

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**PAPEL DA PROTEÍNA CINASE C (PKC) NO PROCESSAMENTO DE
MEMÓRIAS AVERSIVAS E ESPACIAIS**

Tese de Doutorado

JULIANA S. BONINI

Orientador

Prof. Dr. Iván Antonio Izquierdo

Co-Orientador

Prof. Dr. Martín Pablo Cammarota

Porto Alegre, 2006

A felicidade é o caminho, não o destino

(Henfil)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois sem ele com certeza não estaria aqui. Aos professores que me ensinaram a escrever e a viver; quando digo “ensinaram a viver”, refiro-me a *todas* as pessoas que acompanharam aqui, do meu lado ou do lado oposto, mas que contribuíram para meu crescimento como ser humano. Obrigado a todos vocês.

Esta parte da tese me deixa um pouco nostálgica, pois as palavras, por mais que tentem, nunca alcançam com tanta fidelidade os meus sentimentos de gratidão.

Apesar deste agradecimento geral, é necessário agradecer a muitas pessoas que contribuíram para e participaram da minha vida durante este quatro anos:

Aos meus eternos Mestres e Pais científicos

Ao Mestre Ivan Izquierdo, pela oportunidade única de trabalhar com ele. Obrigado pela confiança, carinho, ensinamentos, amizade, pelas palavras de incentivo, mas principalmente pelo exemplo de cientista!

A Martín Cammarota muito obrigado por tudo que me ensinaste e com certeza se viver mil anos, serei sempre grata pelos teus ensinamentos. Obrigado pela persistência que tiveste ao adotar esta causa que sou eu e por fazer acreditar que um dia poderia chegar aqui. Podes ter certeza que fazer ciência séria no Brasil é tarefa para poucos, obrigado por me fazer acreditar que isso é possível. Obrigado pelos conselhos profissionais e pessoais. Enfim, muito obrigado pela confiança, paciência e disponibilidade. Queria que tu soubesses o quanto te admiro como profissional e pessoa, que pra mim tu és um exemplo a ser seguido por todos aqueles que querem fazer ciência bem feita neste País.

À Lia pelos conselhos, pelo exemplo de ser, pelos ensinamentos e pelo ambiente família que me proporcionou neste longo tempo de convivência. Muito obrigada pela paciência e amizade e por este grande presente que é a Nina em nossas vidas.

Ao Centro de Memória

Ao Weber, agradeço ao contexto que nos aproximou, pois agora não sei viver sem você. Te amo, hoje e sempre, obrigada por tudo.

Ao meu amigo do peito e de todas as horas Cristiano. Palavras nunca serão dignas o suficiente para dizer o quanto sou grata por tua amizade, pois você é uma pessoa excepcional em todos os sentidos. Obrigada por todas as ajudas, palavras, consultas e paciência. Essa tese não teria ocorrido sem a tua ajuda.

À Janine, você foi, é e será sempre minha amiga de todas as horas, muito obrigada pela compreensão, ajuda, ensinamentos e amizade.

À Jociane e Mauro, que se juntaram na caminhada e me ajudaram a chegar aqui. Joci, obrigada por tudo amiga!

Ao André e a Ju, vocês são amigos do coração. Obrigada pela amizade apesar da distância, suas presenças são constantes no nosso meio.

À pequena bebê, Carolzinha, obrigada pela paciência, preocupação, ajudas em todos sentidos. Você é muito importante.

À Dona Nilma, com sua presença tranqüila e solícita.

À Duda, que sempre estava disposta a ajudar e resolver as coisas da melhor maneira.

À Tati, por ter me ajudado logo no início desta jornada, obrigada por tudo.

Aos demais colegas do laboratório: Olavo, Geléia, Charles, Júlia, Alessandra, Luiz, Cássio, Eduardo, Pablo, Bruno, Tiago, Ana Flávia, Cris Furini, Letícia, Cris Machado, Ramón, Carol Ziglio.

Ao Departamento de Bioquímica

A todos os professores e funcionários que de uma maneira ou outra me auxiliaram durante o período da realização deste trabalho.

Obrigada em especial ao Prof. Diogo e alunos, em especial a Lisiane e a Gabrieli, por terem me acolhido com carinho no seu laboratório no início desta jornada.

As meninas das secretarias, Cléia, Isabel, Mariana, pela ajuda burocrática e pela amizade.

Ao Valdemar, pela sua disponibilidade em ajudar sempre que preciso.

Ao Valeri e a todo o pessoal do Ratário, cujo trabalho foi essencial para realização desta tese.

Ao Glênio e à Elis, por todas as conversas e conselhos.

Ao Carlos do estacionamento, sempre passando aquela alegria de viver

Minha família

Aos meus pais, pelo interesse, dedicação e amor. Devo tudo a vocês, este é outro degrau que alcanço graças a vocês. Agradeço a Deus todos os dias de ter vocês como meus pais. Amo vocês.

À minha eterna babá, Maria, que me acompanha desde que nasci. Obrigada pelo seu amor incondicional!

Aos meus irmãos Gustavo, Janaína e Gabriela que são muito importantes pra mim. Apesar da distância, continuam me apoiando incondicionalmente. Amo vocês!

Aos meus cunhados, Evandro e Deise que são também a minha família por compartilharem comigo os momentos bons e ruins.

