respostas de rearing e cruzamentos nesta sessão não foi diferente entre os grupos, mas foi mais baixa que na sessão de treino dos grupos 1 e 2 (Anexo 3, tab. II).

Experimento 4

Grupo 1: a infusão no CA1 de CNQX e MUS prejudicou a STM e a LTM; NAN não teve efeito e DPAT bloqueou a STM sem afetar a LTM (Anexo 4, fig. 1a). A infusão na CE de CNQX, MUS e NAN bloqueou a STM sem alterar a LTM e DPAT aumentou a STM e bloqueou a LTM (Anexo 4, fig. 1b).

Grupo 2: o efeito, sobre a STM, da infusão de DPAT no CA1, não foi mais visto às 3 h depois do treino (Anexo 4, fig. 1c) e o efeito sobre a STM da infusão CNQX, MUS e NAN no CE durou 3 h após o treino (Anexo 4, fig. 1d).

Experimento 5

Grupo 1: a infusão no CA1 de SKF e DPAT inibiu a STM sem afetar a LTM; SCH aumentou a STM sem alterar a LTM; de TIM e NAN não teve efeito e de

NE não alterou a STM mas aumentou a LTM (Anexo 5, fig. 1A). A infusão no CE de SKF deprimiu a STM e aumentou a LTM; de NAN e TIM deprimiu a STM e não alterou a LTM e de DPAT e SCH aumentou a STM e deprimiu a LTM (Anexo 5, fig. 1B).

Grupo 2: nenhuma das drogas que inibiram a STM tiveram efeito na performance da sessão de teste da STM, dadas 6 min. antes deste (Anexo 5, fig. 2A e 2B). Nenhuma das drogas que afetaram a STM tiveram efeito na performance da sessão de teste de LTM, dadas 1,5 h antes deste (Anexo 5, fig. 2C e 2D).

Experimento 6

Grupo 1: a infusão no CA1 de ESTAU, KN, KT5823 e LAV 0,5 aumentou a LTM sem afetar a STM; de PD bloqueou a STM sem afetar a LTM; de LY e KT inibiu a STM e a LTM; de LAV 0,1 não teve efeito sobre as duas formas de memória (Anexo 6, fig. 1). Já no CE, a infusão de ESTAU e KT inibiu a STM e a LTM e de PD aumentou a STM e deprimiu a LTM. Todos os outros tratamentos não tiveram efeito nas duas formas de memória (Anexo 6, fig. 1).

Grupo 2: a infusão de PD, que inibiu a STM sem afetar a LTM, 10 min. antes do teste de STM, mostrou que não existem evidências para um efeito desta droga na recuperação da STM.

Experimento 7

Grupo 1: a infusão de KT no CA1 à 0 h após o treino, prejudicou a STM e a LTM (Anexo 7, fig. 2a); aos 22 (Anexo 7, fig. 2b) e 45 min. (Anexo 7, fig. 2c) após o treino, prejudicou a STM sem afetar a LTM.

Grupo 2: a infusão de KT no CA1 aos 90 min após o treino (Anexo 7, fig. 2d), prejudicou a STM sem afetar a LTM; aos 135 min após o treino (Anexo 7, fig. 2e), não teve efeito sobre as duas formas de memória e 175 min após o treino (Anexo 7, fig. 2f), não teve efeito na STM e bloqueou a LTM.

Localização Histológica dos Sítios de Infusão

De duas a 24 h após o término dos experimentos, os animais operados receberam infusão bilateral de uma solução de 4% de azul de metileno em salina. Após 1 h, foram sacrificados por decapitação e seus cérebros retirados e armazenados em solução de 10% de formol em água destilada para posterior localização histológica dos sítios de infusão. As infusões foram consideradas corretas, quando o local corado não excedeu 1 mm² da área pretendida.

Somente os dados comportamentais dos animais com localização correta das cânulas foram considerados.

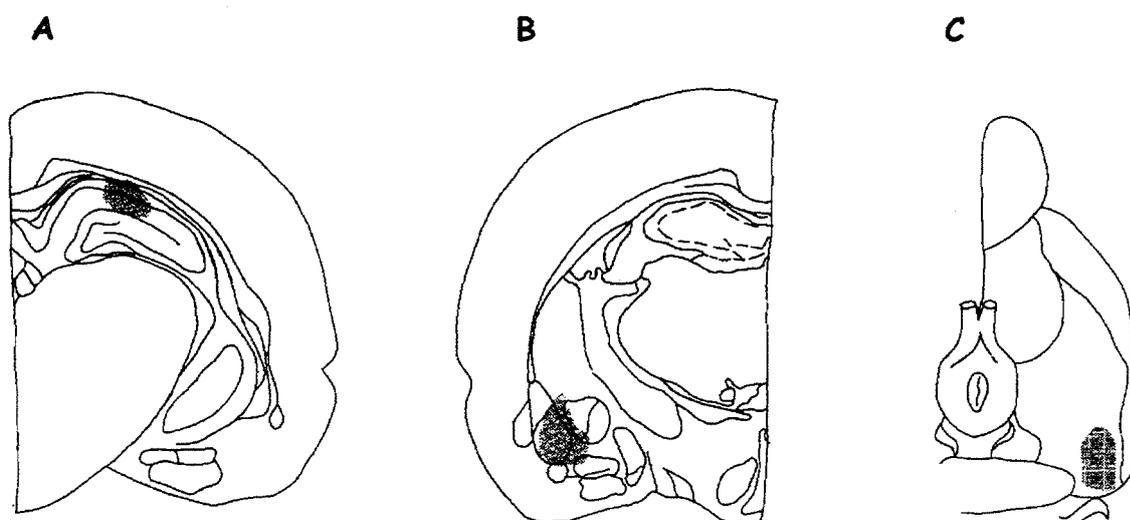


Fig. 4: Localização dos sítios de infusão A) na região CA1 do hipocampo; B) na amígdala e C) no córtex entorrinal.

Discussão

Experimento 1

Os resultados sugerem que a amnésia induzida por inibidores enzimáticos foi mais forte que a causada por CEC ou β -endorfina, apoiando a idéia que a CaMKII e a PKA estão diretamente envolvidas no mecanismo central da consolidação da memória no hipocampo (6,25), como estão numa variedade de fenômenos plásticos nesta estrutura e em outras (14). O CEC e a β -end, ao contrário, são conhecidos por exercerem seus efeitos amnésicos principalmente através de influências nos sistemas modulatórios da memória (22,39).

Experimento 2

Têm sido sugerido que tanto a cascata da CaMKII quanto a do cAMP/PKA participam na formação da memória (20,33,36,48,49,52).

Existem, entretanto, diferenças importantes entre as duas cascatas, tanto com respeito ao seu tempo de operação, quanto às áreas cerebrais envolvidas. A CaMKII, pela fosforilação do Glur1, modula uma fase de curta duração de transmissão sináptica excitatória aumentada, que é necessária nos primeiros estágios da memória no CA1 e na modulação desta na amígdala (26,33). Porém a cascata do cAMP/PKA é diferente, já que há dois picos de atividade, um muito breve no período pós-treino de EI (6,7) e outro maior de 3-6 h após o treino em EI, simultaneamente com o crescimento dos níveis de

cAMP endógeno, seguido de um grande aumento da fosforilação de CREB e de c-fos (6,7,26).

