

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**MARCELO OTAVIO RODRIGUES GUASSELLI**

**A MANUTENÇÃO DA MEMÓRIA ATRAVÉS DA MIOSINA IIB**

**Porto Alegre**

**2018**

**MARCELO OTAVIO RODRIGUES GUASSELLI**

**A MANUTENÇÃO DA MEMÓRIA ATRAVÉS DA MIOSINA IIB**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado como requisito parcial para  
obtenção do título de Bacharel em Ciências  
Biológicas na Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Lucas de Oliveira  
Alvares

Co-orientador: Mateus Oliveira Silva

**Porto Alegre**

**2018**

## 1. REFERENCIAL TEÓRICO

A memória consiste em processos de aquisição, consolidação e evocação de informações e confere a capacidade de alterarmos nosso comportamento em decorrência de uma experiência prévia. As inúmeras informações que chegam ao cérebro são selecionadas e de forma consciente ou não são posteriormente armazenadas ou eliminadas (Helene & Xavier, 2003; Izquierdo, 2011).

A aquisição da memória é o recebimento e retenção destas informações. A consolidação é um processo de fixação onde as memórias se tornam cada vez mais resistentes à ruptura (Suzuki et al., 2004), existindo a consolidação sináptica e a consolidação sistêmica. Naquela, uma ativação induzida por cascatas de sinalização intracelular resulta em uma modulação da expressão gênica e síntese de produtos gênicos que alteram a eficácia sináptica e chega ao fim em poucas horas de sua iniciação se tornando resistente a agentes amnésicos (estímulos ou agentes farmacológicos) que possam impedir que a memória seja convertida na forma de longo prazo (Dudai, Karni, & Born, 2015; Mcgaugh, 2015). Na consolidação sistêmica existe uma reorganização dependente de tempo da memória de longo prazo em diferentes áreas do cérebro. Finalmente, a evocação pode ser chamada de recuperação e representa a expressão do aprendizado. Essa recuperação da memória pode iniciar dois processos potencialmente dissociáveis, a reconsolidação que resulta numa atualização da memória e a extinção que favorece a formação de uma nova memória suprimindo a expressão da memória original. A memória suprimida pela memória de extinção pode voltar a ser expressa em um fenômeno chamado recuperação espontânea (Quirk, 2002; Suzuki et al., 2004).

As memórias podem ser classificadas pelo seu tempo de duração e por seu conteúdo. Quanto ao tempo, a memória de trabalho serve para manter durante alguns segundos ou no máximo poucos minutos a informação que está sendo adquirida no momento e é processada fundamentalmente pelo córtex pré-frontal. A memória de curta duração dura de alguns minutos até algumas horas, nessas primeiras horas após sua aquisição, são lábeis e suscetíveis à interferência podendo ser convertidas em uma memória de longa duração que podem permanecer por dias, meses ou anos. Quanto ao seu conteúdo, existem as memórias declarativas, que registram fatos, eventos ou conhecimento e as não-declarativas ou de

procedimentos, que são memórias de capacidades ou habilidades motoras e sensoriais (Izquierdo, 2011).

Com cada experiência adquirida, mudanças contínuas ocorrem a nível sináptico. Essas sinapses são pontos de comunicação entre células nervosas e são enfraquecidas ou fortalecidas em um processo de constante mudança da chamada neuroplasticidade (Askenasy & Lehmann, 2013). Uma sinapse é tipicamente definida pela presença de uma zona ativa pré-sináptica contendo as vesículas que contêm os neurotransmissores (substâncias químicas produzidas nas terminações dos axônios), uma fenda sináptica bem definida e uma densidade pós-sináptica onde estão presentes os receptores ionotrópicos e metabotrópicos para os neurotransmissores. As sinapses podem ser axo-espínicas, axo-axônicas, axo-somáticas, somato-dendríticas, dendro-axônicas e dendro-dendríticas (Merlo et al., 2011; Izquierdo, 2011).

Segundo Frankfurt & Luine, 2015, é cada vez mais claro que o sistema nervoso é capaz de plasticidade e que o espinho dendrítico está posicionado para ser o principal local deste processo. Esses espinhos são pequenas protrusões da membrana celular especializadas na compartimentalização sináptica e abrigam sinapses glutamatérgicas mediando a grande maioria das transmissões sinápticas excitatórias no cérebro (Merlo et al., 2011). Como parte do processo de estabelecimento de redes neurais, espinhos dendríticos se desenvolvem, crescem em tamanho e são retraídos (Frankfurt & Luine, 2015). Esses espinhos são gerados e eliminados durante a intensa atividade neuronal que acompanha a indução de uma potenciação de longa duração (LTP) e o tamanho da cabeça do espinho está relacionado com a força sináptica, sofrendo alterações durante a plasticidade sináptica (Tønnesen et al., 2014). Esta potenciação de longa duração de respostas sinápticas excitatórias é considerada o substrato de múltiplas formas de aprendizagem e pode ser usada para investigar os eventos moleculares subjacentes à aquisição e manutenção da memória declarativa. O modelo celular dominante de formação da memória é a LTP na região CA1 do hipocampo onde ocorrem alterações na morfologia dos espinhos e nas sinapses (Rex et al., 2010). Estas observações apoiam a ideia de que as alterações estruturais dos espinhos estão ligadas aos processos adaptativos e de aprendizagem (Kasai et al., 2003).

O citoesqueleto dos espinhos dendríticos está composto em grande parte por actina filamentosa e esses filamentos interagem com proteínas motoras como a

miosina, uma das proteínas que atuam no processo de reconfiguração deste citoesqueleto. As miosinas são uma grande família de proteínas motoras citoesqueléticas que interagem com filamentos de actina usando energia derivada da hidrólise de ATP para gerar movimento e força (Kneussel e Wagner, 2013). Essa interação de polimerização e despolimerização confere diferentes formas aos espinhos.

Existem 35 classes de miosina conhecidas e os humanos possuem 40 genes delas compondo 13 classes. Dentre elas estão as classes II, V e VI que participam ativamente da plasticidade sináptica. As miosinas da classe V são moléculas motoras que utilizam os filamentos de actinas como trilhos para posicionar e transportar diversas moléculas. As miosinas da classe VI atuam em diversos estágios do transporte de membrana. Já as miosinas da classe II atuam na dinâmica e organização dos citoesqueletos de actina dos espinhos dendríticos (Kneussel e Wagner, 2013).

A miosina da classe II é um polipeptídeo hexamérico composto de duas cadeias pesadas e dois pares de cadeias leves reguladoras. Nos vertebrados, a miosina II é tipicamente dividida em duas classes: a miosina sarcomérica II presente abundantemente no músculo esquelético e a miosina II não-muscular. A miosina II não-muscular está presente no cérebro em três isoformas, A e B são encontradas predominantemente nas células neurais enquanto a C é expressa principalmente na vasculatura (Ryu et al., 2006; Kneussel & Wagner, 2013). A inibição das não-musculares por meio farmacológico e genético interfere em processos relacionados a memórias aversivas. Estes processos dependentes da miosina II parecem envolver alterações na dinâmica da actina (Rex et al., 2010).

A miosina IIB encontra-se em neurônios maduros do hipocampo principalmente na região dos espinhos (no pescoço e na região proximal da cabeça) e às vezes sobrepondo proteínas de ancoramento na PSD (densidade pós-sináptica, do inglês *postsynaptic density*) (Kneussel & Wagner, 2013). Estudos revelaram um envolvimento da miosina IIB com a dinâmica estrutural dos espinhos dendríticos ao inibir a atividade ATPásica da miosina utilizando o inibidor blebistatina (Ryu et al., 2006). Rex et al., 2010 observaram um prejuízo no processo de consolidação da memória de longo prazo infundindo blebistatina na região CA1 do hipocampo. Outros estudos revelaram um envolvimento da miosina IIB no armazenamento de memórias relacionadas a drogas como a metanfetamina (METH) infundindo

blebistatina na região da amígdala (Young et al., 2016). Estes estudos demonstram que a miosina IIB pode estar envolvida em processos de diferentes tipos de memória.

