

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Trabalho de Conclusão de Curso 2015/2 – Ciências Biológicas

A sinalização de Ca^{2+} através de receptores NMDA e canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L ativa a proteína calcineurina e promove o esquecimento da memória de longa duração

Aluna: Bárbara Motta Castilho

Orientador: Dr. Lucas de Oliveira Alvares

Instituição: Laboratório de Neurobiologia da Memória, Departamento de Biofísica – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Este trabalho de conclusão será apresentado na forma de artigo científico.

Agradecimentos

Gostaria de dedicar esta parte do trabalho para expressar minha gratidão a todas as pessoas que, de diferentes formas, me ajudaram a chegar até este momento.

Primeiramente, quero agradecer a oportunidade dada pelo Dr. Lucas de Oliveira Alvares, de me aceitar no Laboratório de Neurobiologia da Memória, ambiente no qual pude conviver com diversas formas de pensar e agir e assim poder construir um pouco da minha personalidade. Agradeço também a todos os colegas do Laboratório de Neurobiologia da Memória, pessoas maravilhosas nas quais sempre me espelharei para construir meu aprendizado. Ao colega Ricardo Sachser que sempre fez questão de dividir seus conhecimentos e, do seu jeito, ter me ensinado muito – sucesso! Não poderia esquecer da Dona Zelma e dos colegas do Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação sempre muito atenciosos, também pude aprender bastante com vocês. Por todo auxílio que me foi dado dentro destes grupos, e a todos sou muito grata!

Agradeço com todo meu amor à minha família que sempre se esforçou ao máximo para me proporcionar as melhores experiências e que, com certeza, são a base da minha formação. Ao meu companheiro e amigos dedico todo meu carinho por tornarem os dias de dificuldade e exaustão mais leves, sempre dispostos a boas conversas e abraços verdadeiros... Também torço pelo crescimento de todos! Obrigada!

Por último, quero agradecer a banca, Prof^o. Dr. Jorge Alberto Quillfeldt e Prof^o. Dr. Douglas Senna Engelke por dedicar parte do seu tempo para deixar sua contribuição.

Esclarecimentos gerais

Os resultados apresentados neste presente estudo fazem parte de um projeto maior do nosso laboratório, intitulado "*Forgetting of long-term memory requires activation of NMDA receptors, L-type voltage-dependent Ca²⁺ channels, and calcineurin*". Todos os experimentos foram realizados de acordo com a legislação nacional de orientações e cuidados de animais (Lei 11794/2008) e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Este projeto é cientificamente relevante, não só pelo conhecimento básico que trará acerca da neurobiologia do esquecimento, mas também tendo em vista sua possível e promissora aplicação terapêutica, por exemplo, em demência causada pelo envelhecimento.

A sinalização de Ca²⁺ através de receptores NMDA e canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem do tipo L ativa a proteína calcineurina e promove o esquecimento da memória de longa duração

Bárbara Motta Castilho¹, Ricardo Marcelo Sachser^{1,2}, Lucas de Oliveira Alvares^{1,2}

¹Laboratório de Neurobiologia da Memória, Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

Resumo

Embora os mecanismos neurobiológicos envolvidos nos processos de consolidação, reconsolidação e extinção da memória estejam bem descritos, as bases neurais envolvidas no esquecimento da memória de longa duração permanecem desconhecidas. Neste trabalho, utilizando abordagens farmacológicas e comportamentais em ratos, estudamos o papel da sinalização mediada pelo Ca²⁺ sobre a manutenção da memória de longa duração em tarefas de localização e reconhecimento de objetos. Nossos resultados demonstraram que após a aquisição da memória, a inibição crônica do receptor N-metil-D-aspartato (NMDAR), dos canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem do tipo L (L-VDCCs) e da proteína fosfatase calcineurina (CaN) previne o esquecimento da memória de longa duração. Estes resultados sugerem que o envolvimento da sinalização mediada pelo influxo de Ca²⁺ é responsável pelo esquecimento (em condições fisiológicas), uma vez que os tratamentos sistêmicos, após a aquisição, de NMDAR, L-VDCCs ou CaN são capazes de manter uma memória por um tempo pelo qual ela seria esquecida.

Introdução

A capacidade de retenção de memórias de longo prazo é essencial para orientar adequadamente o nosso comportamento. Entretanto, a maioria das nossas experiências diárias é esquecida ao longo do tempo. Sabemos que a formação de memórias de longo prazo requer um aumento nos níveis intracelulares de Ca²⁺. Neste cenário, tanto a síntese proteica como as alterações morfológicas (como inserção de novos receptores) após um aprendizado, são regulados pelo influxo de Ca²⁺ na célula pós-sináptica de neurônios-alvo. Neste processo, a participação dos receptores NMDA é estabelecida (Shipton *et al.* 2014), além de também ocorrer incorporação de receptores AMPA no processo de estabilização da memória de longa duração (Kandel *et al.* 2014)). Entretanto, sabemos

que o esquecimento é o desfecho mais comum da maioria das memórias, embora suas bases neurobiológicas permaneçam desconhecidas. Algumas teorias foram desenvolvidas para explicar a perda de memória que foi vista (a) como o decaimento progressivo ao passar do tempo, (b) como resultado de uma nova aprendizagem que interfere no armazenamento ou expressão da memória ou (c) como resultado de algum tipo de erro de recuperação (Wixted 2004; Jonides *et al.* 2008; Hardt *et al.* 2013, 2014)

Estudos sugerem que mecanismos parecidos aos envolvidos na consolidação da memória, como a sinalização pós-sináptica mediada pelo influxo de Ca^{2+} via receptores NMDA, também ativam o processo de esquecimento da memória (Villarral *et al.*, 2001; Hardt *et al.* 2013, 2014). Villarreal *et al.* (2001) demonstrou, em ratos, que através de injeções sistêmicas de CPP (antagonista de NMDAR) foi possível manter uma potenciação de longa duração (LTP) após uma semana de sua indução quando comparado aos controles, cujo processo de LTP decairia poucos dias depois. Este estudo também mostrou que a mesma administração do antagonista foi capaz de manter uma memória espacial ao longo do tempo, obtida na tarefa do labirinto radial de oito braços (Villarreal *et al.* 2001). Infusões intrahipocâmpais diárias do antagonista de NMDAR D-AP5 teve resultado semelhante no labirinto aquático de Morris (Shinohara *et al.* 2014). Outros estudos ainda sugerem que a liberação de glutamato após a consolidação da memória seria suficiente para ativar receptores NMDA (GluN2B-NMDAR, especificamente) e dar início ao processo de esquecimento (Hardt *et al.* 2013, 2014). Estes resultados confirmam que a ativação de NMDAR está envolvida tanto na persistência do LTP como também da manutenção de memórias espaciais ao longo do tempo.