Às minhas tias Onira e Olívia, dedico esta Tese a vocês;

Aos meus tios Odila e Paulo, sem vocês o caminho teria sido mais difícil, obrigada por tudo! Amo vocês!

Aos amigos

Aos amigos que conquistei nesta caminhada Elisa e Márcio, vocês são peças importantes nesta conquista.

À Ana Lúcia Cecconelo e Charles Haineki, sempre solícitos a me ajudar nas horas boas e ruins, vocês são um exemplo a ser seguido na ciência brasileira.

A Maria Ângela Silva dos Santos, por todas as ajudas, com certeza você é um anjo que Deus colocou no meu caminho para ajudar nesta caminhada, você foi imprescindível nesta conquista.

À Márcia e ao Léo, a amizade de vocês é uma benção, obrigada por tudo, amo vocês!

À Sirlene e ao Cechin, que apesar da distância continuam presentes na minha vida. Sir, não tenho nem palavras pra dizer o quanto tu é importante na minha vida. Tenho uma imensa gratidão e admiração por ti. Ter te conhecido foi uma das melhores coisas que já aconteceram na minha vida. Quero ter tua amizade pra sempre.

À Grace pela amizade e companheirismo. Você é um exemplo a ser seguido, te admiro, obrigada por tudo!

À Maria Caroline, que me acompanha desde a faculdade. A sua alegria contagiante e sua disponibilidade fazia as horas difíceis serem apenas mais um momento a ser vivido.
Obrigada, Carol!

A minha médica Aline Pandolfo, com certeza a tua ajuda foi fundamental nesta conquista!

*Ao meu País, Brasil pois toda minha educação foi realizada em escola pública.
Aos órgãos de fomento na pesquisa no Brasil CAPES e CNPQ, sem o seu apoio não teria
chegado até aqui!*

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	ii
PARTE I	2
I. RESUMO	3
I. ABSTRACT	4
II. SIGLAS E ABREVIATURAS	6
III. INTRODUÇÃO	8
III.1 – Por que estudar memória?	8
III.2 – De que modo o sistema nervoso consegue exercer essa função?	10
III.3 – Há varios tipos de memória?	12
III.4 – Onde se localizam as memórias?	14
III.5 – As memórias podem ser moduladas?	21
III.6 – As bases neurais relacionadas a memória	22
III.7 – As proteínas cinases C	27
III.8 – Como a PKC é ativada	30
III.9 – PKC e substratos	31
III.10 – PKC, Plasticidade e Memória	31
IV. OBJETIVOS	36
IV.1 – Objetivo Geral	36
IV.2 – Objetivos Específicos	36
PARTE II	38
I. MATERIAIS E MÉTODOS	39
I.1 – Animais Experimentais	40
I.2 – Procedimento Cirúrgico	40
I.3 – Manipulação	42
I.4 – Esquiva Inibitória	42
I.5 – Versão Espacial do Labirinto Aquático de Morris (LAM)	45
I.6 – Versão Não-Espacial do Labirinto Aquático de Morris	51
I.7 – Tratamento Farmacológico	54
I.8 – Curva de Retenção do Traço Mnemônico	67
I.9 – Controle Histológico da Localização das Cânulas-Guia e do Local de Infusão	67
I.10 – Fármacos Utilizados	68
I.11 – Análise Estatística dos Dados	68
II. RESULTADOS	70
PARTE III	91
I. DISCUSSÃO	92
II. CONCLUSÕES	109
BIBLIOGRAFIA	112
ARTIGO CIENTÍFICO	122
ANEXO	123

PARTE I

I. RESUMO

Vários resultados na literatura fornecem fortes evidências de que o processamento de memórias requerem a participação da proteína cinase C (PKC) em estruturas sabidamente necessárias para este processamento, como o hipocampo, a amígdala basolateral (ABL) e o córtex parietal posterior (CPP). Neste trabalho mostramos que o inibidor seletivo das isoformas cálcio-dependentes da PKC, Go 6976, produz um efeito amnésico dose-dependente sobre a consolidação de memória espacial de longa duração em ratos submetidos ao treino no labirinto aquático de Morris (LAM), quando infundido na região CA1 do hipocampo dorsal 15 minutos pré-treino, imediatamente pós-treino ou 15 minutos pré-teste para esta tarefa, sem alterar a atividade locomotora dos animais. Ainda na tarefa do LAM, o Go 6976 também apresentou este efeito amnésico sobre a reconsolidação de memórias espaciais de longa duração recentes e antigas, bem como sobre a consolidação da memória espacial de longa duração relativa ao treino reverso no LAM, mas não teve efeito sobre a memória espacial de curta duração nem sobre a extinção da memória espacial de longa duração. Já na tarefa de esQUIVA inibitória (EI) o Go 6976 produziu um efeito amnésico quando infundido na ABL imediatamente ou 30 minutos pós-treino, ou no CPP 270 ou 360 minutos pós-treino, enquanto o inibidor não-seletivo das isoformas da PKC, Go 7874, produziu os mesmos efeitos, exceto por, no CPP, causar amnésia quando infundido 180 ao invés de 270 minutos pós-treino. Estes resultados indicam que as PKCs, sobretudo as cálcio-dependentes, são importantes para o processamento de memórias espaciais e aversivas, apresentando na consolidação de memórias aversivas distintos tempos críticos de ativação em diferentes estruturas cerebrais, e sendo necessárias para a aquisição, consolidação, evocação e reconsolidação de memórias espaciais.