## 2. ARTIGO CIENTÍFICO

**Periódico:** Journal of Neuroscience

**Título:** A manutenção da memória através da miosina IIB

**Normas da revista:** Disponível no Anexo A e no link <http://www.jneurosci.org/content/information-authors>

## RESUMO

A memória possui diversos processos que envolvem a aquisição, conservação e recuperação de informações. A capacidade do sistema nervoso de moldar-se e adaptar-se a nível estrutural em decorrência de experiências prévias envolve mecanismos de plasticidade sináptica. O espinho dendrítico está posicionado para ser o principal local destes eventos de plasticidade e abriga sinapses glutamatérgicas que medeiam a grande maioria das transmissões sinápticas excitatórias. Alterações estruturais destes espinhos estão relacionadas aos processos adaptativos e de aprendizagem. A proteína motora miosina IIB interage com os filamentos de actina do citoesqueleto dos espinhos dendríticos atuando em sua dinâmica. Aqui, vimos que a inibição farmacológica da miosina IIB interfere em processos de consolidação, armazenamento, persistência e expressão da memória de medo. Também observamos evidências de que a miosina IIB pode não estar envolvida nos processos de persistência e flexibilização de uma memória espacial.

## 1. INTRODUÇÃO

A memória é uma importante função do organismo e consiste na capacidade de reter, armazenar e recuperar informações. Qualitativamente, as memórias podem diferenciar-se onde as informações podem ser armazenadas de forma abstrata ou retidas de forma detalhada e específica (Helene & Xavier, 2003; Izquierdo, 2011; Pedraza et al., 2015). Na memória de longo prazo todos estes mecanismos de codificação, retenção, armazenamento e recuperação estão envolvidos. Cada experiência adquirida envolve mudanças a nível sináptico.

As sinapses sofrem enfraquecimento ou fortalecimento e o espinho dendrítico está posicionado para ser o principal local desta atividade de plasticidade. Estes espinhos são pequenas protruções da membrana celular especializadas na compartimentalização sináptica e abrigam sinapses glutamatérgicas mediando a grande maioria das transmissões sinápticas excitatórias no cérebro (Merlo et al., 2011; Askenasy & Lehmann, 2013; Frankfurt & Luine, 2015). A indução de um potencial de longa duração (LTP) é acompanhada pela intensa atividade neuronal

onde os espinhos têm sua dinâmica alterada se desenvolvendo, crescendo em tamanho ou sendo retraídos como parte dos processos de estabelecimento de redes neurais. Estas observações apoiam a ideia de que as alterações a nível estrutural nos espinhos estão ligadas aos processos adaptativos e de aprendizagem (Kasai et al., 2003; Frankfurt & Luine, 2015).

A reconfiguração do citoesqueleto dos espinhos dendríticos é feita por proteínas motoras como a miosina que interage com os filamentos de actina usando energia derivada da hidrólise de ATP para gerar movimento e força. Essa interação de polimerização e despolimerização confere diferentes formas aos espinhos (Kneussel & Wagner, 2013).

A miosina da classe II não-muscular é um polipeptídeo hexamérico presente no cérebro em 3 isoformas (A, B e C). Estudos demonstraram que a inibição das não-musculares por meio farmacológico e genético é capaz de interferir em processos relacionados a memória de medo. Estes processos dependentes da miosina II parecem envolver alterações na dinâmica da actina (Ryu et al., 2006; Rex et al., 2010; Kneussel & Wagner, 2013).

A miosina IIB está presente principalmente na região do pescoço e na parte proximal da cabeça dos espinhos dendríticos, sobrepondo também algumas proteínas de ancoramento na região da densidade pós-sináptica (Kneussel & Wagner, 2013). Estudos realizados por Ryu et al., 2006 revelaram que espinhos com formato *mushroom* foram transformados em espinhos do tipo filopodia após a aplicação de um inibidor da miosina IIB, a blebistatina, em células do hipocampo, o que evidenciou a relação da miosina IIB com a morfologia dos espinhos. Rex et al., 2010 infundiram a blebistatina na região CA1 do hipocampo de ratos e observaram um prejuízo na consolidação da memória de longa duração associando um choque ao contexto. Outro estudo realizado por Young et al., 2016 demonstrou que memórias associadas a metanfetamina (METH) sofreram um prejuízo em seu armazenamento após a aplicação de blebistatina na região da amígdala, onde há menor densidade de espinhos. Estes estudos revelam um envolvimento da miosina IIB em diferentes tipos de memória.

Aqui, nosso objetivo é avaliar o papel da miosina IIB na manutenção de diferentes tipos de memória.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

## 2.1 Animais

O presente trabalho seguiu os princípios éticos recomendados pela lei AROUCA (nº 11.794, de 8 de outubro de 2008), bem como as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado sob número de 33025 (CEUA). Utilizamos ratos *Wistar* machos com idade aproximada de 60 dias e pesando entre 250 e 300g. Esses animais foram fornecidos pelo Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL), órgão auxiliar do CEUA e do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) do Programa de Pós-Graduação Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Durante o protocolo experimental os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Biofísica (Instituto de Biociências, Laboratório de Neurobiologia da Memória), acondicionados de 4 a 5 animais por caixa de policarbonato, respeitando a área recomendada pela normativa do CONCEA, sendo que um rato de 200-300g necessita de 187,05cm<sup>2</sup>, logo cinco animais necessitam de 935,25cm<sup>2</sup>, assim as caixas utilizadas comportam e respeitam na íntegra a normativa do CONCEA, (47 X 30 X 20 cm), receberam água e comida *ad libitum* e foram mantidos em um ambiente com temperatura controlada (20°C ±2) e ciclo claro/escuro de 12 horas.

## 2.2 Procedimentos cirúrgicos

Neste trabalho, as estruturas de interesse foram a região CA1 do hipocampo dorsal. As coordenadas destas estruturas foram obtidas, inicialmente, a partir do Atlas de Paxinos & Watson (1986), de acordo com a faixa de peso dos animais utilizados. Em nosso trabalho, foram fixadas cânulas intracerebrais e, através destas, injetadas as substâncias através um tipo de agulha mais fina ("*mizzy*", de calibre 30), introduzida por dentro da primeira.

### 2.2.1 Anestesia

Os animais foram anestesiados com um anestésico geral, Cetamina, juntamente com Xilazina, um sedativo/miorrelaxante/analgésico, administrados intraperitonealmente (i.p.), nas doses de 75mg/Kg e 10mg/Kg, respectivamente. O volume da solução utilizado foi de 2mL/kg.

### 2.2.2 Craniotomia e colocação de cânulas

Cada animal operado foi cuidadosamente colocado em um Aparelho Estereotáxico (Fabricação: David Kopf, modelo 1404), e a superfície de seu crânio exposta mediante incisão sagital com bisturi Nº 20 ou 21. Uma craniotomia bilateral foi feita com o emprego de uma broca odontológica nos locais correspondentes às coordenadas ântero-posteriores (AP) e láterolaterais (LL) da estrutura em questão. Uma cânula de aço inoxidável (manufaturada a partir de agulha com diâmetro interno de 0,7 mm, calibre ou gauge 27, e diâmetro interno de 0,3 mm), presa à torre móvel do estereotáxico, foi introduzida cuidadosamente através de cada um desses orifícios feitos na calota craniana e baixada lentamente até a coordenada dorso-ventral (DV) definitiva. A cânula foi, então, fixada nesta posição com acrílico dentário, aplicado ainda quando na forma de um líquido espesso, que deixamos secar e consolidar. O acrílico foi trabalhado para formar uma espécie de "capacete" sobre o osso do crânio, fechando a janela óssea produzida. As cânulas mantêm-se fixas na posição desejada por tempo suficiente após a cirurgia (10 dias, no mínimo).