Várias proteínas ativadas pelo influxo de Ca^{2+} através de NMDAR regulam o LTP e a depressão de longa duração (LTD). Tanto na amígdala (Dalton *et al.* 2012) quanto no hipocampo (Brigman, *et al.* 2008), a LTD é regulada pelo influxo de Ca^{2+} a partir de receptores NMDA que contém a subunidade GluN2B. Por exemplo, a extinção de memórias de medo requerem a ativação da sinalização mediada pelo GluN2B-NMDAR (Dalton *et al.* 2012). Recentemente, Hardt *et al.* (2013; 2014) sugeriram que a metaplasticidade pós-sináptica de subunidades de NMDAR podem ser fatores imprescindíveis na regulação da persistência do LTP tardio e das memórias de longa duração, possivelmente a partir de um mecanismo que regula o tráfego dos receptores AMPA que contém a subunidade GluA2 (GluA2-AMPA) (Migues *et al.* 2010). Além disso, existem outras vias pelas quais há influxo de Ca^{2+} além dos receptores NMDA: os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L (L-VDCCs). Estes canais também podem participar dos processos envolvidos no esquecimento. Basta ver que a ativação dos L-VDCCs contribuem para a desestabilização de memórias de medo durante sua reativação (Suzuki *et al.* 2008, De Oliveira Alvares *et al.* 2013), indicando sua atividade em importantes cascatas moleculares associadas à plasticidade pós-

sináptica implicadas na atualização da memória.

Um dos principais alvos pós-sinápticos de Ca^{2+} é a calcineurina (CaN), uma proteína fosfatase serina/treonina dependente de Ca^{2+} . Sabemos que a CaN está implicada na modulação da aprendizagem e da memória (Lu *et al.* 2000; Malleret *et al.* 2000; Jouvenceau *et al.* 2003; Mansuy *et al.* 2006; Baumgärtel *et al.* 2008). Já é conhecido, também, que a fosforilação de proteínas cinases facilitam o LTP, aumentando o número de receptores AMPA na densidade pós-sináptica (Kandel *et al.* 2014), ao passo que a desfosforilação de AMPAR é dependente da atividade da CaN (Tomita *et al.* 2005). A CaN desfosforila a stargazina (um tipo de proteína TARP - *transmembrane auxiliary AMPAR protein*), assim desestabilizando os AMPARs da membrana, favorecendo sua endocitose (Constals *et al.* 2015). Proteínas reguladoras, como a stargazina, estão associadas à proteína PSD-95 e a AMPAR, participando de sua distribuição e ancoramento na superfície da membrana pós-sináptica (Tomita *et al.* 2005; Priel *et al.* 2005). Jouvenceau *et al.* (2003) demonstrou que a CaN modula a depotenciação da LTP, sugerindo que a sinalização mediada pela CaN está implicada na regulação do esquecimento em condições fisiológicas.

No presente estudo foram utilizadas abordagens comportamentais e farmacológicas a fim de descrever um novo mecanismo que controla a manutenção da memória ao longo do tempo. Utilizando o paradigma de localização de objetos (LO), classicamente um teste que requer a atividade do hipocampo, primeiramente caracterizamos o tempo pelo qual este tipo de memória é esquecida (em torno de 5 dias após a aprendizagem). Em seguida, mostramos que o processo de esquecimento é dependente da ativação de L-VDCCs, NMDAR e CaN, uma vez que a inibição sistêmica destes alvos foi capaz de manter uma memória por 7 ou 10 dias após sua aquisição, dependendo do protocolo. Também demonstramos que a ativação do NMDAR está implicada no decaimento da memória de reconhecimento de objetos (RO), uma tarefa independente do hipocampo. Tomados em conjunto, tais resultados indicam a existência de um processo ativo que modula a plasticidade sináptica responsável pela manutenção da memória ao longo do tempo. Estes resultados sugerem que o processo de esquecimento, independentemente do tipo de memória, é iniciado pelo influxo de Ca^{2+} via L-VDCCs e NMDAR que ativam a CaN.

Materiais e métodos

Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos (2 a 3 meses de idade), pesando entre 300-350g, alocados em gaiolas de plástico (4-5 animais por caixa), mantidos em ambiente controlado com temperatura média de 22 C° e fotoperíodo de 12h, ração e água *ad libitum*. Estes animais foram

fornecidos pelo Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL), órgão auxiliar do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Todos os experimentos foram realizados de acordo com a legislação nacional de orientações e cuidados de animais (Lei 11794/2008) e aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Procedimentos comportamentais

Tarefa de localização de objetos (LO)

Para esta tarefa foram utilizadas caixas quadradas de madeira na cor preta (60 x 60 x 60 cm), duas paredes que se diferenciam em textura em relação ao chão e às outras paredes, nestas fitas brancas proporcionando dicas visuais. Este protocolo consiste em 3 fases diferentes: 1) Sessões de Habituação: ocorre 4 dias prévios ao treino e cada sessão dura 10 minutos. É neste processo que os animais consolidam a memória do contexto, na ausência de objetos; 2) Sessões de Treino: foi realizado em 2 dias e as sessões duram 7 minutos cada. Para o treino os animais foram expostos a mesma caixa da habituação porém são posicionados dois objetos retangulares iguais e adjacentes dentro da caixa e 3) Sessões de Teste: foi realizado 7 dias após o treino. As sessões para cada animal duram 5 minutos. No teste, um objeto é deslocado para a diagonal do outro que se mantém em posição original. O tempo de exploração dos objetos pelo animal, durante o treino e teste, foi gravado e posteriormente cronometrado. Os experimentos foram conduzidos durante o dia, realizados em sala iluminada e silenciosa, com temperatura constante de $\pm 25^{\circ}$ C. Logo após cada sessão (habituação, treino e teste) as caixas e os objetos foram higienizados com etanol 70% para garantir a ausência de pistas olfativas.

Tarefa de reconhecimento de objetos (RO)

Similar ao protocolo de LO, se diferencia apenas durante a sessão de teste de retenção da memória, na qual um dos objetos é substituído por outro que difere em tamanho, textura, forma e cor.

Fármacos

Após o último treino da tarefa de LO, a primeira dose de todas as injeções (seja intraperitoneal, seja subcutânea) foi administrada 6 horas após o término do experimento (tempo pelo qual a memória foi consolidada). Foram utilizados dois antagonistas não seletivos de NMDAR: cloridrato de memantina (Tocris) (10 ou 20 mg/kg) dissolvido em solução salina isotônica estéril, com DMSO 8%, e MK801 (Sigma) (0,1 mg/kg) dissolvido em solução salina isotônica estéril. Devido às propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas destes antagonistas, a memantina foi

administrada uma vez por dia, enquanto MK801 a cada 12 horas (devido sua meia-vida mais curta). Estes fármacos foram administrados durante uma semana ou 10 dias a depender do protocolo. Ambos foram injetados via i.p. O inibidor dos L-VDCCs nimopidina foi adquirido da Sigma-Aldrich, dissolvido em solução salina isotônica estéril, com DMSO 8%, a uma concentração de 16 mg/kg. Nimodipina ou o seu veículo foram administrados via subcutânea uma vez por dia durante uma semana. O inibidor da proteína fosfatase calcineurina FK-506 (Sigma-Aldrich) (5 mg/kg), foi dissolvido em solução salina isotônica estéril, com DMSO 20%. FK-506 ou o seu veículo foram administrados uma vez por dia durante uma semana. Todas as drogas nos experimentos comportamentais foram injetadas em um volume total ajustado em 1 mg/mL.