I. ABSTRACT

Several evidences suggest that brain PKC is involved in the processing of both spatial and aversive memories in the hippocampus. Many studies show that other brain structures, like the basolateral amygdala (BLA) or the posterior parietal cortex (PPC), are also necessary to consolidate such memories. Here we show that the selective inhibitor of the classic isoforms of PKC Go 6976 produces an dose-dependent amnesic effect when infused into the CA1 region of the rat hippocampus 15 minutes before training, immediately after training or 15 minutes before test in the Morris water maze, but not when infused later. The infusion did not impair the locomotor activity of the rats. This inhibitory effect of Go 6976 was also demonstrated in the reversal learning of Morris water maze and reconsolidation of both recent and old spatial memories, but wasn't observed neither in the short-term spatial memories nor their extinction process. The non-selective inhibitor of PKCs Go 7874 blocks the consolidation of the memory associated with the learning of the inhibitory avoidance task when infused into de BLA immediately or 30 minutes after the training, or into the PPC from 180 to 360 minutes post-training. Go 6976 causes retrograde amnesia for this same task when infused into de BLA immediately or 30 minutes after training, or into de PPC 270 or 360 minutes post-training. Our data show that PKCs are important in the expression of both aversive and spatial memories, and that this recruitment of PKC is structure dependent: in the hippocampus and BLA it is required during early times post-training, for both inhibitory avoidance and Morris water maze; in the PPC it is required at later times, for different aversive memories . Besides playing a role in the consolidation of the spatial memories, the classic isoforms of PKC also seem to participate in the acquisition, retrieval, reversal learning and reconsolidation of such memories.

II - SIGLAS E ABREVIATURAS

AC- adenilato ciclase

ABL - amígdala basolateral

ADP e ATP - adenosina difostato e adenosina trifosfato

AMPA - ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-isoxazol propiônico

CA1, CA2, CA3 - Corno de Amon 1, 2, ou 3, regiões do hipocampo.

CaMKII - proteína cinase dependente de cálcio/calmodulina isoforma II

cAMP - adenosina monofosfato cíclico

CPP- córtex parietal posterior

CPF- córtex pré-frontal

CRE -elemento responsivo ao cAMP

CREB- proteína ligante ao CRE

EI- Esquiva Inibitória

ERK1/2-proteína cinase regulada por sinal extracelular, isoformas 1 e 2

GABA – ácido gama aminobutírico

GDP e GTP - guanosina difostato e guanosina trifosfato

GSK3- β - glicogênio sintase kinase 3

IEGs – genes de expressão precoce

IP₃ - inositol trifosfato

LAM - Labirinto Aquático de Morris.

LTM - Memória de Longa Duração

MAPK- proteína cinase ativada por mitógenos

MARCKS – substrato kinase C rico em alanina miristoilado (Myristoylated alanine-rich C kinase substrate)

MEK – MAPK or ERK kinase

NMDA - N-metil-D-aspartato

NMDAr- receptor NMDA

NO - Óxido Nítrico

NOS- NO sintase

PIP₂- fosfatidil-inositol bisfosfato

PKA- proteína cinase A

PKC - proteína cinase C

PLC - fosfolipase C

PPSE - potencial pós-sináptico excitatório

Raf - fator associado a Ras

Rap1 - proteína associada a Ras

Ras – proteína G ligante de GTP

Rsk2 -proteína cinase S6-ribossomal, isoforma 2

SNC - Sistema Nervoso Central

STM- Memória de Curta Duração

III. INTRODUÇÃO

III.1 - Por que estudar memória?

Pode-se definir memória como a representação interna do mundo, versões do mundo codificadas e estruturadas no SNC e que podem guiar o comportamento. Em outras palavras, modelos adquiridos do mundo, codificados espaço-temporalmente em atividade cerebral. No curso da evolução da vida na Terra, o surgimento dessa capacidade permitiu que os seres vivos se beneficiassem de experiências passadas para resolver problemas apresentados pelo meio ambiente, o que os tornou mais adaptáveis a mudanças. Coerentemente, verifica-se que os seres mais antigos na escala filogenética, como os invertebrados, já apresentam alguma capacidade mnemônica. Essa característica filogeneticamente conservada sugere que a memória poderia ser considerada como uma propriedade intrínseca do sistema nervoso, presente nele desde seu surgimento na natureza, nos primeiros organismos multicelulares.

Nos seres humanos, a memória adquiriu uma importância extrema, por fundamentar toda a personalidade e individualidade. Ninguém pode fazer aquilo que não sabe como fazer, e só demonstrará saber e finalmente fazer se recordar como fazer. Este “fazer” inclui qualquer atividade consciente do indivíduo, inclusive reconhecer a si próprio e sua história de vida. Assim, o passado de um indivíduo pode ser comparado a uma construção feita a base de tijolos – suas memórias – que lhe permitem saber quem é e fornecem o referencial de conhecimentos a partir do qual este indivíduo pode projetar seu futuro.