### **2.2.3 Pós-operatório**

Imediatamente após a cirurgia, os animais foram mantidos numa câmara pós-operatória, mantidos em repouso e aquecidos sob uma lâmpada vermelha de 40watts, por três horas (é importante destacar que os roedores não enxergam no comprimento de onda da luz vermelha, e nosso objetivo foi minimizar a possível interferência no ciclo claro/escuro pelo qual está adaptado). Para reduzir o índice pós operatório de infecção, os animais receberam, 30 minutos antes da cirurgia e 24 horas após, a administração de um antibiótico, Tilosina ("Tilomai", de fabricação Lumai) 10 mg/Kg, 10 mg/mL, i.m.. Caso constatado algum processo infeccioso em qualquer momento durante os experimentos, serão aplicadas 2 doses adicionais, separadas por um intervalo de 24h. Para o manejo algico/nociceptivo pós-operatório foi administrado meloxicam, 1 mg/kg, p.o., 1x/dia, por 3 dias. Após decorrido um período de recuperação pós operatória de 5-7 dias, os animais foram submetidos às tarefas comportamentais.

### **2.3 Infusão intracerebral**

Os animais foram cuidadosamente imobilizados, envolvidos em um pano e segurados com uma mão pelo experimentador. A agulha *mizzy* conectada por um tubo P10 de polietileno a uma microsseringa Hamilton contendo o fármaco foi

inserida cuidadosamente na cânula até travar, que se dá quando sua extremidade penetrou o trecho final do tecido. A microseringa foi então acionada (manual ou automaticamente) para empurrar 0,5 µL da solução do fármaco em um período de 90 segundos, aguardando mais 30 segundos antes de ser removida para que o fármaco se difunda; o procedimento foi repetido identicamente do outro lado.

## **2.4 Controle histológico das cirurgias**

A verificação do acerto da posição da cânula no encéfalo do animal foi feita em todos os animais aproveitados nas tarefas comportamentais, isto é, em todos aqueles que cumpriam as seguintes condições: (a) recuperação integral da cirurgia de implantação das cânulas, (b) conservação do capacete de acrílico até o momento da injeção, e (c) cânulas fixas e desobstruídas no momento da injeção. Após a realização das tarefas comportamentais, os animais foram eutanasiados por overdose de cetamina e xilazina seguida de guilhotinamento. Em seguida os encéfalos foram dissecados e colocados em solução de paraformaldeído/sacarose 20% por 48-72 h para posterior análise no microscópio óptico.

## **2.5 Fármacos**

Para a realização deste trabalho foram utilizados os seguintes fármacos em suas respectivas concentrações: inibidor de miosina IIB - Blebistatina (TOCRIS; 90ng/µl), e DMSO 10%, veículo no qual a blebistatina é diluída.

Os fármacos foram administrados na região CA1 do hipocampo dorsal num volume de 0,5µL por lado.

## **2.6 Procedimentos comportamentais**

### **2.6.1 Experimento de memória de Condicionamento Aversivo Contextual (CAC)**

Para a avaliação de memórias aversivas em ratos, um teste amplamente conhecido é a tarefa de condicionamento aversivo contextual (CAC). Esse teste foi realizado em uma caixa automatizada (Fabricação Albarsch) de dimensões 25 X 25 X 25 cm, cuja parede frontal é de vidro, através do qual observam-se as respostas comportamentais (como *freezing*); seu assoalho é composto por uma grade de

barras de bronze de 1mm de diâmetro cada, distantes 1cm uma das outras. Nesta grade aplica-se uma diferença de potencial elétrico, obtendo-se, conseqüentemente, uma corrente elétrica de 0,2 a 1,0 mA, conforme o desejado.

Sessão de Condicionamento: Os animais foram colocados na caixa de condicionamento. Aos 3 minutos eles receberam 2 choques de 1 segundo cada, após 30 segundos os animais receberam mais 2 choques, a intensidade dos choques foi de 0,7mA. Os animais permaneceram por mais 30s antes de voltarem para suas caixas de habitação.

Sessão de Teste: Os animais foram testados por 4 minutos, através da simples reexposição ao contexto.

### **2.6.2 Experimento do aprendizado reverso no Labirinto Aquático de Morris (Morris Water Maze)**

O labirinto aquático de Morris (MWM) é um teste de aprendizado espacial para roedores que se baseia em pistas distantes para navegar a partir de locais de partida ao redor do perímetro de uma arena de natação aberta para localizar uma plataforma de escape submersa. Encheu-se o tanque de forma que a plataforma ficasse dois dedos abaixo da superfície da água. A aprendizagem espacial foi avaliada através de ensaios repetidos e a memória de referência foi determinada pela preferência pela área da plataforma quando a plataforma estava ausente. Os animais foram submetidos à tarefa por 12 dias consecutivos, sendo que nos cinco primeiros dias a plataforma ficou sempre no mesmo lugar. Os animais foram largados dos quatro pontos cardeais randomicamente a cada *trial*, com a cabeça virada para a parede do labirinto (sendo realizados oito *trials* consecutivos por dia). Eles tiveram 60 segundos para encontrar a plataforma (tempo de um *trial*) e, quando não encontraram foram conduzidos até ela e permaneceram 20 segundos sobre ela para que pudessem se localizar e localizar a plataforma no contexto (se o animal encontrou a plataforma antes também permaneceu 20 segundos sobre ela). O tempo que o animal levou para encontrar a plataforma foi anotado em cada *trial*. Ao final destes primeiros dias houve uma sessão de teste sem a plataforma onde foi avaliado o tempo que o animal permaneceu no quadrante onde estava a plataforma e este foi comparado ao tempo que o animal passou em outros quadrantes. No sétimo dia infundimos a blebistatina. Do oitavo ao décimo primeiro dia os animais

foram submetidos ao treino de aprendizado reverso com quatro *trials* e a plataforma localizada no quadrante oposto. Ao final os animais foram submetidos a uma nova sessão de teste sem plataforma.

### **2.6.3 Experimento de Extinção da Memória**

Neste experimento, os animais foram submetidos a uma sessão de treino onde foram colocados em um contexto relacionado a um choque de 0,7mA. Os animais permaneceram no contexto por 4 minutos e receberam o choque aos 3 minutos e aos 3 minutos e 30 segundos. 48 horas após o treino os animais foram submetidos a uma sessão de extinção onde permaneceram por 30 minutos em um contexto diferente -porém similar- sem receber choque e o *freezing* foi contabilizado em blocos de 10 minutos. 24 horas após a sessão de extinção infundimos a blebistatina e no dia seguinte fizemos o primeiro teste onde foi contabilizado o tempo de *freezing*. Após vinte dias, os animais foram reexpostos ao contexto onde foram treinados primariamente, em uma sessão de recuperação espontânea.