Coleta e análise de dados

A retenção da memória foi expressa como uma porcentagem do tempo total de exploração para ambos objetos deslocado e em posição original. A exploração é definida somente quando os ratos farejam o objeto, sendo avaliado manualmente por um observador treinado alheio às condições experimentais. O índice de exploração foi calculado como $t_{deslocado} \times 100 / (t_{deslocado} + t_{original})$. As comparações dentro do grupo foram realizadas por meio do teste *t* pareado. Para as comparações entre os grupos foram realizadas mediante one-way ANOVA seguida pelo teste de SNK. Foi utilizado sempre que necessário teste post-hoc SNK. A significância foi estabelecida em $P < 0,05$. Estas análises foram realizadas utilizando a versão 8.0 do software Statistica. Um indivíduo foi excluído como um 'outlier' estatístico (que se encontra mais de 2 desvios-padrão da média do grupo na sessão de treino).

Tamanho das amostras e outras considerações bioéticas relevantes

A partir de trabalhos anteriores do nosso e de outros laboratórios, calculamos amostras de 8 a 12 animais por grupo nos experimentos comportamentais, para um $P < 0,05$ e um poder estatístico igual a 0,90 (por exemplo, Wang *et al.* 2009; Cassini *et al.* 2013).

Concluídos os experimentos, os animais foram anestesiados e sacrificados por decapitação rápida (guilhotinamento) em uma sala diferente daquela em que os experimentos foram realizados (e também longe do ratário). Cumprindo o que predica a diretriz legal brasileira – Lei nº 11.794/2008, todos os procedimentos experimentais com animais vivos (ratos Wistar albinos) envolverão o mínimo de desconforto ou sofrimento, sendo realizados estritamente de acordo com as recomendações da *Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório* (SBCAL/COBEA), da *Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento* (SBNeC), e da *International Brain Research Organization* (IBRO), e somente após a aprovação prévia por parte do Comitê de Ética em Experimentação de nossa Instituição (CEUA/UFRGS).

Resultados

Quando ratos começam a esquecer?

Com o propósito de determinar o tempo pelo qual o esquecimento ocorre, os animais foram treinados em LO, onde foram expostos a 2 objetos idênticos em posições fixas em um contexto já familiar. A fim de avaliar a memória de diferentes grupos 1, 3, 5 ou 7 dias após a sessão do segundo treino, um dos objetos foi deslocado para um canto oposto. Para avaliarmos este tipo de memória, consideramos o tempo de exploração do animal no objeto deslocado. Os índices de preferência de exploração para os grupos e o tempo total de exploração estão representados na Fig. 1. Verificou-se que os animais testados nos dias 1 e 3 expressaram preferência de exploração pelo objeto deslocado ($t(4) = 3,29$, $p = 0,03$; $t(5) = -2,98$; $p = 0,03$, teste t pareado comparando preferência exploratória entre o treino e o teste de memória). No entanto, os animais testados nos dias 5 e 7 não demonstraram preferência ao objeto deslocado ($t(4) = 0,83$; $p = 0,44$; $t(4) = -1,58$; $p = 0,18$, teste t pareado), indicando o esquecimento da memória. O tempo total de exploração aos objetos não foi diferente entre os grupos como revelado pela one-way ANOVA ($F(3,40) = 2,21$; $p = 0,10$; Fig. 1C).

Com isso, neste protocolo o esquecimento da memória inicia em algum momento entre os dias 3 e 5 após o aprendizado.

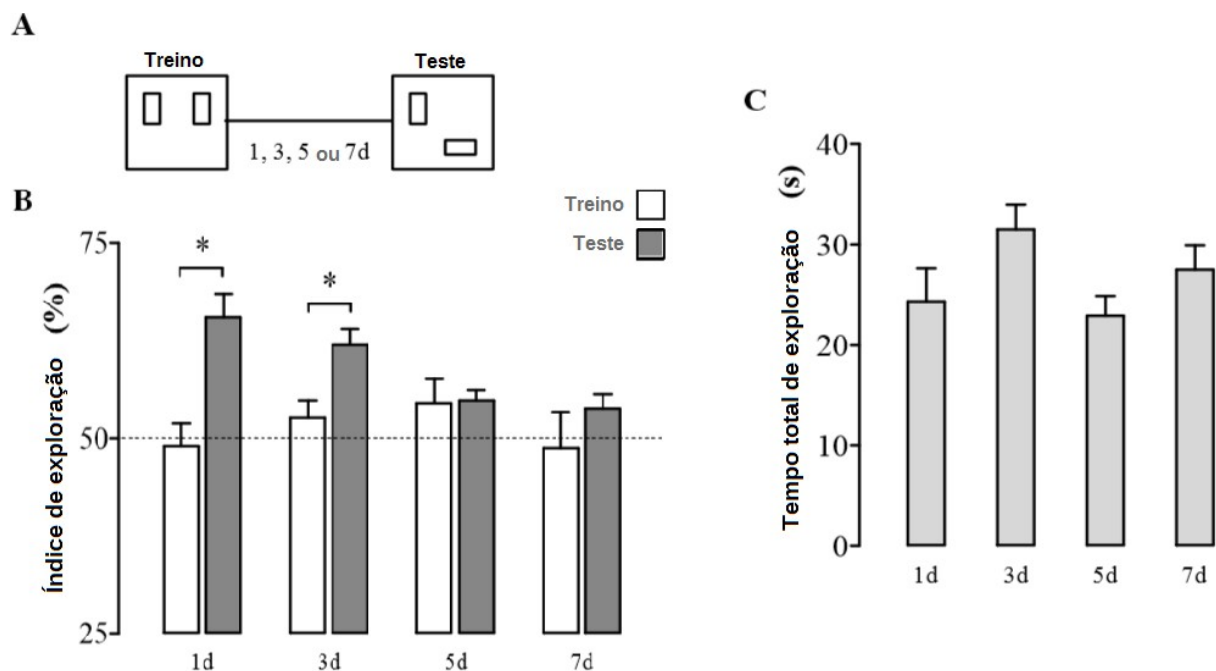


Figura 1. Animais são capazes de evocar a memória de LO em 1 e 3 dias, mas não em 5 ou 7 dias após o treino. (A) Desenho experimental da tarefa de localização de objetos (LO). (B) Taxas de exploração dos objetos em posição original e modificado durante o teste realizado nos dias 1, 3, 5 ou 7 após treino. Os ratos

mantiveram sua memória até o dia 3, uma vez que eles exploraram o objeto que teve sua posição modificada. As barras brancas representam o desempenho do treinamento e as barras cinzas, do teste. A linha pontilhada indica a atividade esperada de exploração entre os objetos deslocado e em posição original. (C) A atividade de exploração total no teste não diferiu entre os grupos. Dados expressos como média \pm SEM. * $P < 0,05$. Todas as outras comparações não foram significativas ($n = 4$ a 6 por grupo).