Tão ou mais importante do que lembrar é esquecer. Apesar de o esquecimento ser visto por grande parte da sociedade como um vilão, sempre associado a algum tipo de

déficit cognitivo, o esquecimento, na verdade, desempenha a importantíssima função de evitar a sobrecarga de informações a serem processadas a cada instante. Graças ao esquecimento, fatos contextualmente irrelevantes do ambiente circundante, ou que possam confundir uma linha de raciocínio em andamento, podem ser ignorados, permitindo que sejam feitas generalizações e abstrações, deste modo viabilizando análises críticas, a resolução de problemas, tomadas de decisões coerentes e fomentando a criatividade. Ratificando esta visão estão os fatos já descritos, ainda que muito raros, de pacientes com hipermnésia mas que apresentam baixos desempenhos em testes de QI. Um exemplo disso é o paciente S., estudado pelo psicólogo russo Alexander Luria (1901-1978) (SQUIRE & KANDEL, 2003), cujo perfil descrito lembra bastante o personagem Funes, do conto “Funes, o Memorioso”, obra do escritor argentino Jorge Luiz Borges (1899-1987) (IZQUIERDO, 2002).

Portanto, lembrar é sem dúvida muito importante, mas apenas o realmente pertinente em cada contexto. Para que haja - e seja viável - tal seletividade, vital para uma perfeita cognição, o esquecimento se faz uma ferramenta imprescindível. O grande problema surge quando se precisa distinguir o exato momento em que esquecimento deixa de ser fisiológico e começa a tornar-se patológico, como consequência de alguma disfunção do SNC. Infelizmente, esse tipo de esquecimento é mais lembrado geralmente, devido à progressiva e assustadora morbidade que impõe às pessoas que desenvolvem doenças que determinam estas disfunções no SNC.

III.2 - De que modo o sistema nervoso consegue exercer essa função?

Para que uma memória se forme, primeiramente precisa haver a **aquisição** da informação relativa a ela, etapa que corresponde ao aprendizado (IZQUIERDO, 2002). Dependendo do tipo de informação, ela pode ser esquecida logo em seguida, memorizada por um curto período de tempo, ou ainda retida por períodos prolongados para posterior acesso. Este último caso caracteriza o processo de **consolidação**, através do qual uma informação muito relevante – contextualmente - é retida prolongada ou permanentemente. Finalmente, o acesso posterior à informação caracteriza a **evocação**, ou lembrança; processo por meio do qual uma informação armazenada pode ser requisitada para uso na cognição, na emoção e/ou na expressão de um comportamento (IZQUIERDO, 2002). Estudos do nosso laboratório têm indicado que a evocação não é apenas um simples desfecho estático da consolidação, pois obedece a mecanismos bioquímicos próprios (BARROS et al., 2000, SZAPIRO et al., 2000). A evocação de uma memória pode inclusive alterá-la ou transformá-la, através de um de dois processos distintos descritos como **extinção** e **reconsolidação** (MORGADO, 2005).

A extinção foi primeiro descrita pelo fisiologista russo Ivan Pavlov (1849-1936) em sua pioneira descrição do fenômeno do condicionamento clássico. Em 1926, investigando o aprendizado de associação de estímulos a princípio independentes, Pavlov verificou que se um estímulo novo (neutro) é pareado com outro “biologicamente significante” (por exemplo doloroso, ou um alimento prazeroso), o qual invariavelmente produz uma resposta comportamental (respectivamente, nos exemplos, fuga ou salivação), a resposta inata ao primeiro estímulo muda, sendo sobreposta pela resposta ao estímulo biologicamente significante. Assim, estímulos neutros cuja resposta muda por associação com outros passaram a ser chamados estímulos condicionados. Já os estímulos significantes

biologicamente, que determinam respostas independentes de outros estímulos, foram denominados estímulos incondicionados. Porém, uma vez estabelecido o condicionamento pavloviano, se o estímulo condicionado passa a ser apresentado reiteradamente sem o pareamento com o estímulo incondicionado (reforço), a resposta característica da associação enfraquece progressivamente, dando lugar novamente à resposta original inata ao estímulo condicionado. Foi a essa dissociação entre o estímulo condicionado e o estímulo incondicionado que Pavlov atribuiu o nome de extinção. A extinção, portanto, constitui um novo aprendizado, dissociativo, que se sobrepõe ao anterior, associativo. A extinção pode também ser vista como um novo aprendizado associativo, que se superpõe a, e sobrepõe o anterior. A associação da extinção, conforme este ponto de vista, consiste na conexão entre o estímulo condicionado e justamente a falta de estímulo incondicionado. Por exemplo, um contexto associado com um estímulo doloroso passa a ser associado com a falta de estímulo doloroso; uma campainha associada com comida passa a ser associada com a falta de comida (RESCORLA, 2001; CAMMAROTA et al., 2003).

Quanto ao processo de reconsolidação, este foi descrito pioneiramente em 1968 por Misanin et al. 1968. Este ocorre quando uma memória já consolidada é reativada tornando-se lábil, podendo então ser modificada tanto por uma droga quanto por uma informação adicional (MISANIN et al., 1968; NADER et al., 2000). Nessa fase, parece que as memórias tornam-se frágeis ao serem evocadas e requerem nova síntese protéica para serem reconsolidadas (INDA et al., 2005; LATTAL & ABEL, 2004). Na reconsolidação a vulnerabilidade a tratamentos é dependente do tempo e da “solidez” da memória original, uma vez que memórias recentes e “frágeis” são mais reconsolidáveis que as antigas e “sólidas” (SARA et al., 2000).