### **2.6.4 Análise estatística**

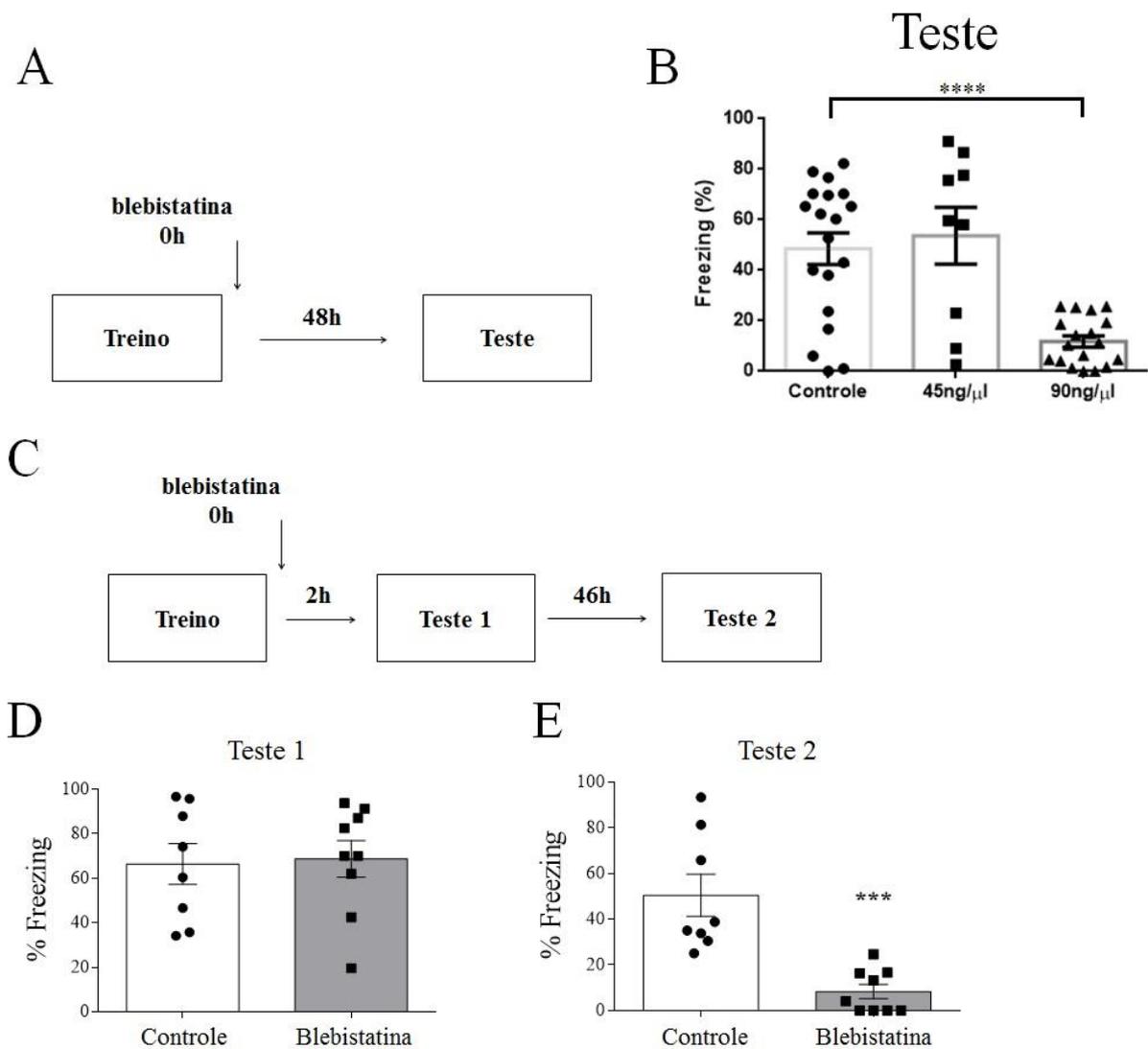
As análises estatísticas foram realizadas usando o teste *T* independente, ANOVA de uma via, ANOVA de duas vias e ANOVA de medidas repetidas. O nível de significância utilizado foi  $P < 0,05$ .

## **3. RESULTADOS**

### **A Miosina IIB é importante para a consolidação da memória de longo prazo**

Primeiramente realizamos uma curva dose-resposta para identificar a dose mais eficaz de blebistatina. As concentrações utilizadas foram de 45ng/ $\mu$ L e 90ng/ $\mu$ L sendo infundidas na região CA1 do hipocampo imediatamente após a sessão de treino no CAC e testando os animais 2 dias após (Fig. 1A,B). A dose de 90ng/ $\mu$ L se mostrou mais eficaz, prejudicando a consolidação da memória de longo prazo ( $F_{2, 43} = 14,55$ ;  $P < 0,0001$ ). A dose de 45ng/ $\mu$ L teve efeito disperso evidenciando uma heterogeneidade dos dados ( $F_{2, 43} = 14,55$ ;  $P > 0,9999$ ) (Fig. 1B). Optamos então utilizar a dose de 90ng/ $\mu$ L em nossos experimentos. Avaliamos as memórias de curto e longo prazo testando os animais 2 horas após a infusão da blebistatina (memória de curto prazo) e retestamos 46 horas após (memória de longo prazo) (Fig. 1C). A memória de curto prazo não foi afetada por essa dose ( $T_{15} = 0,1873$ ;  $P =$

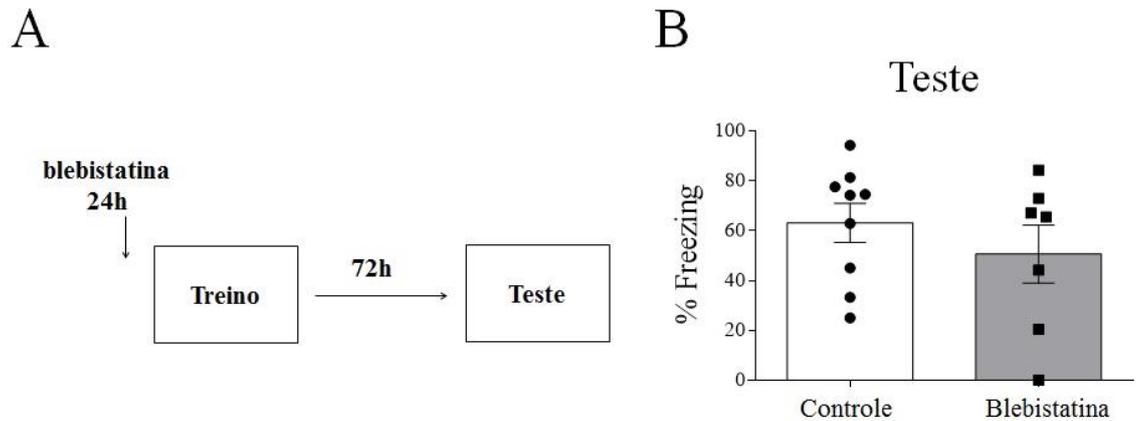
0,8540) (Fig. 1D), já a memória de longo prazo foi prejudicada com a inibição desta proteína ( $T_{15} = 4,546$ ;  $P = 0,0004$ ) (Fig. 1E). Estes resultados indicam que a miosina IIB está envolvida nos processos de consolidação da memória de longo prazo.



**Figura 1.** A miosina IIB não é importante para a memória de curto prazo, mas sim para a de longo prazo. (A) Representação esquemática do desenho experimental da curva dose-resposta de blebbistatina. (B) Porcentagem do comportamento de *freezing* no teste com diferentes concentrações da substância. ANOVA de uma via, post hoc Bonferroni.  $n_{\text{controle}} = 19$ ;  $n_{45\text{ng}/\mu\text{L}} = 9$ ;  $n_{90\text{ng}/\mu\text{L}} = 18$ . \*\*\*\* ( $P < 0,0001$ ). (C) Representação esquemática do desenho experimental dos testes de memória de curto e longo prazo. (D) Porcentagem do comportamento de *freezing* no teste de memória de curto prazo. Teste *T* independente,  $n_{\text{controle}} = 8$ ;  $n_{\text{blebbistatina}} = 9$ . (E) Porcentagem do comportamento de *freezing* no teste de memória de longo prazo. Teste *T* independente,  $n_{\text{controle}} = 8$ ;  $n_{\text{blebbistatina}} = 9$ . \*\*\* ( $P < 0,001$ )

**Infusão de blebbistatina antes do treino não impede a aquisição da memória**

A fim de avaliar se a infusão de blebistatina causaria alguma toxicidade ou algum dano ao hipocampo, infundimos a droga nessa estrutura antes do treino de condicionamento aversivo ao contexto e testamos os animais 72 horas após (Fig. 2A). A infusão do inibidor da miosina IIB não impediu a aquisição de uma memória aversiva ( $T_{14} = 0.9262$ ;  $P = 0.3700$ ), concluindo que essa substância não lesiona a estrutura ou impede o aprendizado (Fig. 2B).