No hipocampo, o bloqueio precoce da CaMKII pelo KN, impede a formação da memória de longa duração que depende de uma intervenção tardia da cadeia do cAMP/PKA. Na amígdala, o bloqueio da CaMKII não previne a formação da memória porque esta depende de sistemas que não estão localizados nesta estrutura.

Os presentes dados estão de acordo com o de vários experimentos anteriores, sugerindo que a amígdala participa na modulação precoce da memória (11,40) e o hipocampo está envolvido no armazenamento de várias formas de memória declarativa (17,26,46,50) no mínimo por vários dias (27,28).

Experimento 3

Claramente, a formação da memória da tarefa de habituação concomitante com a tarefa de *water finding*, pode ocorrer na presença de um inibidor da enzima. Diferente de outras tarefas, a amnésia retrógrada causada pelo KN na habituação, não foi completa, o que sugere que mesmo quando adquirida sozinha, esta tarefa não é grandemente dependente da CaMKII como outras tarefas (36,54).

Existe a possibilidade de que, quando a tarefa de *water finding* está presente, o CA1 usa diferentes células ou sinapses para processar a tarefa de habituação do que quando a tarefa de habituação é processada sozinha. A primeira vista, não há razão para presumir que diferentes células serão usadas

para processar exatamente a mesma tarefa, no mesmo aparato, durante um intervalo de treino e teste e à uma similar responsividade em cada caso (45). Existe, entretanto, uma diferença de procedimento entre a habituação do grupo 1 e 2, onde o primeiro ocorreu com interrupções causadas pela sede, que foram mais longas na sessão de teste, o que não ocorreu com o grupo 2. Estas interrupções requeriram um reinício do curso de habituação. Isto poderia implicar num envolvimento de diferentes células nos dois experimentos. Entretanto, a CaMKII parece ser indispensável (36), particularmente no período pós-treino (48) para tarefas espaciais de provas variadas que também usam células detectoras de lugar e que envolvem, por definição, múltiplas interrupções e reinícios.

A saturação da via sinalizante da CaMKII nas mesmas células pela concomitância de duas tarefas simultâneas, é uma possibilidade (3,12).

Experimento 4

O efeito do tratamento com DPAT na STM no CE durou mais que no CA1, sugerindo que os receptores entorrinais lidam com a STM por um tempo maior. Receptores similares participam diferentemente nas duas estruturas cerebrais no mesmo tempo, durante o período imediatamente depois do treino.

STM e LTM envolvem, essencialmente, mecanismos separados. Alguns processos no CA1 vistos serem comuns para os dois sistemas de memória, não é surpreendente, pois os dois sistemas lidam com aproximadamente as mesmas representações sensorio-motoras.

Experimento 5

Baseado em experimentos usando inibidores de síntese proteica e outros tratamentos que, dependendo do tempo de administração, prejudica as duas formas de memória ou somente a LTM (38), tornou-se tradicional considerar que a STM é um passo em direção à LTM (41,47). Os presentes achados não suportam esta idéia, pois DPAT e NAN já demonstraram previamente (29) e outros tratamentos estão descritos aqui pela primeira vez.

Os presentes dados concordam com a idéia do traço único, dois processos (19). Existem mecanismos em comum para a STM e a LTM (29). Isto sugere que a STM e a LTM compartilham alguns mecanismos bioquímicos no CA1 e CE e concorda com a idéia do traço único além do que, os animais lidam com um conjunto de informações aprendidas e respondem da mesma forma, quando testados 1,5 e 24 h após o treino. A idéia de dois processos é substanciada pelas diferenças farmacológicas entre a STM e a LTM, que implica diferenças bioquímicas.

A influência de vários dos tratamentos dados no CA1 ou CE na STM e LTM foram diferentes, em alguns casos até opostos. É tentador formular hipóteses de como as várias vias monoaninérgicas podem ser ativadas pela experiência de treino e influenciar diferentemente a STM e a LTM.

Experimento 6

Foram encontradas recentemente drogas que bloqueiam a formação da STM sem alterar a LTM, quando infundidas imediatamente após o treino no CA1, CE (13,15) e CP (30). Portanto, claramente a STM e a LTM envolvem sistemas separados, apesar delas deverem ser conectadas e ambas apresentarem as mesmas representações sensorio-motoras (13). As ligações são mostradas pelo fato que vários antagonistas de receptores sinápticos influenciam a STM e a LTM similarmente (13,15). Isto sugere que a diferenciação entre os processos de STM e LTM podem ocorrer dentro do mesmo conjunto de células, em um nível pós receptor.

Experimento 7

A LTM depende da PKA no CA1, em tempos nos quais a sua atividade e os níveis de seu substrato, CREB, estão no pico: 0 e 3 h após o treino (6). Na metade do tempo, a PKA controla a STM. O primeiro pico tem uma influência primária, tanto no segundo pico, quanto na regulação da STM: sem isso nenhuma das duas ocorreria. A regulação da STM pela PKA pode envolver outros substratos além do CREB, tais como proteínas de membrana que podem marcar ou sinalizar sinapses estimuladas recentemente (18). A distinção entre a STM e a LTM pode ocorrer principalmente a nível pós-sináptico, desde que as sinapses envolvidas na geração dos dois tipos de memória devem, em uma extensão maior, serem as mesmas, já que as duas lidam com o mesmo conjunto sensorio-motor de eventos.

Conclusões

- ✓ A amnésia causada por agentes que bloquearam a PKA e a CaMKII foi mais forte, o que é compatível com a idéia de que estas enzimas estão diretamente envolvidas no mecanismo principal da consolidação da memória.
- ✓ O bloqueio da CaMKII na amígdala, não impediu a formação da memória, pois isto depende de sistemas que não estão localizados nesta estrutura.
- ✓ A tarefa de HAB não depende da CaMKII, mas esta mesma tarefa adquirida junto com a de *water finding*, que dependente desta, tem uma dependência parcial da CaMKII.
- ✓ A STM e a LTM são, essencialmente, processos separados, mas têm alguns mecanismos bioquímicos em comum no CA1 e CE.
- ✓ No HIPO, o mecanismo de STM requer PKA, MAPKK e guanilato ciclase, mas não PKC, PKG, tirosina quinase e CaMKII. O mecanismo da LTM requer guanilato ciclase, PKG, PKC, CaMKII e PKA, mas não MAPKK e tirosina quinase. No CE, A STM requer PKC e PKA, mas não guanilato ciclase, PKG, CaMKII, tirosina quinase e MAPKK. A LTM requer PKC, PKA e MAPKK, mas não guanilato ciclase, PKG, tirosina quinase e CaMKII.

- ✓ A enzima PKA é necessária para a formação da STM nos primeiros 90 min. após o treino em EI. Na LTM, é necessária imediatamente e, novamente, aos 180 min. após o treino em EI.