III.3 - Há vários tipos de memória ?

As memórias podem ser classificadas quanto ao tempo de retenção da informação armazenada ou quanto à natureza de seu conteúdo (IZQUIERDO & MACGAUGH 2000; SQUIRE & KANDEL, 2003).

Quanto ao tempo de retenção, as memórias são classificadas em:

- Memória ultra-rápida: dura de frações de segundos a alguns segundos, também chamada de memória sensorial.
- Memória de curta duração: dura minutos ou horas, garante o sentido de continuidade do presente;
- Memória de longa duração: dura horas, dias ou anos, garante o registro do passado autobiográfico e dos conhecimentos do indivíduo.

Quanto à natureza do conteúdo, as memórias são classificadas em:

- Memória declarativa ou explícita: corresponde a memórias que podem ser descritas por meio de palavras no caso dos seres humanos. Subdivide-se em memória declarativa episódica, que abrange aquelas memórias que possuem uma referência temporal (autobiográfica), e em memória declarativa semântica, que envolve conceitos atemporais (conhecimentos, cultura). Um exemplo de memória declarativa episódica é a lembrança de uma data de aniversário ou de óbito (fatos referendados no tempo), e de memória declarativa semântica é a lembrança que as pessoas nascem, crescem, desenvolvem-se, envelhecem e morrem (fatos independentes da época em que estejam ocorrendo, logo atemporais).

- Memória não-declarativa ou implícita: corresponde àquelas memórias que não podem ser descritas por meio de palavras. Subdivide-se em: memória não declarativa de representação perceptual; de procedimentos; associativa e não-associativa. A memória não-declarativa de representação perceptual lida com representações sem significado aparente conhecido (imagens, sons), mas úteis como dicas facilitatórias da evocação (fenômeno descrito na literatura inglesa como *priming*) de informações inerentes. A de procedimentos lida com hábitos, habilidades e regras (andar de bicicleta, uso gramatical da língua materna). A memória não-declarativa associativa lida com a associação de dois ou mais estímulos (condicionamento pavloviano ou clássico), ou de um estímulo a uma resposta (condicionamento operante) (IZQUIERDO & MACGAUCH, 2000). Já a não-associativa lida com a atenuação ou intensificação de uma resposta (habituação ou sensibilização, respectivamente), através da repetição de um mesmo estímulo (por exemplo, sonoro ou doloroso, respectivamente).

- Memória operacional: corresponde ao processamento contínuo (*on-line*) das informações recém adquiridas e/ou recém evocadas, permitindo o raciocínio e o planejamento do comportamento (SQUIRE & KANDEL, 2003; SQUIRE & ZOLA, 1996). Corresponde à memória ultra-rápida descrita acima, e diferencia-se das demais por não armazenar arquivos (GOLDMAN-RAKIC, 1996).

III.4 - Onde se localizam as memórias?

Um dos mais intrigantes problemas da psicobiologia continua sendo a investigação da base neuronal dos traços de memória ou engramas. Karl Lashley (1890-1958) foi um dos pioneiros na investigação dos sítios do sistema nervoso central onde estariam localizados os engramas através de experimentos em que removia determinadas áreas do neocórtex na tentativa de impedir a comunicação transcortical entre regiões sensoriais e motoras do córtex. Com base nos resultados de seus estudos, Lashley concluiu que a memória tinha localização distribuída no sistema nervoso. Donald Hebb (1904-1985), aluno de Lashley, desenvolveu a concepção anti-localizacionista da memória, propondo que quando um evento qualquer fosse percebido por um indivíduo, certos circuitos do neocórtex seriam ativados, de modo a representar o mesmo evento quando reativados. Com a reativação ocorrendo repetidas vezes, bastaria a mobilização de apenas alguns componentes do circuito para que o evento fosse evocado. Logo, de acordo com esta visão, a memória seria uma propriedade inerente a todos os circuitos neuronais.

Um fato que marcou profundamente a existência da correlação memória X estruturas cerebrais ocorreu no ano de 1953: H.M., foi um paciente submetido à remoção bilateral de parte do lobo temporal medial, incluindo giro para-hipocampal, córtex entorrinal, amígdala e dois terços anteriores do hipocampo, numa tentativa de controlar sua epilepsia intratável. A partir desta cirurgia, o paciente H.M tornou-se incapaz de formar novas memórias (amnésia anterógrada), pois mesmo sendo capaz de reter informações por segundos ou minutos, esta retenção não perdurava mais que isso. A acuidade de sua memória para eventos ocorridos pouco antes da cirurgia também estava severamente comprometida (amnésia retrógrada). Esse comprometimento, no entanto, tornava-se progressivamente menor para informações adquiridas até três anos antes da cirurgia de tal

modo que informações adquiridas antes deste período eram normalmente lembradas (SCOVILLE & MILNER, 1957). Scoville, realizando neurocirurgias que consistiam na remoção bilateral do hipocampo, observou que os pacientes tornavam-se amnésicos a todos os acontecimentos que seguiam à cirurgia, sendo que este procedimento interferia nos processos de consolidação de memórias e na evocação de memórias relativamente recentes, sem afetar a aquisição da memória.