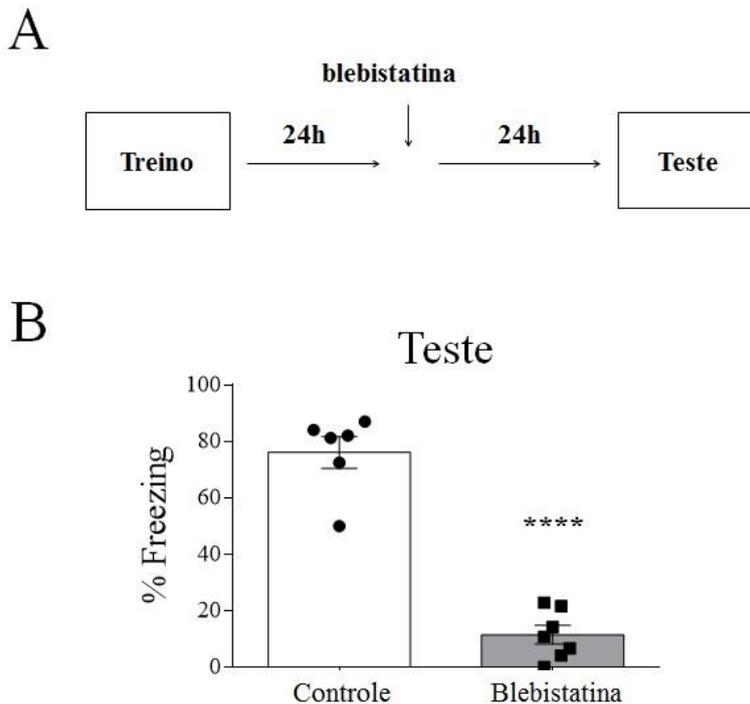


**Figura 2.** A inibição da miosina IIB pré-treino não impediu a aquisição da memória. (A) Representação esquemática do desenho experimental do teste de aquisição da memória de medo. (B) Porcentagem do comportamento de *freezing* no teste de aquisição da memória de medo. Teste  $T$  independente,  $n_{\text{controle}} = 9$ ;  $n_{\text{blebistatina}} = 7$ .

### Miosina IIB é importante para a manutenção da memória

Visto que a miosina IIB pode estar envolvida na consolidação da memória de longo prazo, buscamos avaliar até que ponto ela poderia estar participando destes processos. Analisamos então na tarefa de condicionamento aversivo ao contexto (CAC), seu papel após a janela de consolidação, investigando se ela estaria envolvida com a persistência da memória.

Para avaliar o armazenamento da memória (hipocampo-dependente), treinamos os animais, infundimos a blebistatina 24 horas após o treino e testamos 24 horas após a infusão (Fig. 3A). O desempenho do grupo de drogas foi severamente prejudicado ( $T_{11} = 10,33$ ;  $P < 0,0001$ ), mostrando que a miosina IIB está realmente envolvida com a persistência da memória (Fig. 3B).



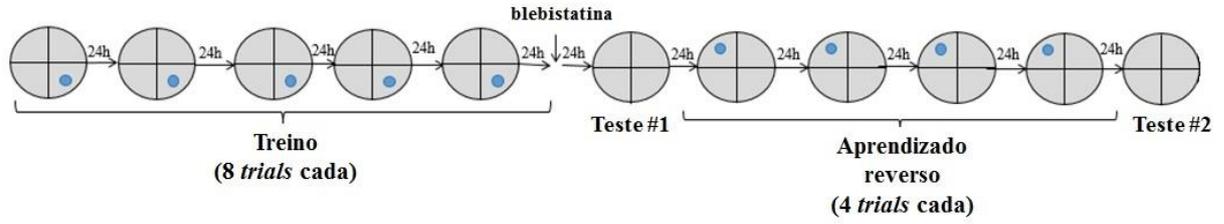
**Figura 3.** A inibição da miosina IIB sem reativação mostrou a sua importância para a manutenção da memória (A) Representação esquemática do desenho experimental do teste de avaliação da persistência da memória. (B) Porcentagem do comportamento de *freezing* no teste de persistência da memória. Teste *T* independente,  $n_{\text{controle}} = 6$ ;  $n_{\text{blebistatina}} = 7$ . \*\*\* ( $P < 0,0001$ )

### **A inibição da miosina IIB não prejudicou a persistência de uma memória espacial nem a sua flexibilização**

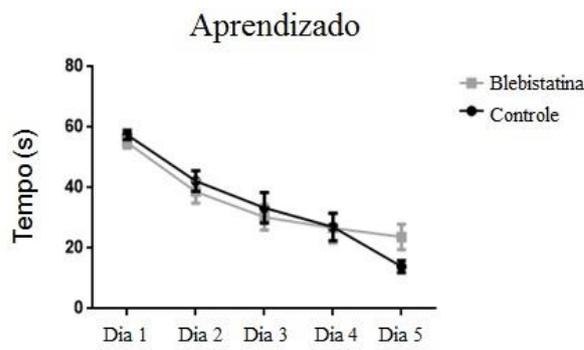
Na tarefa do labirinto aquático de Morris, usado para avaliar a aprendizagem hipocampo-dependente de uma memória espacial (Fig. 4A), primeiramente submetemos os animais a um treino para localização de uma plataforma em um quadrante alvo durante 5 dias (Fig. 4B). Os animais tiveram uma diminuição no tempo de localização da plataforma alvo ao longo dos dias com uma diferença significativa do primeiro para último dia ( $F_{4,72} = 57,09$ ;  $P < 0,0001$ ) (Fig. 4B). Não houve diferença no desempenho entre os grupos ( $F_{4,72} = 2,186$ ;  $P = 0,0791$ ) (Fig. 4B). Levantamos a hipótese de que ao inibir a atividade da miosina IIB após o treino de aprendizado a persistência desta memória espacial seria prejudicada. Então, infundimos a blebistatina na região CA1 do hipocampo 24 horas após a última sessão de aprendizado (onde a memória já estaria consolidada) e testamos 24 horas após (Fig 4A). Para nossa surpresa, o tempo permanecido no quadrante alvo onde estava localizada a plataforma foi semelhante entre os grupos Controle e

Blebisatina ( $F_{1,36} = 0,2788$ ;  $P = 0,6007$ ) e o tempo permanecido no quadrante alvo foi maior que o tempo permanecido no quadrante oposto ( $F_{1,36} = 10,04$ ;  $P = 0,0031$ ) para ambos os grupos (Fig. 4C). Avaliamos também o número de cruzamentos pelo local exato onde estava localizada a plataforma no quadrante alvo. Não houve diferença significativa entre os grupos no número de cruzamentos pelo local da plataforma alvo ( $F_{1,36} = 0,1169$ ;  $P = 0,7344$ ) e ambos os grupos cruzaram mais pelo local da plataforma no quadrante alvo ( $F_{1,36} = 6,870$ ;  $P = 0,0128$ ) visto que eles não passaram ainda pela tarefa de aprendizado reverso (Fig. 4D). Estes resultados indicam que a miosina IIB não está envolvida com a persistência de uma memória espacial. Avaliamos também a flexibilização da memória espacial a fim de verificar se a blebistatina iria interferir em um novo aprendizado semelhante. Submetemos os mesmos animais a uma tarefa de aprendizado reverso, onde a plataforma foi colocada no quadrante oposto. Os animais foram treinados por 4 dias e testados no quinto dia (Fig. 4A). Ambos os grupos tiveram uma diminuição no tempo de localização da plataforma no quadrante oposto com uma diferença significativa entre o primeiro e o último dia ( $F_{4,72} = 57,09$ ;  $P < 0,0001$ ) (Fig.4E). Não houve diferença no desempenho entre os grupos ( $F_{4,72} = 2,186$ ;  $P = 0,0791$ ) (Fig.4E). No teste do aprendizado reverso, não houve diferença significativa entre os grupos no tempo em que permaneceram no quadrante oposto, onde estava localizada a plataforma ( $F_{1,36} = 0,5724$ ;  $P = 0,4542$ ) e o tempo permanecido no quadrante em que estava localizada a plataforma foi maior do que o tempo permanecido no quadrante alvo ( $F_{1,36} = 31,06$ ;  $P < 0,0001$ ) (Fig. 4F). O número de cruzamentos pelo local exato onde estava localizada a plataforma no quadrante oposto foi semelhante entre os grupos ( $F_{1,36} = 0,5039$ ;  $P = 0,4824$ ) e ambos os grupos cruzaram mais pelo local da plataforma no quadrante oposto do que pelo local da plataforma no quadrante alvo ( $F_{1,36} = 37,27$ ;  $P < 0,0001$ ) (Fig. 4G). Estes resultados indicam que a inibição da miosina IIB não prejudica a flexibilização da memória.