Referências Bibliográficas

1. Ardenghi, P. G., Barros, D. M., Izquierdo, L. A., Bevilaqua, L., Schröder, N., Quevedo, J., Rodrigues, C., Madruga, M., Medina, J. H. & Izquierdo, I. Late and prolonged memory modulation in entorhinal and parietal cortex by drugs acting on the cAMP/protein kinase A signalling pathway. *Behavioral Pharmacology*, **8**, 745-751, 1997.
2. Atkins, C. M., Selcher, J. C., Petraitis, J. J., Trzaskos, J. M. & Sweatt, D. The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nature Neuroscience*, **7**, 602-609, 1998.
3. Barria, A., Muller, D., Derkach, V., Griffith, L.C. & Soderling, T.R. Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaMKII during long-term potentiation. *Science*, **276**, 2042-2045, 1997.
4. Baudry, M., Bi, X & Tocco, G. The role of glutamate receptor regulation in memory processes. Em: J. L. McGaugh, K. Ishikawa & S. Sakata (Eds), *Brain Processes and Memory* (p.p. 97-115). Amsterdam: Elsevier, North Holland, 1996.
5. Bernabeu, R., Schmitz, P., Faillace, M., P., Izquierdo, I. & Medina, J. H. Hippocampal cGMP and cAMP are differentially involved in memory

- processing of na inhibitory avoidance learning. *NeuroReport*, **7**, 585-588, 1996.
6. Bernabeu, R., Bevilaqua, L., Ardenghi, P., Bromberg, E., Schmitz, P., Bianchin, M., Izquierdo, I. & Medina, J.H. Involvement of hippocampal D1/D5 receptor - cAMP signaling pathways in a late memory consolidation phase of an aversively-motivated task in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, **94**, 7041-7046, 1997.
 7. Bernabeu, R., Cammarota, M., Izquierdo, I. & Medina, J.H. Involvement of glutamate AMPA receptors and a cAMP/protein kinase A, CREB-P pathway in memory consolidation of na aversive learning task in rats. *Brasilian Journal of Medical and Biological Research*, **30**, 961-965, 1997.
 8. Bevilaqua, L., Ardenghi, P., Schroder, N., Bromberg, E., Schmitz, P., Schaeffer, E., Quevedo, J., Bianchin, M., Walz, R., Medina, J.H. & Izquierdo, I. Drugs acting upon the protein kinase A, CREB pathway modulate memory consolidation when given late after training into rat hippocampus but not amigdala. *Behavioural Pharmacology*, **8**, 331-338, 1997.
 9. Bliss, T. V. P. & Collingridge, G. R. A synaptic model of memory: long-term potentiation. *Nature*, **361**, 31-39, 1993.
 10. Bliss, T. V. P. & Lomo, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetised rabbit following stimulation of the perforant path. *Journal of Physiology (Lond)*, **232**, 331-356, 1973.

11. Cahill, L. & McGaugh, J.L. Modulation of memory storage. *Current opinion in Neurobiology*, 6, 237-242, 1996.
12. Cammarota, M., Bernabeu, R., Levi de Stein, M., Izquierdo, I & Medina, J.H. Learning-specific, time-dependent increases in hippocampal Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II activity and AMPA GluR1 subunit immunoreactivity. *European Journal of Neuroscience*, 10, 2669-2676, 1997.
13. Cammarota, M., Paratcha, G., Levi de Stein, M., Bernabeu, R., Izquierdo, I & Medina, J. H. B-50, GAP-43 phosphorylation and PKC activity are increased in rat hippocampal synaptosomal membranes after an inhibitory avoidance training. *Neurochemical Research*, 22, 499-505, 1997.
14. Carew, T.J. Molecular enhancement of memory formation. *Neuron*, 16, 5-8, 1996.
15. Colley, P. A. & Routtenberg, A. Long-term potentiation as synaptic dialogue. *Brain Research*, 22, 499-505, 1993.
16. Collingridge, G. L. & Bliss, T. V. Memories of NMDA receptors and LTP. *Trends in Neuroscience*, 18, 54-56, 1995.
17. Eichenbaum, H., Schoenbaum, G., Toung, B. & Bunsey, M. Functional organization of the hippocampal memory system. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 93, 13500-13507, 1996.

18. Frey, U. & Morris, R. G. M. Synaptic tagging: implications for late maintenance of hippocampal long-term potentiation. *Trends in Neurosciences*, **21**, 181-188, 1998.
19. Gold, P. E. & Mcgaugh, J. L. A single-trace, two-process view of memory storage processes. Em Deutsch & JÁ Deutsch, (Eds.), *Short-term Memory* (pp. 355-378). New York: Academic Press, 1975.
20. Grant, S.E. & Silva, A.C. Targeting learning. *Trends in Neurosciences*, **17**, 71-75, 1994.
21. Hyman, B. T., van Hoesen, G. W. & Damasio, A. D. Memory-related neural systems in Alzheimer's disease: Anatomic study. *Neurology*, **40**, 1721-1730, 1996.
22. Izquierdo, I. Opioids and Memory. Em: T. W. Stone (Ed.), *Aspects of synaptic transmission: LTP, galanin, opioids, autonomic, 5-HT* (pp.164-180). London: Taylor & Francis, 1991.
23. Izquierdo, I. & Medina, J. H. Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, **63**, 19-32, 1995.
24. Izquierdo, I. & Chaves, M. F. L. Dopamine disease states. Eds: Farrand, London, (p.p. 389-406), 1996.

25. Izquierdo, I. & Medina, J.H. The biochemistry of memory and its regulation by hormones and neuromodulators. *Psychobiology*, **25**, 1-8, 1997.
26. Izquierdo, I. & Medina, J.H. Memory Formation: The Sequence of Biochemical Events in the Hippocampus and its Connection to Activity in Other Brain Structures. *Neurobiology of Learning and Memory*, **68**, 285-316, 1997.
27. Izquierdo, I., Quillfeldt, J.A., Zanatta, M.S., Quevedo, J., Schaeffer, E., Schmitz, P.K. & Medina, J.H. Sequential role of hippocampus and amygdala, entorhinal cortex, and parietal cortex in memory for inhibitory avoidance in rats. *European Journal of Neuroscience*, **9**, 786-793, 1997.
28. Izquierdo, L.A., Schröder, N., Ardenghi, P., Quevedo, J., Bevilacqua, L., Netto, C.A., Izquierdo, I. & Medina, J.H. Systemic administration of ACTH or vasopressin in rats reverses the amnestic effect of posttraining β -endorphin or electroconvulsive shock but not that of intrahippocampal infusion of protein kinase inhibitors. *Neurobiology of Learning and Memory*, **68**, 197-202, 1997.
29. Izquierdo, I., Barros, D. M., Mello e Souza, T., de Souza, M. M., Izquierdo, L. A. & Medina, J. H. Mechanisms for memory types differ. *Nature*, **393**, 635-636, 1998.
30. Izquierdo, I., Medina, J. H., Izquierdo, L. A., Barros, D. M., de Souza, M. M. & Mello e Souza, T. Short- and long-term memory are differentially

regulated by monoamnergic systems in the rat brain. *Neurobiology of Learning and Memory*, **69**, 219-224, 1998.