Papel de receptores NMDA no esquecimento

Para verificar se a inibição de receptores NMDA mantém uma memória de longa duração, assim como foi mostrado em outros estudos (Villarreal *et al.* 200; Shinoara *et al.* 2014), os animais foram testados na tarefa de LO no período de 7 dias em que esta memória usualmente é esquecida. Seis horas após a sessão do segundo treino, foi injetado sistematicamente o antagonista não seletivo de NMDAR memantina (10 ou 20 mg/kg) ou seu veículo uma vez por dia (Fig. 2 B). O teste realizado 7 dias após o treinamento e livre do efeito do fármaco, detectou diferença significativa entre os grupos quanto à exploração do objeto deslocado (one-way ANOVA, $F(2,17) = 5,10$; $p = 0,01$). Comparações *post-hoc* revelaram que o grupo tratado com memantina 20 mg/kg explorou significativamente mais tempo o objeto modificado em relação ao grupo controle ($p = 0,01$). Os grupos memantina 10 mg/kg e veículo não expressaram preferência de exploração entre os objetos no teste em relação à exploração durante o treino ($t(5) = -0,84$; $p = 0,43$; $t(6) = -1,81$; $p = 0,11$, teste *t* pareado), enquanto que o grupo tratado com memantina 20 mg/kg mostrou preferência em explorar o objeto deslocado ($t(5) = -3,41$; $p = 0,01$, teste *t* pareado). O tempo total de exploração não foi diferente entre os grupos como revelado pela ANOVA de uma via ($F(2,33) = 2,25$; $p = 0,12$; Fig. 2 E).

Com interesse em eliminar a possibilidade de um efeito não-seletivo da memantina sobre o esquecimento, foi realizado o mesmo experimento anterior utilizando outro conjunto de animais, porém se injetou outro antagonista de receptores NMDA, o MK801, a cada 12 horas. O grupo tratado com MK801 0,1 mg/kg preferiu explorar o objeto deslocado no teste realizado no dia 7 em comparação ao treino, enquanto que o grupo veículo não mostrou preferência ($t(8) = -9,29$; $p = 0,00001$; $t(5) = -0,98$; $p = 0,36$, teste *t* pareado, Fig. 2 C). Um grupo adicional recebeu MK801 0,1 mg/kg e foi testado para a retenção da memória 10 dias após o treino. Estes animais ainda foram capazes de manter a preferência de exploração no objeto deslocado ($t(6) = -5,52$; $p = 0,001$, teste *t* pareado), indicando que o esquecimento da memória de LO depende da sinalização de NMDAR, conforme descrito na literatura. Os grupos tratados com MK801 (7 ou 10 dias) exploraram mais tempo o objeto deslocado do que o grupo controle (one-way ANOVA, $F(2,19) = 13,078$; $p = 0,0002$, seguido de análise SNK *post hoc*, grupo controle vs MK801 7d, $p = 0,0003$, e controle vs MK801

10d, $p = 0.03$, respectivamente; Fig. 2 C). Os grupos não diferiram no tempo total de exploração (one-way ANOVA, $F(2,43) = 1,50$; $p = 0,23$; Fig. 2 E), indicando que os tratamentos não alteram a atividade de exploração basal.

Visto que a maioria dos estudos acerca dos mecanismos do esquecimento foram realizados em tarefas dependentes de hipocampo (Villarreál *et al.* 2001; Shinoara *et al.* 2014; Dong *et al.* 2015), nos questionamos se os mesmos mecanismos estariam envolvidos em uma tarefa que não depende do hipocampo, como a tarefa de reconhecimento de objetos (RO) (Hardt *et al.* 2010). Para isso, na sessão de teste conduzida 7 dias após o treino, um dos objetos foi substituído por um novo diferente (tamanho, textura, forma e cor), mantendo sua posição original. Assim como o protocolo anterior, o antagonista de NMDAR memantina (20 mg/kg) ou seu veículo foram injetados sistemicamente uma vez por dia entre o treino e o teste (Fig. 2 D). O grupo controle não expressou preferência de exploração pelo objeto novo ($t(5) = 1,07$; $p = 0,33$, teste *t* pareado), sugerindo que a memória de reconhecimento de objetos foi esquecida neste momento. No entanto, o grupo tratado com memantina 20 mg/kg mostrou preferência em explorar o objeto em relação ao antigo apresentado no treinamento ($t(7) = -3,87$; $p = 0,006$, teste *t* pareado). Além disso, o grupo tratado com memantina expressou memória 7 dias após sua formação em comparação ao grupo controle ($t(12) = 2,23$; $p = 0,04$, teste *t* pareado). O tempo total de exploração dos objetos não difere entre os grupos ($t(26) = 1.14$; $p = 0,26$, teste *t* pareado; Fig. 2 E). Estes resultados sugerem que a ativação de receptores NMDA estão envolvidos no esquecimento de memórias que não são dependentes de hipocampo (Hardt *et al.* 2010).

Tomados em conjunto, estes resultados fortalecem a concepção de que o esquecimento requer sinalização mediada por NMDAR e que este mecanismo ocorre em memórias dependentes do hipocampo e de outras regiões encefálicas.