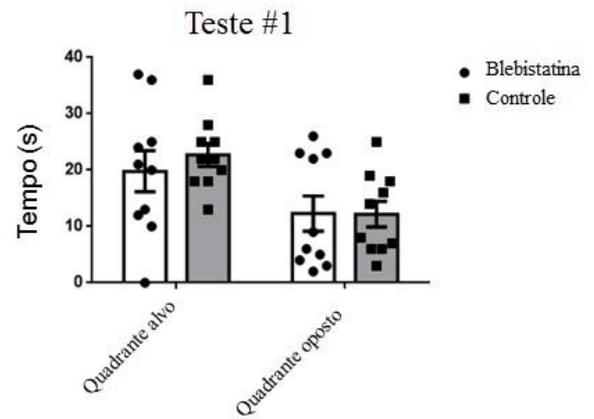
A



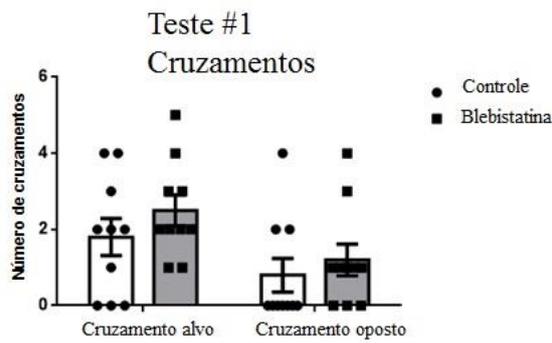
B



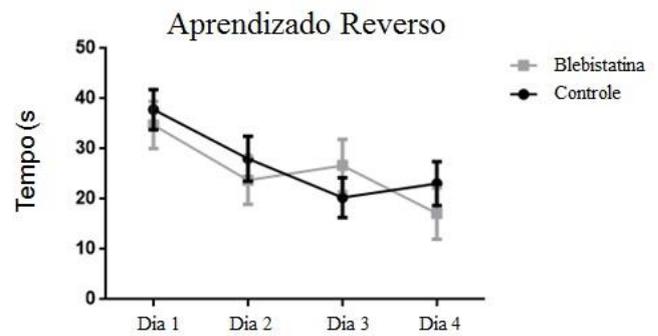
C



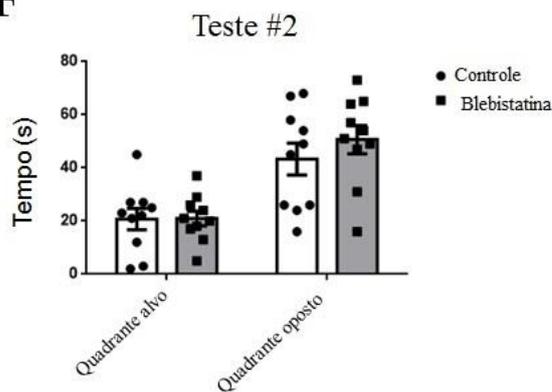
D



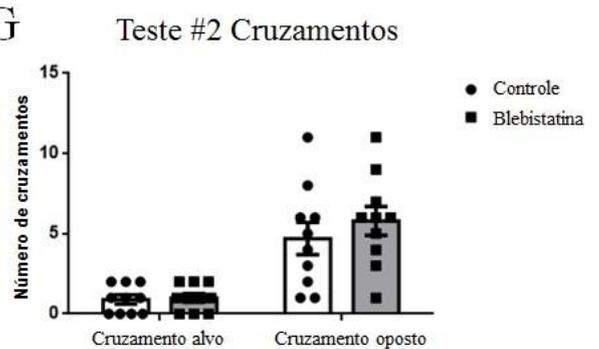
E



F



G

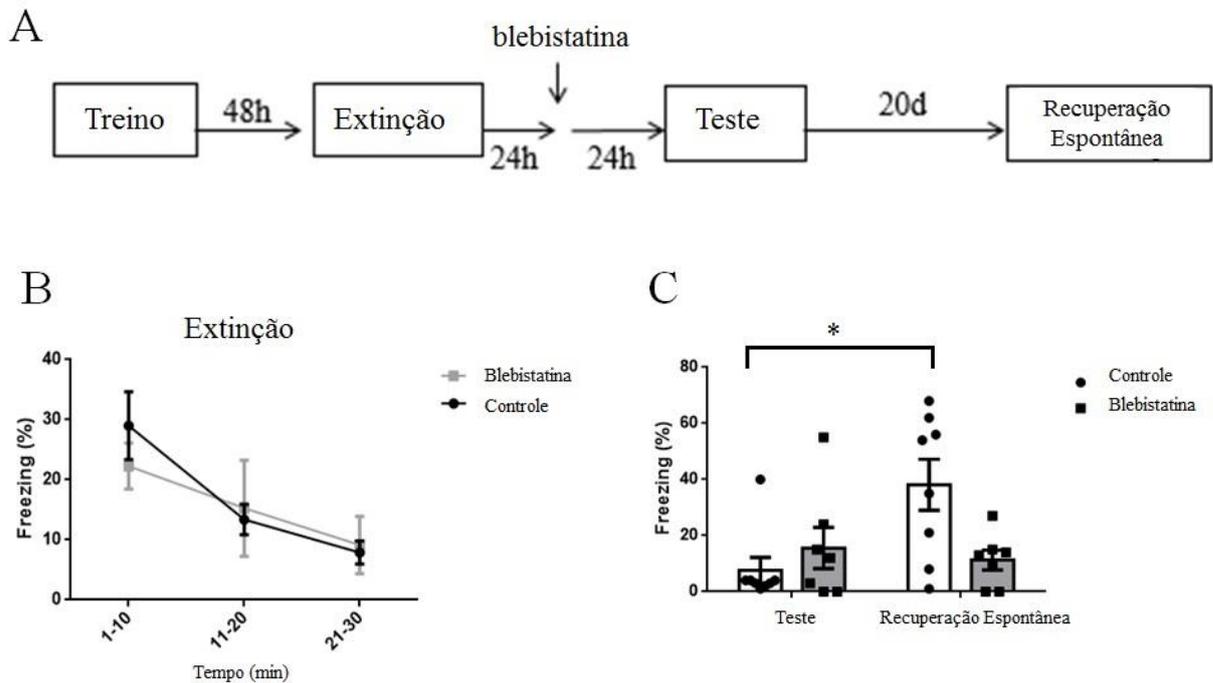


**Figura 4.** A Inibição da miosina IIB não demonstrou interferência na persistência e flexibilização da memória espacial (A) Representação esquemática do desenho experimental do teste do labirinto aquático de Morris (*Morris Water Maze*). (B). Curva de aprendizado. ANOVA de medidas repetidas, post hoc Bonferroni. (C) Tempo passado no quadrante alvo e no quadrante oposto na primeira sessão de teste. ANOVA de duas vias, post hoc Bonferroni. (D) Número de cruzamentos nos locais das plataformas alvo e oposta. ANOVA de duas vias, post hoc Bonferroni (E) Curva de aprendizado reverso. ANOVA de medidas repetidas, post hoc Bonferroni (F) Tempo passado no quadrante alvo e no quadrante oposto no teste de aprendizado reverso. ANOVA de duas vias, post hoc Bonferroni. (G) Número de cruzamentos nos locais das plataformas alvo e oposta no teste de aprendizado reverso. ANOVA de duas vias, post hoc Bonferroni.  $n_{\text{controle}} = 10$ ;  $n_{\text{blebistatina}} = 7$ .