31. James, W. *The Principles of Psychology*. New York, Holt, 1890.

32. Kandel, E., Schwartz, J. H. & Jessel, T. M. Modulation of synaptic transmission: Second-messenger systems. Em: *Essentials of Neural Science and Behavior* (pp. 243-267). USA: Appleton & Lange, 1995.

33. Lisman, J., Malenka, R.C., Nicoll, R.A. & Malinow, R. Learning mechanisms: The case for CaMKII. *Science*, **276**, 2001-2002, 1997.

34. Maren, S. & Baudry, M. Properties and mechanisms of long term synaptic plasticity in the mammalian brain: relationships to learning and memory. *Neurology of Learning and Memory*, **63**, 1-18, 1995.

35. Martin, K. C. & Kandel, E. R. Cell adhesion molecules, CREB, and the formation of new synaptic connectios. *Neuron*, **17**, 567-570, 1996.

36. Mayford, M., Bach, M.E., Huang, Y-Y., Wang, L., Hawkins, R.D. & Kandel, E.R. Control of memory formation through regulation of a CaMKII transgene. *Science*, **274**, 1678-1683, 1996.

37. McGaugh, J. L. Time-dependent processes in memory storage. *Science*, **153**, 1351-1359, 1966.

38. McGaugh, J. L. & Herz, A. Memory consolidation. San Francisco: Albion, 1972.
39. McGaugh, J. L. Involvement of hormonal and neuromodulatory systems in the regulation of memory storage. *Annual Review of Neuroscience*, 12, 255-287, 1989.
40. McGaugh, J.L., Cahill, L., Parent, M.B., Mesches, M.H., Coleman-Mesches, K. & Salinas, J.A. Involvement of the amigdala in the regulation of memory storage. In J.L. McGaugh, F. Bermúdez-Rattoni & R.A. Prado-Alcalá (Eds.), *Plasticity in the Central Nervous System: Learning and Memory* (pp. 17-39). Mahwah, Lawrence Erlbaum, 1995.
41. Nestler, E. J. & Greengard, P. Serine and Threonine Phosphorilation. Em: J. Siegel, B. W. Agranoff, R. W. Albers, S. K. Fisher & M. D. Uhler (Eds), *Basic Neurochemistry* (p.p. 471-495). Philadelphia: Lippincott-Raven, 1998.
42. Paxinos, G. & Watson, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 2nd. Ed. San Diego: Academic Press, 1986.
43. Pasqualotto, B. A., Shaw, C. A. Regulation of ionotropic receptors by protein Phosphorilation. *Biochemical Pharmacology*, 51, 1417-1425, 1996.
44. Schulman, H. & Hyman, S. E. Intracellular Signaling. Em: M. J. Zigmond, F. E. Bloom, S. C. Landis, J. L. Roberts & L. Squire (Eds), *Fundamental Neuroscience* (p.p. 269-316). London: Academic Press, 1999.

45. Skaggs, W. E. & McNaughton, B. L. Replay of neuronal firing sequences during sleep following spatial experience. *Science*, **271**, 1870-1873, 1996.
46. Squire, L.R. Memory and the hippocampus: A synthesis with rats, monkeys, and humans. *Psychological Review*, **99**, 195-221, 1992.
47. Squire, L. R., Knowlton, B. & Musen, G. The structure and organization of memory. *Annual Review Psychology*, **44**, 453-495, 1993.
48. Tan, S.-E. & Liang, K.C. Spatial learning alters hippocampal calcium/calmodulin -dependent protein kinase II in rats. *Brain Research*, **711**, 234-240, 1996.
49. Tan, S.-E. & Liang, K.C. Inhibitory avoidance learning alters the amygdala calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in rats. *Brain Research*, **748**, 227-233, 1997.
50. Vnek, N. & Rothblat, L.A. The hippocampus and long-term object in the rat. *Journal of Neuroscience*, **16**, 2780-2787, 1996.
51. Walz, R., Roesler, R., Quevedo, J., Sant'Anna, M., Rodrigues, C., Gottfried, C., Medina, J. H. & Izquierdo, I. Time-dependent impairment of inhibitory avoidance retention in rats by posttraining infusion of a mitogen-activated protein kinase inhibitor into cortical and limbic structures. *Neurobiology of Learning and Memory*, in press, 1998.

52. Wolfman, C., Fin, C., Dias, M., Bianchin, M., Da Silva, R.C., Schmitz, P.K., Medina, J.H. & Izquierdo, I. Intrahippocampal or intra-amygdala infusion of KN-62, a specific inhibitor of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, causes retrograde amnesia in the rat. *Behavioral and Neural Biology*, **61**, 203-205, 1994.
53. Willner, P., Bianchin, M., Walz, R., Bueno e Silva, Zannata, M. S. & Izquierdo, I. Muscimol infused into the entorhinal cortex prior to training blocks the involvement of this area in post-training memory processing. *Behavioral Pharmacology*, **4**, 95-100, 1993.
54. Yoshimura, M. & Cooper, D. M. F. Type-specific stimulation of adenylyl cyclase by protein kinase C. *The Journal of Biological Chemistry*, **268**, 4604-4607, 1993.

Trabalhos que fazem parte desta tese

1. Systemic Administration of ACTH or Vasopressin Reverses the Effect of Postraining β -Endorphin or Eletroconvulsive Shock but Not That of Intrahippocampal Infusion of Protein Kinase Inhibitors (1997). Luciana A. Izquierdo, Nadja Schröder, Patrícia Ardenghi, João Quevedo, Carlos A. Netto, Jorge H. Medina e Iván A. Izquierdo. *Neurobiology of Learning and Memory*, **68**, 197-202.
2. Stimulators of the Cascade Reverse Amnesia Induced by Intra-amygdala but Not Intrahippocampal KN-62 Administration (1999). Daniela M. Barros, Luciana A. Izquierdo, Márcia K. Sant'Anna, João Quevedo, Jorge H. Medina, James L. McGaugh e Iván A. Izquierdo. *Neurobiology of Learning and Memory*, **71**, 94-103.
3. Intrahippocampal KN-62 Hinders the Memory of Habituation Acquired Alone, but Not Simultaneously with a Water Finding Task (1999). Claudia Wolfman, Luciana A. Izquierdo, Nadja Schröder e Iván Izquierdo. *Behavioural Pharmacology*, **10**, in press.
4. Mechanisms for memory types differ (1998). Iván Izquierdo, Daniela M. Barros, Tadeu Mello e Souza, Márcia M. Souza e Luciana A. Izquierdo. *Nature*, **393**, 635-636.

5. Short- and long-term memory are differentially regulated by monoaminergic systems in the rat brain (1998). Iván Izquierdo, Jorge H. Medina, Luciana A. Izquierdo, Daniela M. Barros, Márcia M. Souza e Tadeu Mello e Souza. *Neurobiology of Learning and Memory*, **69**, 219-224.