Mais tarde verificou-se que H. M. e outros pacientes com lesões similares no lobo temporal medial eram capazes de aprender informações, como tarefas motoras, e reter essas informações por algum tempo, mas eram incapazes de transferir outros tipos de informações, como de localização espacial ou reconhecimento de faces, para bancos permanentes de memória. Esta dificuldade estava associada principalmente às lesões do hipocampo.

Atualmente admite-se que a aprendizagem e a memória recrutam processos neurais em múltiplas regiões do cérebro, mas que certas estruturas são mais envolvidas que outras. A Figura 1 expõe o envolvimento de estruturas cerebrais cruciais para a formação de memórias (SQUIRE & ZOLA, 1996).

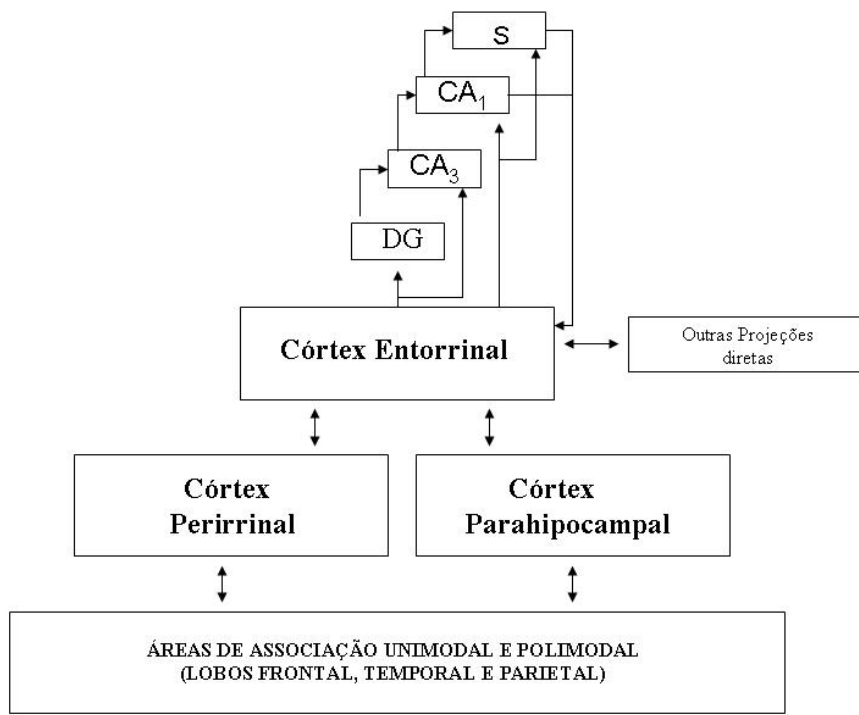


Figura 1- Regiões cerebrais envolvidas com a formação da memória. Adaptado de SQUIRE & ZOLA-MORGAN.,1996.