### **Inibição da miosina IIB prejudica a memória de medo em um protocolo de extinção**

Após uma sessão de treino de condicionamento aversivo ao contexto, uma exposição de longa duração ao mesmo contexto, porém, sem o estímulo condicionado (choque) pode formar uma nova memória que coexiste com a memória aversiva anteriormente formada, porém suprime sua expressão em um fenômeno chamado extinção da memória. Submetemos os animais a uma sessão de treino no CAC e 48 horas após, quando esta memória já havia passado pela janela de consolidação, realizamos a sessão de extinção (Fig. 5A). Ambos os grupos apresentaram uma redução significativa no comportamento de *freezing* durante os 30 minutos ( $F_{2, 26} = 15,56$ ;  $P < 0,0001$ ) e não houve diferença entre os grupos ( $F_{2, 26} = 1,183$ ;  $P = 0,3223$ ) indicando que os animais tiveram a memória de medo suprimida (Fig. 5B). A fim de avaliar os efeitos da inibição da miosina IIB sobre a persistência desta memória de extinção infundimos a blebistatina na região CA1 do hipocampo 24 horas após a sessão de extinção e testamos os animais 24 horas depois (Fig 5A). Levantamos a hipótese de que no teste os animais que receberam a blebistatina teriam esta memória de extinção prejudicada e voltariam a expressar a memória aversiva que foi suprimida. Ambos os grupos tiveram desempenho semelhante onde a memória de medo suprimida não foi evocada no teste ( $F_{1, 26} = 3,861$ ;  $P = 0,0602$ ) indicando que a blebistatina poderia estar afetando a persistência das duas memórias (Fig. 5C). A memória suprimida pela memória de extinção pode voltar a ser expressa em um fenômeno chamado recuperação espontânea. Então, para avaliar este fenômeno testamos os animais novamente 20 dias após (Fig 5A). O

grupo controle foi capaz de novamente expressar a memória de medo, porém, o grupo Blebistatina não ( $F_{1, 26} = 6,799$ ;  $P = 0,0149$ ). Estes resultados corroboram com a nossa hipótese de que a blebistatina estaria prejudicando a persistência da memória, podendo estar prejudicando as duas formas (Fig. 5C).



**Figura 5.** Inibição da miosina IIB prejudicou a memória de medo em um protocolo de extinção (A) Representação esquemática do desenho experimental do teste de memória de extinção e recuperação espontânea. (B) Curva de extinção. ANOVA de medidas repetidas, post hoc Bonferroni (C) Porcentagem do comportamento de *freezing* nas sessões de teste e recuperação espontânea (20 dias). ANOVA de duas vias, post hoc Bonferroni.  $n_{\text{controle}} = 8$ ;  $n_{\text{blebistatina}} = 7$ . \* ( $P < 0,05$ )

#### 4. Discussão

Mudanças duradouras na forma e tamanho dos espinhos dendríticos estão relacionadas à formação e manutenção da memória. A reorganização do citoesqueleto de actina, que muda a forma e tamanho do espinho, ocorre pela polimerização e despolimerização destes filamentos de actina. Esta dinâmica é essencial para a plasticidade sináptica e é regulada por proteínas (Rex et al., 2010; Popik et al., 2018). Popik et al., 2018 demonstraram que a calpaína, uma protease de cisteína, está envolvida na dinâmica da actina e é importante para a formação, expressão e reconsolidação da memória. Em experimentos realizados por Lunardi et

al., 2017 a via LIMK-Cofilina se demonstrou importante para a recuperação da memória.

Outros estudos revelaram o envolvimento da proteína motora miosina IIB no processamento de diferentes tipos de memória (Ryu et al., 2006; Rex et al., 2010; Gavin et al., 2012). Buscamos então avaliar seu papel que ainda é pouco elucidado. Como visto na literatura, utiliza-se a dose de 90ng/ $\mu$ L para infusão de blebistatina, inibidor da miosina IIB (Rex et al., 2010; Gavin et al., 2012). Nossa curva dose-resposta mostrou que a dose de 90ng/ $\mu$ L é eficaz. Rex et al., 2010 observaram um prejuízo na memória de longo prazo, mas não na memória de curto prazo ao infundir blebistatina na região CA1 do hipocampo, mostrando que a miosina IIB é importante para os processos de consolidação da memória. Em nosso novo experimento, a miosina IIB também se demonstrou importante para a consolidação da memória de longo prazo, mas não para a de curto prazo, com um protocolo de infusão imediatamente após o treino. Resultados semelhantes os quais sugerem que a miosina é uma importante proteína envolvida nestes de processos que envolvem a consolidação da memória de longo prazo. Rex et al., 2010 demonstraram em seus experimentos que a blebistatina não interfere na aquisição da memória aversiva quando infundida antes do treino no hipocampo. Gavin et al., 2012 obtiveram resultados semelhantes ao infundir blebistatina na região da amígdala basolateral antes da sessão de treino. Semelhantes, nossos resultados demonstraram que a blebistatina não lesiona o hipocampo, não impedindo a formação de uma nova memória.

Casagrande et al., 2018 demonstraram que a janela de consolidação da memória dura em torno de 6 horas dependendo das condições experimentais. Então, avaliando a persistência de uma memória aversiva vimos que a blebistatina foi capaz de interferir na manutenção da memória ao ser infundida após a janela de consolidação. Estes resultados mostraram um envolvimento da miosina IIB com a persistência da memória de longo prazo.

Avaliando a memória espacial na tarefa do labirinto aquático de Morris, vimos que ambos os grupos foram capazes de aprender uma nova tarefa, mostrando uma redução no tempo de localização da plataforma ao longo dos dias. Com isto avaliamos se a blebistatina prejudicaria a persistência desta memória. Nossa hipótese era de que ao inibir a atividade da miosina IIB após o treino de aprendizado

a persistência desta memória espacial seria prejudicada. Nossos resultados demonstraram que a inibição da miosina IIB não interferiu na persistência da memória adquirida indicando e que ela pode não estar envolvida com este processo na memória espacial. Para avaliar a flexibilização da memória nossa hipótese inicial era de que os animais que receberam a blebistatina teriam um desempenho melhor no aprendizado reverso, pois não haveria o conflito de informações geradas pela memória anteriormente formada no primeiro aprendizado, porém, como a persistência da memória espacial criada no primeiro treino de localização da plataforma alvo não foi prejudicada, verificamos se a inibição da miosina IIB iria interferir de alguma forma, em um novo aprendizado de localização da plataforma. Nossos resultados demonstraram que ambos os grupos foram capazes de aprenderem uma nova tarefa e que a blebistatina não interferiu nesse processo. Juntos esses resultados indicam que a miosina IIB pode não estar envolvida com a persistência nem com a flexibilização da memória espacial.

Após o condicionamento aversivo ao contexto, uma exposição de longa duração ao mesmo contexto, porém, sem o estímulo condicionado (choque) pode formar uma nova memória que coexiste com a memória aversiva anteriormente formada e esta nova memória suprime a expressão da memória aversiva em um fenômeno chamado extinção (Quirk, 2002; Suzuki et al., 2004). Vimos que nesta tarefa ambos os grupos foram capazes de criar esta memória de extinção. Então, avaliamos a persistência desta memória com a hipótese de que no teste os animais que receberam a blebistatina teriam esta memória de extinção prejudicada e voltariam a expressar a memória aversiva que foi suprimida. Nossos resultados demonstraram que a blebistatina poderia estar interferindo na persistência das duas memórias formadas. Comentado por Quirk, 2002, a memória suprimida pela memória de extinção pode voltar a ser expressa em um fenômeno chamado recuperação espontânea. Então, avaliando este fenômeno vimos que a blebistatina pode estar interferindo na persistência das duas memórias formadas, onde apenas o grupo Controle foi capaz de evocar novamente a memória de medo.

Young et al., 2016, ao estudar memórias relacionadas a metanfetamina (METH), viu que estas foram prejudicadas pela aplicação de blebistatina. Estudos adicionais sobre as propriedades desta proteína podem lançar uma luz sobre os processos destas memórias relacionadas a drogas, que possuem componentes

aversivos. Também sobre o possível uso terapêutico da blebistatina para pessoas que sofrem Transtorno de Estresse Pós-Traumático (TEPT). Uma compreensão mais detalhada da mecânica da miosina IIB pode facilitar a descoberta de novas abordagens sobre a manipulação da memória e da cognição em doenças neurológicas e psiquiátricas (Gavin et al., 2012).