6. Short- and Long-Term Memory are Differentially Affected by Metabolic Inhibitors Given into Hippocampus and Entorhinal Cortex (1999). Luciana A. Izquierdo, Mônica Vianna, Daniela M. Barros, Tadeu Mello e Souza, Patrícia Ardenghi, Márcia K. Sant'Anna, Cleverson Rodrigues, Jorge H. Medina e Iván Izquierdo. *Behavioural Pharmacology*, *in press*.

7. Intrahippocampal infusion of an inhibitor of protein kinase A separates short- from long-term memory (1999). Mônica Vianna, Luciana A. Izquierdo, Daniela M. Barros, Jorge H. Medina e Iván Izquierdo. *Behavioural Pharmacology*, **10**, *in press*.

Anexos

Short- and Long-term Memory are Differentially Affected by Metabolic Inhibitors Given into Hippocampus and Entorhinal Cortex

Luciana A. Izquierdo*, Mônica Vianna*, Daniela M. Barros*, Tadeu Mello e Souza*, Patricia Ardenghi*, Marcia K. Sant'Anna*, Cleverson Rodrigues*, Jorge H. Medina† and Iván Izquierdo*¹

**Centro de Memória, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Ramiro Barcellos 2600, (90035-003) Porto Alegre, RS, Brazil and †Instituto de Biología Celular "Eduardo de Robertis", Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Paraguay 2155 - 3er. Piso, (1121) Buenos Aires, Argentina.*

Running title:

Short- and long-term memory

¹ Address correspondence to Dr. Iván Izquierdo, Departamento de Bioquímica, I.C.B.S., U.F.R.G.S., Ramiro Barcellos 2600, (90035-003)-Porto Alegre, RS, Brazil. The authors express their gratitude to Marcelo Madruga, Beatriz Moleta for their help with the surgery and histology. This work was supported by PRONEX, Brazil.

Obs.: Este trabalho está submetido à revista *Neurobiology of Learning and Memory*.

Rats were implanted with cannulae in the CA1 area of the dorsal hippocampus or in the entorhinal cortex and trained in one-trial step-down inhibitory avoidance. Two retention tests were carried out in each animal, one at 1.5 h to measure short-term memory (STM) and another at 24 h to measure long-term memory (LTM). The purpose of the present study was to screen the effect on STM of various drugs previously shown to affect LTM of this task when given posttraining at the same doses that were used here. The drugs and doses were: The guanylyl cyclase inhibitor, LY83583 (LY, 2.5 μ g), the inhibitor of Tyr-protein kinase at low concentrations and of protein kinase G (PKG) at higher concentrations, lavendustin A (LAV, 0.1 and 0.5 μ g), the PKG inhibitor, KT5823 (2.0 μ g), the protein kinase C (PKC) inhibitor, staurosporin (STAU, 2.5 μ g), the inhibitor of calcium/ calmodulin protein kinase II (CaMKII), KN62 (3.6 μ g), the protein kinase A (PKA) inhibitor, KT5720 (0.5 μ g), and the mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK) inhibitor, PD098059 (PD, 0.05 μ g). PD was dissolved in saline; all the other drugs were dissolved in 20% dimethylsulfoxide. In all cases the drugs affected LTM as had been described in previous papers. The drugs affected STM and LTM differentially depending on the brain structure into which they were infused. STM was inhibited by KT5720, LY and PD given into CA1, and by STAU and KT5720 given into the entorhinal cortex. PD given into the entorhinal cortex enhanced STM. LTM was inhibited by STAU, KN62, KT5720, KT5823 and LAV 0.5 μ g given into CA1, and by STAU, KT5720 and PD given into the entorhinal cortex. The results suggest that STM and LTM involve different physiological mechanisms but are to an extent linked. STM appears to require PKA, guanylyl cyclase and MAPKK activity in CA1, and PKA and PKC activity in the entorhinal cortex; MAPKK seems to play an inhibitory role in STM in the entorhinal cortex. In contrast, LTM appears to require PKA and PKC activity in both structures, guanylyl cyclase, PKG and CaMKII activity in CA1, and MAPKK activity in the entorhinal cortex.

The task in which the biochemical substrates of long-term memory (LTM) formation have been studied most extensively is, by far, one-trial step-down inhibitory avoidance (Izquierdo & Medina, 1995, 1997). There are several reasons for this: This task is acquired in seconds so that the time of the initiation of LTM formation can be determined very accurately, its memory may last for months, and it is by far the task whose pharmacology has been best studied (Gold, 1986; McGaugh, 1966). Further, it crucially involves the CA1 region of the dorsal hippocampus (Izquierdo & Medina, 1997). These characteristics make it similar in many respects to CA1 long-term potentiation (LTP) (Bliss & Collingridge, 1993); therefore, it is not surprising that the molecular steps underlying LTM formation in CA1 and their timing is quite similar to that of LTP (Izquierdo & Medina, 1995, 1997). However, unlike CA1 LTP, inhibitory avoidance involves the sequential intervention of the entorhinal cortex and other brain areas (Izquierdo, Quillfeldt, Zanatta, Quevedo, Schaeffer, Schmitz & Medina, 1997), some in the formation of LTM, and others in its modulation (Cahill & McGaugh, 1998; Izquierdo & Medina, 1997).

LTM formation of this task requires an early posttraining participation first of protein kinases A (PKA) (Bernabeu, Bevilaqua, Ardenghi, Bromberg, Schmitz, Bianchin, Izquierdo & Medina, 1997 a) and G (PKG), Bernabeu, Schröder, Quevedo, Cammarota, Izquierdo & Medina (1997 b) and then of protein kinase C (PKC) (Cammarota, Paratcha, Levi de Stein, Bernabeu, Izquierdo & Medina, 1997), and of the calcium/calmodulin dependent protein kinase II (CaMKII) (Cammarota, Bernabeu, Levi de Stein, Izquierdo & Medina, 1998) in CA1. This was ascertained both by measuring the activity of these enzymes, and the effect of the timed infusion of specific inhibitors into this area (Bernabeu et al., 1997 b; Izquierdo & Medina, 1997; Jerusalinsky, Ferreira, Da Silva, Bianchin, Ruschel, Medina & Izquierdo, 1994; Wolfman, Fin, Dias, Bianchin, Da Silva, Schmitz, Medina & Izquierdo, 1994). A participation of the mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK) in CA1 in LTM formation was recently established using an inhibitor of this enzyme (Walz, Roesler, Quevedo, Sant'Anna, Madruga, Rodrigues, Gottfried, Medina & Izquierdo, 1998). Evidence suggests that the PKC, CaMKII and PKA cascades also play a role in LTM formation in the entorhinal cortex (see Izquierdo & Medina, 1997). The biochemical and some of the pharmacological findings on the role of CA1 in LTM of the step-down task have been confirmed in other tasks, notably multi-trial spatial learning tasks (see Izquierdo & Medina, 1997); in these, however, the timing of the intervention of each cascade in LTM formation can not be determined (Gold, 1986; Izquierdo & Medina, 1997).