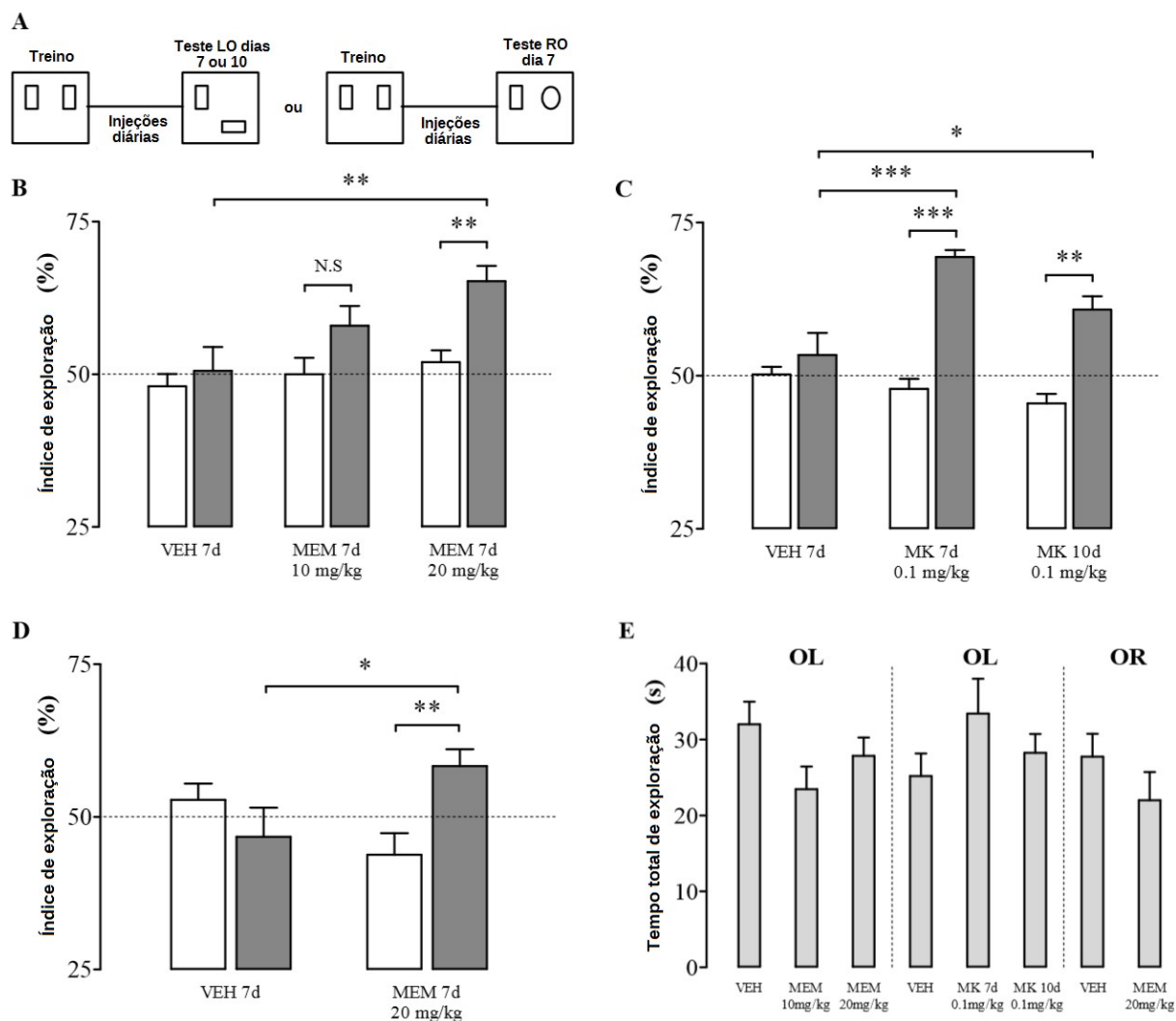


Figura 2. O esquecimento da memória é regulado através da sinalização dependente de NMDAR. (A) Desenho experimental da tarefa de localização de objetos (LO) e de reconhecimento de objetos (RO). (B) Efeito de diferentes doses de memantina sobre o índice de exploração no teste conduzido 7 dias após o treino. As barras brancas representam o objeto em posição original e as barras cinzas, o objeto deslocado. Os animais tratados cronicamente com a dose de 20 mg/kg exploraram significativamente mais tempo o objeto deslocado em comparação aos outros grupos. (C) Injeções crônicas do antagonista de NMDAR MK801 0,1 mg/kg mantiveram a memória de LO em estado de não decaimento durante 7 ou 10 dias. (D) A inibição crônica de NMDAR também regula o esquecimento da memória de RO, não dependente do hipocampo. (E) A exploração total não diferiu entre os grupos, indicando que tanto memantina quanto MK801 não exercem efeito na atividade exploratória basal. Dados expressos como média \pm SEM. * $P < 0,05$ ($n = 6$ a 9 por grupo).

Papel dos L-VDCCs no esquecimento

Os mecanismos que promovem o esquecimento podem envolver várias vias de sinalização de Ca^{2+} . Os L-VDCCs, por exemplo, têm sido associados à desestabilização da memória durante sua atualização (De Oliveira Alvares *et al.* 2013; Sierra *et al.* 2013; Haubrich *et al.* 2015). Para investigar se a ativação de L-VDCCs também está envolvida no esquecimento, os animais foram

submetidos à tarefa de LO como descrito anteriormente. O inibidor de L-VGCCs nimopidina 16 mg/kg ou seu veículo foram injetados uma vez por dia e os testes realizados 7 dias após o treino. Os animais tratados com nimopidina 16 mg/kg preferiram explorar o objeto deslocado ao objeto de posição original quando testados 7 dias após o treino ($t(5) = -4,30$; $p = 0,007$, teste t pareado; Fig. 3B); entretanto, o grupo controle não expressou preferência ($t(5) = -1,56$; $p = 0,17$, teste t pareado). Ambos grupos não diferiram no tempo total de exploração, sugerindo que o tratamento não alterou a atividade de exploração basal ($t(22) = -0,29$; $p = 0,77$, teste t não pareado; Fig. 3C).

Assim, estes resultados demonstram pela primeira vez que o esquecimento da memória de LO é dependente do influxo de cálcio através de L-VGCCs.