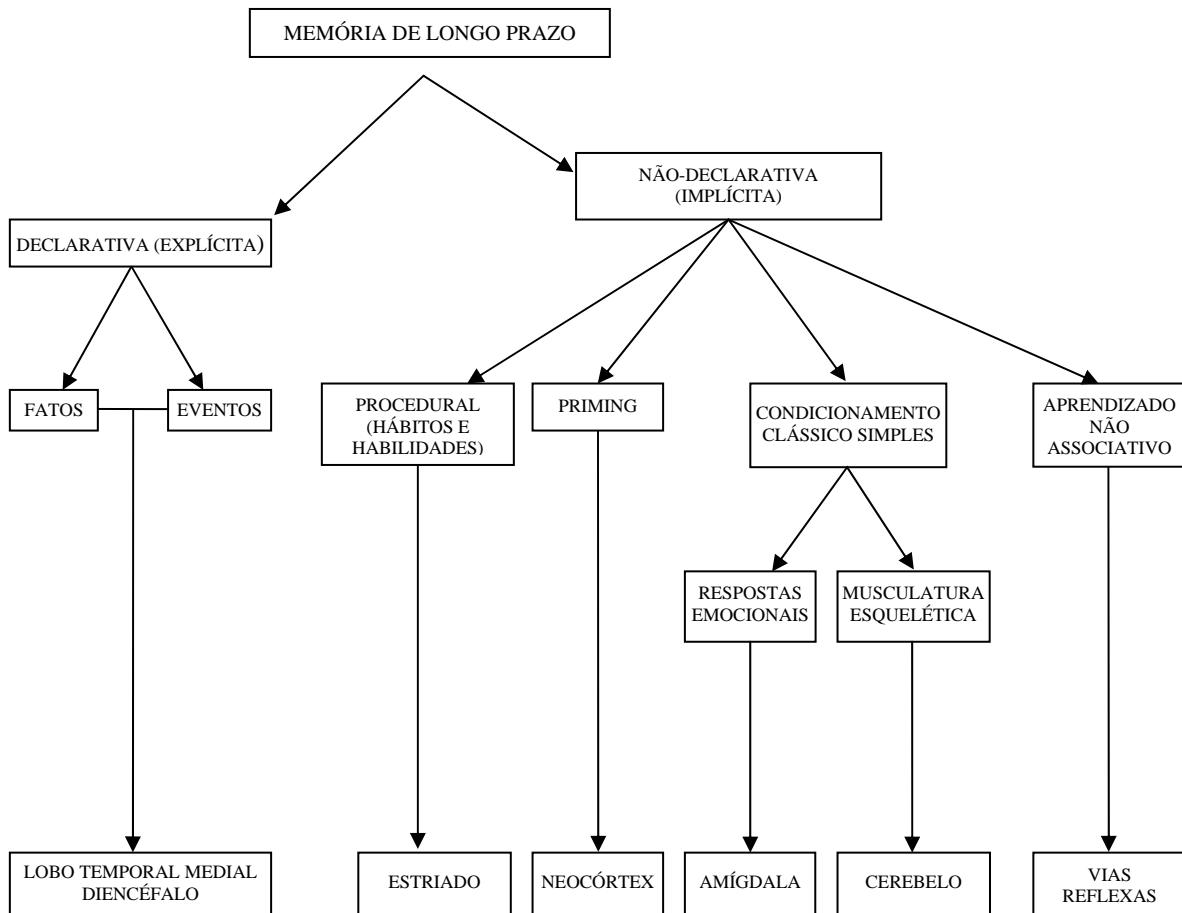


Figura 2. Classificação das memórias e regiões do SNC associadas. Adaptado de SQUIRE & ZOLA-MORGAN, 1996.

Na **Figura 2**, observa-se que os circuitos responsáveis pelas memórias de procedimento envolvem o núcleo caudato e o cerebelo. Já as respostas não-associativas estariam relacionadas às vias reflexas (SQUIRE & ZOLA-MORGAN, 1991) e as memórias declarativas estariam associadas às estruturas mediais do lobo temporal.

As memórias declarativas, por sua vez, dependem da integridade funcional das estruturas do lobo temporal e diencefálico, especialmente o hipocampo e o córtex

entorrinal, que estão interconectados (HYMAN et al, 1990). Ambas trabalham associadas e em comunicação com outras regiões do córtex, como o córtex cingulado e o córtex parietal.

O córtex cingulado medeia sinais entre a formação hipocampal e o neocórtex associativo (MARTIN, 1996), ocupando uma posição estratégica no clássico modelo do circuito de Papez, proposto pelo anatomista americano James Papez (1883-1958) em 1937 (IVERSEN et al., 2000) como um modelo elucidativo das bases neurais das emoções, conforme exposto na **Figura 3**, incluindo originalmente o córtex cingulado, hipocampo, fórnix, corpos mamilares e os núcleos anteriores do tálamo.

O córtex parietal faz parte do córtex associativo, estando relacionado com a localização dos objetos no espaço, as relações espaciais entre os objetos, os cálculos necessários para se alcançar determinadas localizações no espaço (SQUIRE & KANDEL, 2003) e com o processamento contínuo de informações pela memória operacional (FUSTER & QUINTANA, 1999).

O córtex entorrinal é a grande via de entrada de informações no hipocampo, por meio de um feixe de axônios chamados *via perforante*. Estes axônios estabelecem sinapses em neurônios do giro denteado, os quais, por sua vez, estabelecem sinapses com neurônios da região CA3, e estes projetam para fora do hipocampo via fórnix. Porém, desta projeção partem colaterais, as fibras colaterais de *Schaffer*, que terminam em sinapses excitatórias sobre neurônios piramidais da região CA1 do hipocampo (LORENTE de Nó, 1934). De CA1, a informação neural é transmitida ao subículo e a outras áreas, constituindo uma outra saída da informação pré-processada no hipocampo (PAXINOS & WATSON, 1986) (**Figura 4**).

Manipulações farmacológicas e bioquímicas no hipocampo de ratos alteram a retenção de memórias em diferentes tarefas (IZQUIERDO & MEDINA, 1995). Estudos

mostram que ratos com lesões no fórnix, no hipocampo ou no córtex entorrinal, apresentam uma piora na formação de memória recente, sem alterar a memória remota. Demonstrou-se também que o bloqueio de receptores NMDA com AP5 ou a estimulação GABAérgica com muscimol no córtex entorrinal entre 0,5 e 3-4 horas após-treino em esquiiva inibitória, ou no córtex parietal posterior entre 1 e 3-4 horas após-treino, resultou em amnésia total nesta tarefa de esquiiva (FERREIRA et al., 1992a; FERREIRA et al., 1992b; IZQUIERDO et al., 1997). Dados farmacológicos sugerem que a via da PKC no córtex entorrinal (JERUSALINSKY et al., 1993) e a via do cAMP/PKA no córtex entorrinal e no córtex parietal são necessários para a formação de memória de longa duração em esquiiva inibitória.

Portanto, o hipocampo, sua circuitaria, suas conexões e outras estruturas cerebrais são todos fundamentais para a formação da memória, sendo cada estrutura menos ou mais requisitada de acordo com o tipo de memória em questão e com a etapa de sua formação (aquisição, consolidação ou evocação) (SQUIRE & ALVAREZ, 1995).