Recently it was shown that a short-term memory (STM) system or systems operate in parallel to LTM formation both in CA1 and in the entorhinal cortex in the first 1.5 - 3 h after inhibitory avoidance training (I. Izquierdo, Barros, Mello e Souza, de Souza, L.A. Izquierdo & Medina, 1998 a; I. Izquierdo, Medina, L.A. Izquierdo, Barros, de Souza MM & Mello e Souza, 1998 c). STM was defined as the system or systems that maintain memory functional while the consolidation of LTM is not yet completed; a process that, in CA1 and the entorhinal cortex, takes 3-6 h (Bernabeu et al., 1997; Izquierdo & Medina, 1997; Izquierdo et al., 1997). STM was found to be in many ways independent from LTM: Several receptor antagonists given into these brain structures can block STM without altering LTM measured in the same animals for the same task. In addition, the participation of other brain areas in STM and LTM also differs (Bianchin, Mello e Souza, Medina & Izquierdo, 1998; Izquierdo, I., Izquierdo, L.A., Barros, Mello e Souza, de Souza, Quevedo, Rodrigues, Sant'Anna, Madruga & Medina, 1998 b). This introduces a complication in the analysis of the role of the various metabolic pathways mentioned above in memory (Maren and Baudry, 1995; Izquierdo and Medina, 1997): do they participate in STM, in LTM, or in both? Biochemical observations in the first several h after training (see Izquierdo & Medina, 1997) are by themselves uninformative as to whether they reveal changes in mechanisms of STM or LTM; the use of enzyme inhibitors or receptor blockers becomes, thus, necessary for this purpose (Izquierdo et al., 1998 a,b,c,d).

Here we study the effect on STM and LTM of well-known inhibitors of PKA, PKC, PKG, guanylyl cyclase and MAPKK, at doses previously shown to affect LTM and LTP and to effectively inhibit the enzymes (see Bliss and Collingridge, 1993; Izquierdo and Medina, 1995, 1997; Walz et al., 1998). The drugs were infused into CA1 or into the entorhinal cortex of rats immediately after training in one trial step-down inhibitory avoidance, and the animals were tested for retention twice: at 1.5 h and at 24 h from training, in order to evaluate STM and LTM respectively.

METHODS

Animals. Two-hundred-and-twenty-one male Wistar rats (age, 2- 2.5 months; weight, 220-280 g) from our own breeding colony were used. The animals were housed in plastic cages, 5 to a cage, with water and food ad libitum, under a 12 h light/dark cycle (lights on at 7.00 A.M.) at a constant temperature of 23.0°C. One-hundred-and-fourteen rats were bilaterally implanted under deep thionembutal anesthesia with 30-gauge guides 1 mm above the surface of the entorhinal cortex

(A -7.0, L 5.0, V 8.4). Another 100 rats were bilaterally implanted with guides aimed 1.0 mm above the CA1 area of the dorsal hippocampus (A -4.3, L 4.0, V 3.4). Coordinates are in mm, according to the atlas by Paxinos and Watson (1986).

Training and testing. After recovery from surgery, the animals were submitted to one-trial step-down inhibitory avoidance (Bernabeu et al., 1997 a,b; Bianchin et al., 1998; Izquierdo et al., 1998 a,b,c). The rats were placed on a 2.5 cm high, 7.0 cm wide platform at the left of a 50.0 x 25.0 x 25.0 cm box whose floor was a series of parallel 0.1 cm caliber stainless steel bars spaced 1.0 cm apart. Latency to step down placing the four paws on the grid was measured. Immediately upon this, the animals received a 0.4 mA, 2.0-sec scrambled footshock. Two-hundred animals (those in Fig. 1 A and B) were tested twice: at 1.5 h from training, in order to measure STM, and at 24 h from training, in order to measure LTM (Izquierdo et al., 1998 a,b,c). Twenty-one animals (those in Table 1) were tested only for STM. In the test sessions no footshock was given and the step-down latency was cut off at 180 sec: i.e., values equal to or higher than 180 sec were counted as 180 sec. This required the use of non-parametric statistics (Kruskal-Wallis analysis of variance followed by Mann-Whitney U tests, two-tailed).

Infusion procedures. Infusion cannulae (27 gauge) were fitted into the guide cannulae at the time of infusion. This was immediately after training in the 100 animals implanted in the hippocampus and in 100 of those implanted in the entorhinal cortex, and 6 min prior to STM testing in the remaining 21 animals implanted in the entorhinal cortex. Infusions were performed manually using a 1 μ l microsyringe attached to the cannulae with a polyethylene tube. The tip of the infusion cannulae protruded 1 mm beyond that of the guide cannulae. Infusions were carried out slowly by gently rotating the embolus over 30 sec, after which the infusion cannula was left in place for another 15 sec, first on one side and then on the other. Thus, the entire procedure took slightly over 90 sec for each time of infusion (Ardenghi et al., 1997; Bernabeu et al., 1997; Bevilacqua et al., 1997; Izquierdo et al., 1997, 1998 a,b). Infusion volume was 0.5 μ l in all cases. The drugs used were the guanylyl cyclase inhibitor, LY83583 (LY, 2.5 μ g/side), the inhibitor of Tyr-protein kinase at low doses and of protein kinase G (PKG) at high doses, lavendustin A (LAV, 0.1 and 0.5 μ g/side), the PKG inhibitor, KT5823 (2.0 μ g/side), the protein kinase C (PKC) inhibitor, staurosporin (STAU, 2.5 μ g/side), the calcium/calmodulin protein kinase II (CaMKII) inhibitor, KN62 (3.6 μ g/side), the protein kinase A (PKA) inhibitor, KT5720 (0.5 μ g/side), and the MAPKK inhibitor, PD098059 (PD, 0.05 μ g/side). The latter was dissolved in saline; all the other drugs were dissolved in 20% dimethylsulfoxide. The doses chosen were calculated so as to reach a con-

centration at the infusion sites higher than those known to effectively cause maximum inhibition of the corresponding enzymes and/or of LTP (see Bliss & Collingridge, 1993; Izquierdo & Medina, 1995, 1997; Walz et al., 1998 for references), assuming a diffusion volume of 1.5 mm^3 . This is the maximum volume to which $0.5 \text{ }\mu\text{l}$ infusions of lidocaine or muscimol into brain tissue extend, and exert their effects upon (Martin, 1991), and the maximum volume reached by methylene blue solutions given through the same cannulae used in the present experiments (see Izquierdo & Medina, 1997; Izquierdo et al., 1997; Walz et al., 1998 for references).

Cannula placement control. Two to 24 hours after the end of the behavioral procedures, $0.5 \text{ }\mu\text{l}$ of 4% methylene blue in saline was infused as indicated above into each site. Animals were sacrificed by decapitation 1 h later and their brains withdrawn and stored in formalin for histological localization of infusion sites (Izquierdo et al., 1997). Infusion placements were correct (i.e., within 1.5 mm^3 of the intended site) in all cases and were as shown in numerous previous papers (see Izquierdo & Medina, 1997; Izquierdo et al., 1997 for references).

RESULTS

Training session step-down latency differences were not significant among either the entorhinal or the CA1 groups in Kruskal-Wallis analyses of variance ($H = 4.0$ and 2.9 respectively, $df = 9$ in both cases). Over-all median (interquartile range) training step-down latency was 4.3 ($3.5/7.2$) and 4.6 ($3.6/7.1$) sec respectively.