Juntos nossos resultados demonstram que a miosina IIB é uma importante proteína do citoesqueleto e está envolvida na consolidação, armazenamento, persistência e expressão de memórias aversivas.

## 5. Referências

- Askenasy, J., Lehmann, J. & Voss, U. (2013). Consciousness, brain, neuroplasticity, 4(July), 1–10.
- Casagrande, M. A., Haubrich, J., Pedraza, L. K., Popik, B., Quillfeldt, A. & Alvares, L. D. O. (2018). Synaptic consolidation as a temporally variable process: uncovering the parameters modulating its time-course. *Neurobiology of Learning and Memory*.
- Dudai, Y., Karni, A. & Born, J. (2015). Perspective the consolidation and transformation of memory. *Neuron*, 88(1), 20–32.
- Frankfurt, M. & Luine, V. (2015). Hormones and behavior the evolving role of dendritic spines and memory: Interaction ( s ) with estradiol. *Hormones and Behavior*, 1–9.
- Gavin, C. F., Rubio, M. D., Young, E., Miller, C. & Rumbaugh, G. (2012). Myosin II motor activity in the lateral amygdala is required for fear memory consolidation Myosin II motor activity in the lateral amygdala is required for fear memory consolidation, 9–14.
- Helene, A. F. & Xavier, G. F. (2003). A construção da atenção a partir da memória Building attention from memory, 25(Supl II), 12–20.
- Izquierdo, I. (2011) *Memória*. 2.ed. Porto Alegre: Artmed.
- Kasai, H., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Yasumatsu, N. & Nakahara, H. (2003). Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends in Neurosciences*,

26(7), 360–368.

Kneussel, M. & Wagner, W. (2013). Myosin motors at neuronal synapses: Drivers of membrane transport and actin dynamics. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(4), 233–247.

Lunardi, P., Sachser, R. M., Sierra, R. O., Pedraza, L. K., Medina, C. & Fuente, V. De. (2017). Effects of hippocampal LIMK inhibition on memory acquisition, consolidation, retrieval, reconsolidation, and extinction. *Molecular Neurobiology*.

McGaugh, J. L. (2015). Consolidating memories. *Annual review of psychology*, 66, 1–24.

Merlo, S., Brusco, J., Padovan-Neto, F., Rohner, C., Ikeda, Érika, Ross, J., Bueno Júnior, L., Ruggiero, R., Fachim, H. & Moreira, J. (2011). O ciclo da vesícula sináptica, espinhos dendríticos e a transdução de sinal. *Medicina (Ribeirão Preto. Online)*, 44(2), 157–171.

Paxinos, G. C., Watson (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York: Academic, 8.

Pedraza, L. K., Sierra, R. O., Boos, F. Z., Haubrich, J., Quillfeldt, J. A. & de Oliveira Alvares, L. (2015). The dynamic nature of systems consolidation: Stress during learning as a switch guiding the rate of the hippocampal dependency and memory quality. *Hippocampus*, 26(3), 362–371.

Popik, B., Crestani, A. P., Silva, M. O., Quillfeldt, J. A. & de Oliveira Alvares, L. (2018). Calpain modulates fear memory consolidation, retrieval and reconsolidation in the hippocampus. *Neurobiology of Learning and Memory*, 151, 53–58.

Quirk, G. J. (2002). Memory for extinction of conditioned fear is long-lasting and persists following spontaneous recovery. *Learning & Memory*, 9, 402–407.

Rex, C. S., Gavin, C. F., Rubio, M. D., Kramar, E. A., Chen, L. Y., Jia, Y., Huganir, R. L., Muzyczka, N., Gall, C. M., Miller, C. A., Lynch, G. & Rumbaugh, G. (2010). Article myosin IIb regulates actin dynamics during synaptic plasticity and memory formation. *Neuron*, 67(4), 603–617.

Ryu, J., Liu, L., Wong, T. P., Wu, D. C., Burette, A., Weinberg, R., Wang, Y. T & Sheng, M. (2006). A critical role for myosin IIB in dendritic spine morphology and

synaptic function. *Neuron*, 49(2), 175–182.

Suzuki, A.; Josselyn, S. A., Frankland, P. W, Masushige, S., Silva, A. J & Kida, S. (2004). Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *Journal of Neuroscience*, 24(20), 4787–4795.

Tønnesen, J., Katona, G., Rózsa, B. & Nägerl, U. V. (2014). Spine neck plasticity regulates compartmentalization of synapses. *Nature Neuroscience*, 17(5), 678–685.

Young, E. J., Blouin, A. M., Briggs, S. B., Sullivan, S. E., Lin, L., Cameron, M. D., Rumbaugh, G. & Miller, C. A. (2016). Nonmuscle myosin IIB as a therapeutic target for the prevention of relapse to methamphetamine use. *Molecular psychiatry*, 21(5), 615.

## **ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA JOURNAL OF NEUROSCIENCE**

### **Checklist for Initial Submissions of Research Articles**

#### **Submission:**

- The submission may be either a single PDF file containing all text and figures (pages and figures must be numbered) or multiple files: a manuscript file in Word, WordPerfect, RTF, LaTeX or text format and each figure in a separate TIFF (300 dpi) or EPS file.
- Submissions that contain data included in a previously rejected manuscript for which a revision was NOT invited must have Senior Editor input before submitting the new manuscript.
- Individual files must always be provided for multimedia (MP4) and extended data
- The authors, title and abstract inserted on the submission form must match those in the manuscript files
- Preferred and excluded reviewers and editors may be specified on the submission form
- Cover letter is optional
- Credit card information must be used for payment of submission fee (waived if first and last authors are SfN members)

#### **Text:**

- Sections appear in the following order: Title Page, Abstract, Significance Statement, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, References, Figure/Table/Extended Data Legends
- All pages double spaced and numbered (except the title page)
- No broken URLs in text
- No Footnotes or Appendices are present
- No reference to Supplemental Material appears in the text, figures, or tables
- Extended data (if provided) are cited within the body of the text or figure/table legend they support. Label as Figure 1-1, Table 1-1, etc. (i.e. Extended Data table supporting Figure 5 labeled as Figure 5-1).

#### **Title Page Includes:**

- Title (50 words maximum)

- Abbreviated title (50 characters maximum)
- Names and affiliations of each author
- Corresponding author's name and email address
- Number of figures, tables, multimedia, and extended data figures/tables (separately)
- Number of words for Abstract, Introduction, and Discussion (separately, including any citations)
- Financial interests or conflicts of interest (if applicable)
- Acknowledgements (optional)

**Abstract:**

- Word count is  $\leq 250$
- Species studied is identified in abstract (or title)
- Sex of subjects is stated (male; female; of either sex; of unknown sex)
- No subheadings are present

**Significance Statement:**

- Word count is  $\leq 120$

**Introduction:**

- Word count is  $\leq 650$

**Materials and Methods:**

- Sex of subjects is stated (male; female; of either sex; of unknown sex)
- Companies or individuals (with full affiliations) from which unusual materials were obtained are provided
- Experimental Design and Statistical Analysis are reported

**Results:**

- Statistical tests are named and test statistics (e.g., t- or F-values) are reported

**Discussion:**

- Word count is  $\leq 1500$

**Citations:**

- Proper citation style for *The Journal of Neuroscience* is used (Get style files for Endnote, RefWorks, Bookends)
- A reference is provided for each in-text citation, and *vice versa*.

**Figures, Extended Data and Multimedia:**

- Each illustration is numbered (separate numbering for figures and multimedia)
- Each illustration has a legend and is mentioned in the manuscript
- Multimedia are included only if the information cannot be adequately communicated in a figure
- All symbols are defined in the caption

**Tables and Extended Data:**

- Each table is numbered and mentioned in the manuscript
- A legend and title are provided for each table