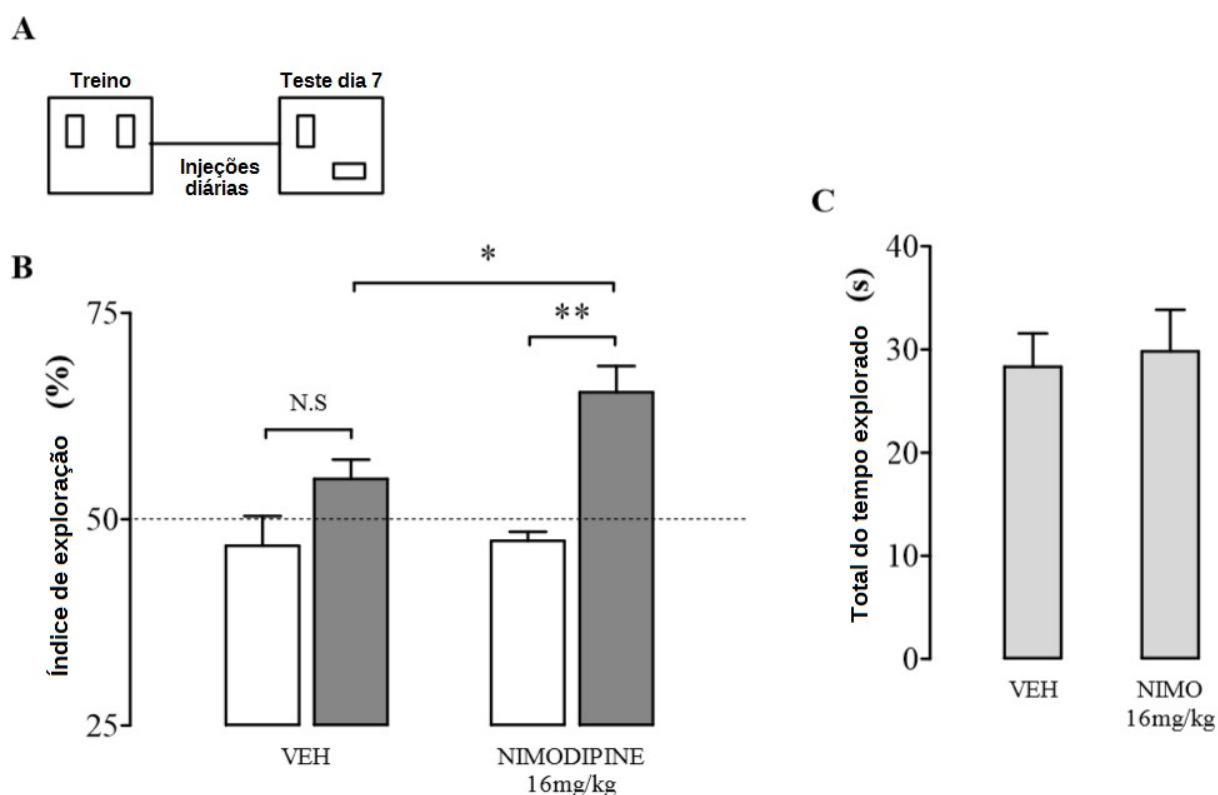


Figura 3. O bloqueio crônico do L-VGCC previne o esquecimento da memória de LO. (A) Desenho experimental da tarefa de LO. (B) Animais tratados com nimopidina 16 mg/kg exploraram mais tempo o objeto deslocado do que o grupo controle, no teste realizado 7 dias após o treinamento. As barras brancas representam o desempenho no treinamento e as barras cinzas, no teste. (C) A exploração total não diferiu entre os grupos. Dados expressos como média \pm SEM. * $P < 0.05$ ($n = 6$ por grupo).

Papel da proteína fosfatase Calcineurina

Os experimentos anteriores mostraram que o influxo de Ca^{2+} através de receptores NMDAR e de L-VGCCs regula o processo de esquecimento. Aqui, investigamos possíveis vias de sinalização ativadas pelo influxo de Ca^{2+} . Algumas fosfatases estão relacionadas com a regulação da

plasticidade sináptica e da memória (Malleret *et al.* 2000; Jovenceau *et al.* 2003; Mansuy *et al.* 2006; Baumgärtel *et al.* 2008; Kandel *et al.* 2014). A fosfatase calcineurina (CaN) é ativada pelo influxo de Ca^{2+} decorrente da ativação de NMDAR e de L-DVCCs (Smith *et al.* 2006; Oliveira *et al.* 2007). Sendo assim, hipotetizamos que se o influxo de Ca^{2+} ativa a proteína CaN e induz o esquecimento, inibindo sua atividade podemos manter a memória ao longo do tempo. Para este fim, os animais foram treinados na tarefa de LO, tratados cronicamente com o inibidor da calcineurina FK506 5 mg/kg ou seu veículo e testados 7 dias após o treinamento. No teste, ambos os grupos mostraram preferência em explorar o objeto deslocado do que o objeto de posição original ($t(7) = -3,33$; $p = 0,013$ e $t(8) = -3,75$; $p = 0,005$, teste t pareado; veículo e FK506, respectivamente; Fig. 4). Entretanto, os animais tratados com FK506 5 mg/kg exploraram significativamente mais tempo o objeto modificado em relação ao grupo controle após 7 dias do treino ($t(15) = 2,86$; $p = 0,01$, teste t não pareado). Os grupos não apresentaram diferença no tempo total de exploração ($t(32) = 0,91$; $p = 0,36$; teste t não pareado; Fig. 4 C), sugerindo que o FK506 não alterou a atividade exploratória.

Estes resultados reafirmam que a proteína fosfatase calcineurina desempenha papel crucial no esquecimento de memórias de longo prazo.