STM and LTM test session latency data from the animals that received posttraining treatments into the CA1 region are shown in Fig. 1 (top), and those from the animals that received treatments into the entorhinal cortex are shown in Fig. 1 (bottom). The Kruskal-Wallis analysis showed a significant groups effect in both cases ($H = 44.5$ and 29.3 respectively, $p < 0.002$ in both cases). There was no visible effect of the STM test on performance in the LTM test carried out on the next day: in all control groups both test session values were remarkably similar and not statistically different.

The spectrum of drug effects was different in CA1 and the entorhinal cortex.

When given into CA1, STAU, KN62, KT5823 and the higher dose of LAV hindered LTM without affecting STM, and PD blocked STM without affecting LTM. Two substances, LY and KT5720, inhibited both STM and LTM. Only one treatment, the lower dose of LAV, had no effect on either form of memory (Fig. 1, top). In order to investigate the possibility that the inhibitory

effect of PD on STM may have been due to an influence on retrieval rather than on memory formation (Izquierdo et al., 1998 a,b,c), an additional experiment was performed. Three groups of 7 rats were trained, infused with saline, vehicle or PD into CA1 1.4 h after training, and tested for STM at 1.5 h. Median training session was 3.9 sec (range 1.6 to 24.0) in these groups. Median (interquartile range) test latency values were 51.2 (38.6/55.5) for the saline group, 42.9 (12.1/54.5) for the vehicle group, and 41.9 (33.6/54.9) for the group treated with PD. In all cases, training-test differences were significant at a $p < 0.02$ level in Mann-Whitney U tests, two-tailed. Test session latency differences among these groups were not significant; therefore, there was no evidence for an effect of PD on the retrieval of STM.

When given into the entorhinal cortex, STAU and KT5720 inhibited both STM and LTM, and PD actually enhanced STM and simultaneously depressed STM. All other intra-entorhinal treatments were ineffective on the two forms of memory (Fig. 1, bottom).

DISCUSSION

The possibility that STM may involve systems separate from those of LTM was raised by James (1890), McGaugh (1966, 1968) and Gold and McGaugh (1975). Due to the lack of an experiment showing LTM in the absence of STM for the same task in the same animal, or of evidence that this is impossible, it became traditional to view STM as a step towards LTM (see McGaugh, 1968; Gold & McGaugh, 1975; Izquierdo et al., 1998 a,c for references).

Recently we found that several different drugs infused posttraining into CA1, the entorhinal cortex (Izquierdo et al., 1998 a,b), or the parietal cortex (Izquierdo et al., 1998 c) block STM formation without altering LTM. One more treatment should now be added to the list: PD098059 given into CA1 (Figure 1 A). Thus, clearly STM and LTM involve separate systems, even though they must obviously be linked since, after all, both deal with the same sensorimotor representations (Izquierdo et al., 1998 a). The linkages are shown by the fact that several synaptic receptor antagonists do influence STM and LTM similarly (Izquierdo et al., 1998 a,b). In the present experiment, LY and KT5720 given into CA1, and STAU and KT5720 given into the entorhinal cortex. This suggests that the differentiation between STM and LTM processes may occur within the same sets of cells, at a post-receptor level.

The data suggest the following differences in the intracellular cascades involved in STM and LTM: 1) In CA1, the STM mechanism requires PKA, MAPKK and GC, but not PKC, PKG or

CaMKII, as does LTM (Bernabeu et al., 1997 a,b; Cammarota et al., 1997, 1998); 2) In the entorhinal cortex, STM requires PKC and PKA and is normally inhibited by MAPKK; LTM requires PKC, PKA and MAPKK. The data do not suggest that enzymatic systems affected by the lower dose of LAV (eg., Tyr-kinases, O'Dell, Kandel & Grant., 1994) are involved in STM or LTM in either structure. The data on the effect of LY and KT5823 and of the higher dose of LAV in CA1 endorse a previous suggestion that cGMP-dependent processes are involved in LTM formation (Bernabeu, Schmitz, Faillace, Izquierdo & Medina, 1996).

In spite of all these rather obvious suggestions, the present findings should be taken merely as a possible starting point for future research on the biochemical basis of STM and LTM in CA1 and the entorhinal cortex. Studies using dose-response curves for each inhibitor, and comparing their effect on memory to that on the activity of each corresponding enzyme, should provide more definite evidence as to the nature of the possible interactions among the various protein kinase cascades in the processing of either STM or LTM. One point, however, is quite striking and deserves attention: The biochemical similarity between STM and the similarly lasting phenomenon known as short-term potentiation (STP). Like STM, STP is not blocked by inhibitors of PKC or CaMKII (Bliss & Collingridge, 1993; Colley & Routtenberg, 1993) or CaMKII (Barria, Muller, Derkach, Griffith & Soderling, 1997). The similarities between LTM and LTP are many, and have been extensively commented upon elsewhere (Bliss & Collingridge, 1993; Izquierdo & Medina, 1997; Maren & Baudry, 1995).

REFERENCES

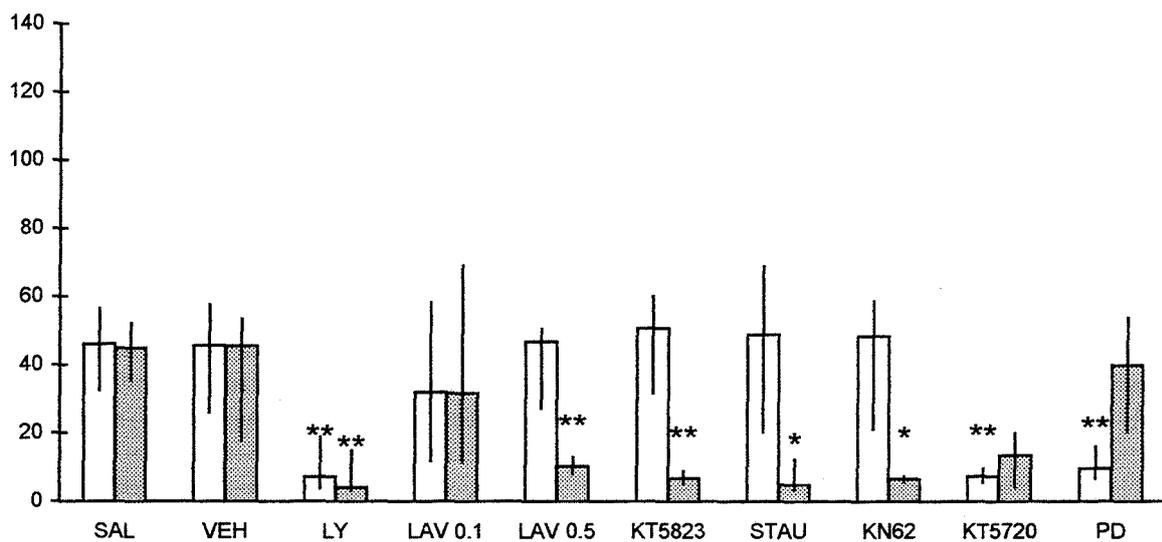
- Barria, A., Muller, D., Verkach, V., Griffith, L.C., & Soderling, T.R. (1997). Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. *Science*, **276**, 2042-2045.
- Bernabeu, R., Bevilacqua, L., Ardenghi, P., Bromberg, E., Schmitz, P., Bianchin, M., Izquierdo, I., & Medina, J.H. (1997a). Involvement of hippocampal D1/D5 receptor - cAMP signaling pathways in a late memory consolidation phase of an aversively-motivated task in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, **94**, 7041-7046.
- Bernabeu, R., Schmitz, P.K., Faillace, M.P., Izquierdo, I., & Medina, J.H. (1996). Hippocampal cGMP and cAMP are differentially involved in memory processing of an inhibitory avoidance learning. *NeuroReport*, **7**, 585-588.
- Bernabeu, R., Schröder, N., Quevedo, J., Cammarota, M., Izquierdo, I., & Medina, J.H. (1997 b). Further evidence for the involvement of a hippocampal cGMP/cGMP-dependent protein kinase cascade in memory consolidation. *NeuroReport*, **8**, 2221-2224.
- Bliss, T.V.P., & Collingridge, G.R. (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation. *Nature*, **361**, 31-39.
- Cahill, L., & McGaugh, J.L. (1998). Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. *Trends in Neurosciences*, **21**, 294-299.
- Cammarota, M., Bernabeu, R., Levi de Stein, M., Izquierdo, I., & Medina, J.H. (1997 b). Learning-specific, time-dependent increases in hippocampal Ca²⁺ / calmodulin-dependent protein kinase II activity and AMPA GluR1 subunit immunoreactivity. *European Journal of Neuroscience*, in press.
- Cammarota, M., Paratcha, G., Levi de Stein, M., Bernabeu, R., Izquierdo, I., & Medina, J.H. (1997 a). B-50/GAP-43 phosphorylation and PKC activity are increased in rat hippocampal synaptosomal membranes after an inhibitory avoidance training. *Neurochemical Research*, **22**, 499-505.
- Colley, P.A., & Routtenberg, A. (1993). Long-term potentiation as synaptic dialogue. *Brain Research Reviews*, **18**, 115-122.
- Craven, S.E., & Bredt, D.S. (1998). PDZ proteins organize synaptic signaling pathways. *Cell*, **93**, 495-498.
- Gold, P.E., & McGaugh J.L. (1975). A single-trace, two-process view of memory storage processes. In D Deutsch & JA Deutsch, (Eds.), *Short-term Memory* (pp. 355-378). New York: Academic Press.
- Izquierdo, I., Barros, D.M., Mello e Souza, T., de Souza, M.M., Izquierdo, L.A., & Medina, J.H. (1998 a). Separate but linked mechanisms for short- and long-term memory in the rat. *Nature*, **393**, 635-636.
- Izquierdo, I., Medina, J.H., Izquierdo, L.A., Barros, D.M., de Souza, M.M., & Mello e Souza, T. (1998 b). Short- and long-term memory are differentially regulated by monoaminergic systems in the rat brain. *Neurobiology of Learning and Memory*, **69**, 219-224.

- Izquierdo, I. & Medina, J.H. (1995). Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, **63**, 19-32.
- Izquierdo, I. & Medina, J.H. (1997). Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiology of Learning and Memory*, **68**, 285-316.
- James, W. (1890). *The Principles of Psychology*. New York, Holt.
- Jerusalinsky, D., Quillfeldt, J.A., Walz, R., Da Silva, R.C., Medina, J.H. and Izquierdo, I. (1994). Posttraining intrahippocampal infusion of protein kinase C inhibitors causes retrograde amnesia in rats. *Behavioral and Neural Biology*, **61**, 107-109.
- Maren, S., & Baudry, M. (1995). Properties and mechanisms of long-term synaptic plasticity in the mammalian brain: relationships to learning and memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, **63**, 1-18.
- Martin, J.H. (1991). Autoradiographic estimation of the extent of reversible inactivation produced by microinjection of lidocaine and muscimol in the rat. *Neuroscience Letters*, **127**, 160-164.
- McGaugh, J.L. (1966). Time-dependent processes in memory storage. *Science*, **153**, 1351-1359.
- McGaugh, J.L. (1968). A multi-trace view of memory storage processes. *Accademia Nazionale dei Lincei*, **109**, 13-24.
- O'Dell, T.J., Kandel, E.R., & Grant, S.G.N. (1991). Long-term potentiation in the hippocampus is blocked by tyrosine kinase inhibitors. *Nature*, **353**, 558-560.
- Paxinos, G., & Watson, C. (1986). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego: Academic Press.
- Walz, R., Roesler, R., Quevedo, J., Sant'Anna, M., Madruga, M., Rodrigues, C., Gottfried, C., Medina, J.H., & Izquierdo, I. (1998). Time-dependent impairment of inhibitory avoidance retention in rats by post-training infusion of a mitogen-activated protein kinase inhibitor into cortical and limbic structures. *Neurobiology of Learning and Memory*, in press.
- Wolfman, C., Fin, C., Dias, M., Da Silva, R.C., Schmitz, P.K., Medina, J.H., and Izquierdo, I. (1994). Intrahippocampal or intra-amygdala infusion of Kn62, a specific inhibitor of calcium/calmodulin protein kinase II, causes retrograde amnesia in the rat. *Behavioral and Neural Biology*, **61**, 203-205

LEGEND TO FIGURE

Fig. 1: Ordinates: test session step-down latencies expressed as medians (interquartile ranges), in sec. The animals were tested for retention twice: at 1.5 h from training (STM, white columns) and at 24 h (LTM, gray columns). Effect of the immediate posttraining infusion into the CA1 area of the dorsal hippocampus (top) or into the entorhinal cortex (bottom), of saline (SAL), vehicle (VEH), LY83583 (LY, 2.5 $\mu\text{g}/\text{side}$), lavendustin A (LAV, 0.1 and 0.5 $\mu\text{g}/\text{side}$), KT5823 (2.0 $\mu\text{g}/\text{side}$), staurosporin (STAU, 2.5 $\mu\text{g}/\text{side}$), KN62 (3.6 $\mu\text{g}/\text{side}$), KT5720 (0.5 $\mu\text{g}/\text{side}$), and PD098059 (PD, 0.05 $\mu\text{g}/\text{side}$). When given into CA1, LY and KT5720 inhibited both STM and LTM, LAV had no effect at the lower dose and at the higher dose it selectively inhibited LTM, like KT5823, STAU and KN62. PD given into CA1 depressed STM without affecting LTM. When given into the entorhinal cortex, STAU and KT5720 inhibited both STM and LTM, and PD enhanced STM and depressed LTM; the other treatments had no effect. N = 10 per group. Single asterisks denote significant differences from both control groups at $p < 0.002$ level in Mann-Whitney U tests (two-tailed); double asterisks indicate significant differences from both control groups at $p < 0.05$ level.

CA1



ENTORHINAL