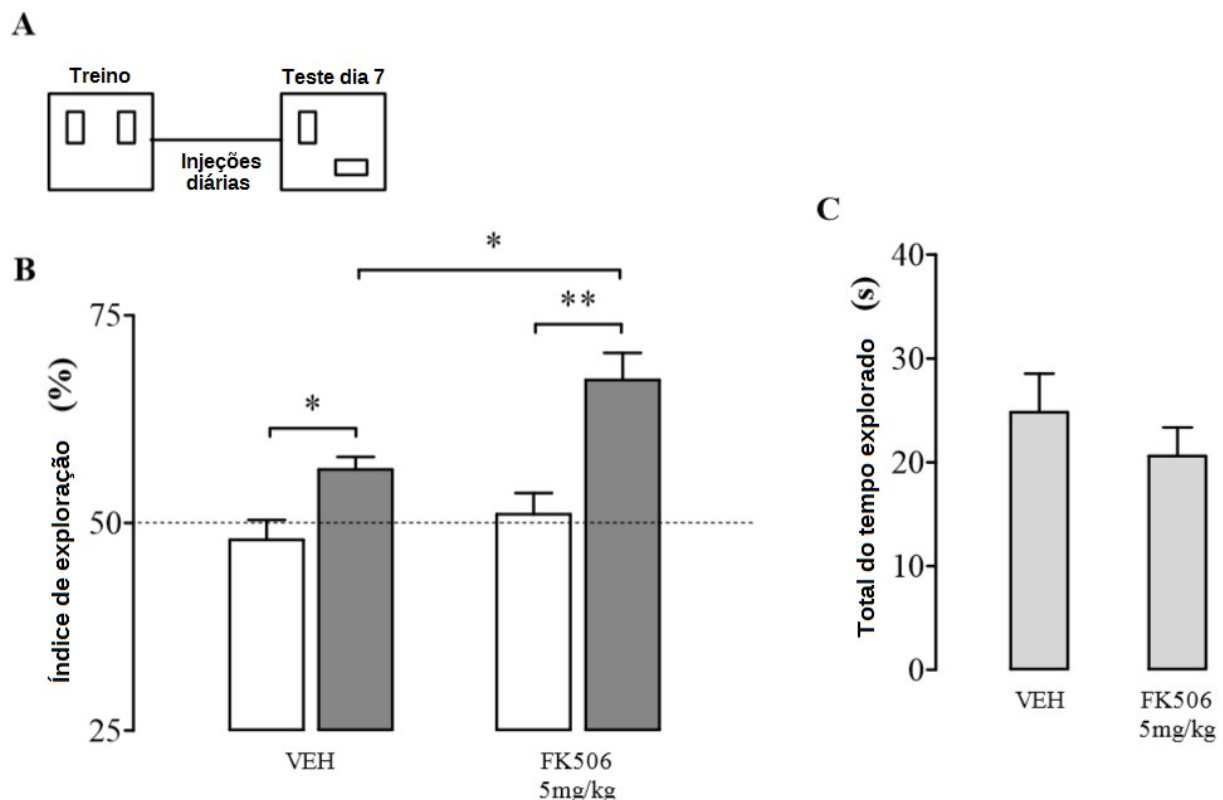


Figura 4. O bloqueio crônico da proteína fosfatase calcineurina previne o esquecimento da memória de localização de objetos. (A) Desenho experimental. (B) Ratos tratados com o inibidor da calcineurina FK506 5 mg/kg exploraram significativamente mais tempo o objeto deslocado em relação ao grupo controle, no teste realizado 7 dias após o treinamento. As barras brancas representam o desempenho no treinamento e as barras cinzas, no teste. (C) A atividade exploratória total indica que não há diferenças entre os grupos. Dados

expressos como média \pm SEM. * $P < 0,05$ (n = 8-9 por grupo).

Discussão

Os mecanismos envolvidos no esquecimento de memórias de longo prazo podem ser resultado da desestabilização dos mesmos mecanismos neurais envolvidos com a formação da memória de longo prazo. Villarreal *et al.* (2002), Hardt *et al.* (2013, 2014) e Dong *et al.* (2015) sugeriram que a plasticidade pós-sináptica desencadeada pelo influxo de Ca^{2+} através da ativação de NMDAR modula o tráfego de AMPAR pós-sináptico, que é necessário para a formação de memórias. Outros modelos teóricos e achados experimentais implicam que a ativação de NMDAR também é fator para o esquecimento (Villarreal *et al.* 2001; Hardt *et al.* 2013, 2014; Shinoara *et al.* 2014; Dong *et al.* 2015), sendo assim hipotetizamos um papel para a sinalização de Ca^{2+} através desse mecanismo relacionado à perda de memória. Para tal, inibimos a ativação de NMDAR, L-VDCCs e calcineurina durante o processo de formação da memória e constatamos que tais intervenções impediram que fosse esquecida a memória ao longo do tempo.

O esquecimento de memórias espaciais de longo prazo adquiridas no labirinto aquático de Morris (Shinoara *et al.* 2014) ou no labirinto radial de oito braços (Villarreal *et al.* 2001), se mostrou dependente da ativação de NMDAR e pode ser evitado com o bloqueio pós-aquisição de NMDAR. Nós utilizamos a tarefa de localização de objetos (LO) para descrever quanto tempo memórias espaciais persistem. De acordo com nosso protocolo, o esquecimento da memória de LO inicia em algum momento entre os dias 3 e 5 após o treinamento. Intervindo na memória de LO com injeções sistêmicas de antagonistas de NMDAR memantina ou MK801 pode-se prevenir o esquecimento dessa memória ao longo do tempo, 7 e 10 dias respectivamente (Fig. 2 B e C). Também testamos a memória de longo prazo na tarefa de reconhecimento de objetos (RO), conhecida por não depender do hipocampo para sua formação (Hardt *et al.* 2010), intervindo com injeções crônicas de memantina e também obtivemos como resultado a prevenção do esquecimento dessa memória (Fig. 2 D). Esses resultados sugerem que a manutenção de memórias de longo prazo em tarefas de LO e RO é dependente da ativação de NMDAR e ocorre em diferentes regiões do encéfalo.

Além de receptores NMDA que permitem o influxo de Ca^{2+} , existem os canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L (L-VDCCs) que também permitem tal influxo. Logo, bloqueamos a ativação desses canais de forma sistêmica utilizando nimopidina após a formação de memória de LO e como resultado tivemos a prevenção do esquecimento a longo prazo dessa memória, assim como o bloqueio de NMDAR (Fig. 3). A perda de memória ao longo do tempo requer a ativação dos L-VDCCs e também a ativação de NMDAR, somente assim há aumento suficiente nos níveis de Ca^{2+} a fim de desencadear mecanismos relevantes e promover o

esquecimento. Estes mecanismos de influxo de Ca^{2+} provavelmente ativam a proteína fosfatase calcineurina (CaN). A calcineurina desfosforila, entre outros alvos, a stargazina promovendo, assim, a endocitose de AMPARs na densidade pós-sináptica (Tomita *et al.* 2005). Com base nesses achados, inibimos a atividade da proteína calcineurina através de injeções sistêmicas de FK506 e também resultou no esquecimento da memória de LO ao longo do tempo (Fig. 4). A endocitose de GluA2-AMPA no hipocampo é necessária para induzir o decaimento da LTP (Dong *et al.* 2015). Provavelmente o esquecimento é impedido porque a endocitose de GluA2-AMPA, especificamente, não ocorre pois a stargazina se mantém interagindo com a proteína PSD95 do domínio PDZ formando um complexo que sustenta os receptores AMPA (Tomita *et al.* 2005). Tomados em conjunto, os nossos resultados proporcionam apoio para um modelo que liga a sinalização de Ca^{2+} através dos NMDAR e L-VDCCs com a ativação da calcineurina, que provavelmente envolverá a remoção pós-sináptica de GluA2-AMPARs. A manutenção da memória de longo prazo, bem como a persistência de LTP requerem a estabilização contínua de AMPARs contendo a subunidade GluA2 nas densidades pós-sinápticas (Migues *et al.* 2010; Hardt *et al.* 2010).

Sugerimos, enfim, que um possível mecanismo biológico que explica que a decadência da memória de longa duração depende principalmente da sinalização de Ca^{2+} através de L-VDCCs ou de NMDAR, que ativa a CaN que por sua vez promove a endocitose de GluA2-AMPA. O esquecimento supostamente trata-se de um processo ativo, visto que memórias de localização de objetos de longo prazo eram mantidas por até algum momento entre 3 e 5 dias no nosso protocolo e através do bloqueio de NMDAR e L-VDCCs e da inativação da CaN estas foram mantidas, inclusive por até 10 dias no protocolo do tratamento de MK801 (Fig.2 C). Sendo assim, podemos inferir que se mantivermos esses mecanismos inibidos podemos perdurar a permanência de memórias.

Conclusão

O esquecimento de uma memória de longa duração dependente do hipocampo inicia entre os dias 3 e 5 após o aprendizado em tarefa de localização de objetos. Após a aquisição da memória, o bloqueio do influxo de Ca^{2+} através dos L-VDCCs e dos receptores NMDA previne o esquecimento da memória de LO por 7 ou 10 dias, dependendo do protocolo. O mesmo efeito de manutenção da memória espacial foi observado através da inibição crônica da proteína fosfatase calcineurina, que está implicada na desfosforilação da stargazina – necessária para induzir a endocitose dos receptores AMPA em neurônios excitatórios pós-sinápticos. A ativação dos receptores NMDA também é necessária para induzir o decaimento da memória de RO, conhecida por ser independente do

hipocampo. A desestabilização de um complexo proteico pós-sináptico provocado pela ativação de calcineurina pelo influxo de Ca^{2+} , especificamente através de L-VDCCs e de NMDAR, deve ser o mecanismo responsável pela endocitose dos receptores AMPA para promover o esquecimento da memória de longa duração.

Referências:

1. Baumgärtel, K. et al. Control of the establishment of aversive memory by calcineurin and Zif268. *Nat Neurosci* 11, 572-8 (2008).
2. Brigman, J. L. et al. Loss of GluN2B-containing NMDA receptors in CA1 hippocampus and cortex impairs long-term depression, reduces dendritic spine density, and disrupts learning. *J Neurosci* 30, 4590-600 (2008).
3. Cassini LF, Sierra RO, Haubrich J, Crestani AP, Santana F, de Oliveira Alvares L, Quillfeldt JA. Memory reconsolidation allows the consolidation of a concomitant weak learning through a synaptic tagging and capture mechanism. *Hippocampus*. Oct;23(10):931-41. (2013).
4. Constals, A. et al. Glutamate-Induced AMPA Receptor Desensitization Increases Their Mobility and Modulates Short-Term Plasticity through Unbinding from Stargazin Article Glutamate-Induced AMPA Receptor Desensitization Increases Their Mobility and Modulates Short-Term Plastic. , p.787–803 (2015).
5. Dalton, G. L., Wu, D. C., Wang, Y. T., Floresco, S. B. & Phillips, A, G. NMDA GluN2A and GluN2B receptors play separate roles in the induction of LTP and LTD in the amygdala and in the acquisition and extinction of conditioned fear. *Neuropharmacology* 62, 797-806 (2012).
6. De Oliveira Alvares, L. et al. Reactivation enables memory updating, precisionkeeping and strengthening: exploring the possible biological roles of reconsolidation. *Neuroscience* 244, 42-8 (2013).
7. Dong, Z. et al. Long-term potentiation decay and memory loss are mediated by AMPAR endocytosis. *J Clin Invest* 125, 234-47 (2015).
8. Haubrich, J. et al. Reconsolidation allows fear memory to be updated to a less aversive level through incorporation of appetitive information. *Neuropsychopharmacology* 40, 315-26 (2015).
9. Hardt, O., Miguez, P. V., Hastings, M., Wong, J. & Nader, K. PKM ζ maintains 1-day- and 6-day-old long-term object location but not object identity memory in dorsal hippocampus. *Hippocampus* 20, 691-5 (2010).
10. Hardt, O., Nader, K. & Nadel, L. Decay happens: the role of active forgetting in memory. *Trends Cogn Sci* 17, 111-20 (2013).
11. Hardt, O., Nader, K. & Wang, Y. T. GluA2-dependent AMPA receptor endocytosis and the decay of early and late long-term potentiation: possible mechanisms for forgetting of short- and

long-term memories. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 369, 20130141 (2014).

12. Jouvenceau, A., Billard, J. M., Haditsch, U., Mansuy, I. M. & Dutar, P. Different phosphatase-dependent mechanisms mediate long-term depression and depotentiation of long-term potentiation in mouse hippocampal CA1 area. *Eur J Neurosci* 18, 1279-85 (2003).
13. Kandel, E. R., Dudai, Y. & Mayford, MR. The molecular and systems biology of memory. *Cell* 157, 163-86 (2014).
14. Lu, Y. M., Mansuy, I. M., Kandel, E. R. & Roder, J. Calcineurin-mediated LTD of GABAergic inhibition underlies the increased excitability of CA1 neurons associated with LTP. *Neuron* 26, 197-205 (2000).
15. Malleret, G. et al. Inducible and reversible enhancement of learning, memory, and long-term potentiation by genetic inhibition of calcineurin. *Cell* 104, 675-86 (2000).
16. Mansuy, I.M. & Shenolikar, S. Protein serine/threonine phosphatases in neuronal plasticity and disorders of learning and memory. *Trends Neurosci* 29, 679-86 (2006).
17. Miguez, P. V. et al. PKMzeta maintains memories by regulating GluR2-dependent AMPA receptor trafficking. *Nat Neurosci* 13, 630-4 (2010).
18. Oliveira, S. F., Dell'Acqua, M.L. & Sather, W. A. AKAP79/150 anchoring of calcineurin controls L-type Ca²⁺ channel activity and nuclear signaling. *Neuron* 55, 261-75 (2007).
19. Priel, A. et al. Stargazin Reduces Desensitization and Slows Deactivation of the AMPA-Type Glutamate Receptors. *J Neurosci* 25(10), p.2682–2686. (2005).
20. Sierra, R.O. et al. Reconsolidation may incorporate state-dependency into previously consolidated memories. *Learn Mem* 20, 379-87 (2013).
21. Shinohara, K. & Hata, T. Post-acquisition hippocampal NMDA receptor blockade sustains retention of spatial reference memory in Morris water maze. *Behav Brain Res* 259, 261-67 (2014).
22. Shipton, O.A., Paulsen, O. & Paulsen, O. GluN2A and GluN2B subunit-containing NMDA receptors in hippocampal plasticity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2, 369 (2014).
23. Smith, K. E., Gibson, E.S. & Dell'Acqua, M. L. cAMP-dependent protein kinase postsynaptic localization regulated by NMDA receptor activation through translocation of an A-kinase anchoring protein scaffold protein. *J Neurosci* 26, 2391-402 (2006).
24. Suzuki, A., Mukawa, T., Tsukagoshi, A., Frankland, P. W. & Kida, S. Activation of LVGCCs and CB1 receptors required for destabilization of reactivated contextual fear memories. *Learn Mem* 15, 426-33 (2008).
25. Tomita, S., Stein, V., Stocker, T. J., Nicoll, R. A. & Brecht, D. S. Bidirectional synaptic plasticity regulated by phosphorylation of stargazine-like TARPs. *Neuron* 45, 269-77 (2005).
26. Villarreal, D. M., Do, V., Haddad, E. & Derrick, B. E. NMDA receptor antagonists sustain LTP and spatial memory: active processes mediate LTP decay. *Nat Neurosci* 5, 48-52 (2001).

27. Wang, D. et al., Genetic enhancement of memory and long-term potentiation but not CA1 long-term depression in NR2B transgenic rats. *PloS one*, 4(10), p.e7486. (2009).