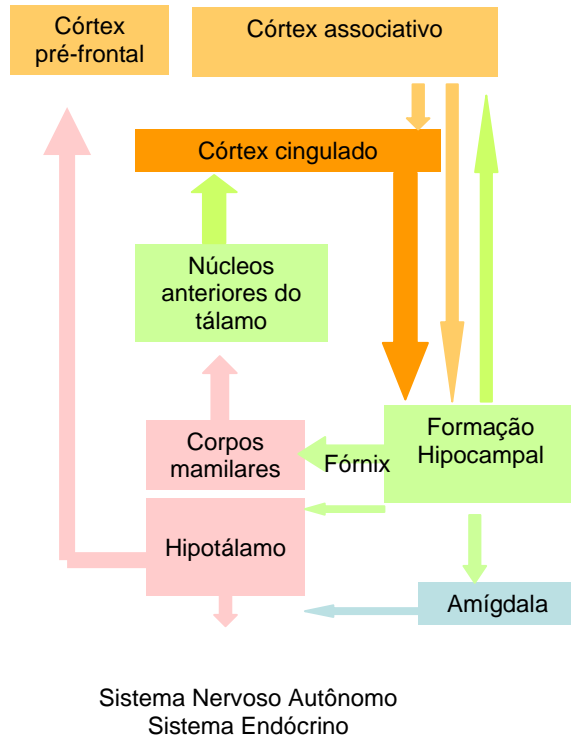


Figura 3: Componentes originais do circuito de Papez (interligados por setas grossas), e aqueles acrescentados por outros pesquisadores (interligados por setas finas). Modificado por IVERSEN et al., 2000.

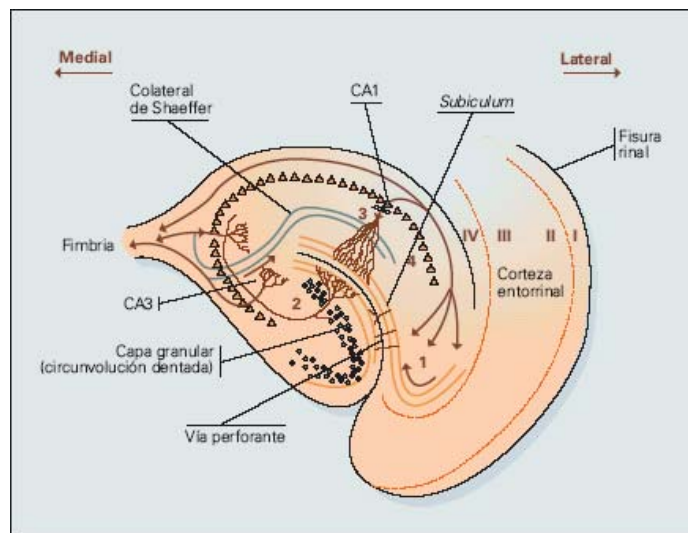


Figura 4: Esquema da organização interna do hipocampo. Os números de 1 a 4 indicam a seqüência de ativação de ativação do circuito. Os números romanos indicam as camadas celulares do córtex entorrinal.

III.5 - As memórias podem ser moduladas?

As principais regiões moduladoras da formação das memórias declarativas são a área basolateral do núcleo amigdalino e as regiões reguladoras dos estados de ânimo, alerta, ansiedade e emoções (**Figura 3**).

A amígdala é uma estrutura cerebral em forma de noz, localizada profundamente no lobo temporal, sendo subdividida em três áreas principais: córtico-medial, basolateral e medial. A amígdala faz inúmeras conexões com outras regiões encefálicas, dentre elas o hipocampo (MAREN, 1999; McGAUGH, 2002), com o qual estabelece conexões recíprocas (McDONALD, 1998; PITKÄNEN, 2000).

Já está estabelecido que a amígdala, especialmente o complexo basolateral, tem um papel crucial na aquisição e na expressão de respostas comportamentais relacionadas com o medo. Assim, lesões na amígdala de ratos impedem a formação de memórias envolvendo medo condicionado pavloviano (SAH et al., 2003). Logo, alterações morfológicas que ocorrem na amígdala após um aprendizado podem influenciar a consolidação em andamento da memória em outras regiões cerebrais. A amígdala está mais envolvida com aspectos emocionais do aprendizado, enquanto o hipocampo está mais relacionado com os aspectos espaciais e contextuais de uma tarefa, embora seja evidente que a consolidação da memória envolva interações entre estes e outros sistemas neurais (McGAUGH, 2000).

III.6 - As bases neurais relacionadas ao processo da memória

A capacidade de adaptação do sistema nervoso, especialmente a dos neurônios, de acordo com as experiências que ocorrem no dia-a-dia dos indivíduos, é descrita como neuroplasticidade, ou simplesmente plasticidade, um conceito amplo que se estende desde a resposta a lesões traumáticas destrutivas até as alterações resultantes dos processos de aprendizagem e memória. Toda vez que uma informação proveniente do ambiente de algum modo incide sobre o sistema nervoso, deixa nele uma alteração, isto é, modifica-o de alguma maneira. E como isso ocorre em todos os momentos da vida, a neuroplasticidade é uma característica marcante e constante do sistema nervoso. No caso específico do aprendizado e formação de memórias, a plasticidade neural refere-se a alterações estruturais e funcionais das sinapses, de modo a possibilitar a codificação dessas memórias para posterior acesso. Estas alterações promovem mudanças na eficiência sináptica e podem aumentar ou diminuir a eficiência de transmissão de impulsos entre neurônios, podendo, conseqüente, acarretar uma modulação do comportamento.

Os avanços alcançados com a utilização de abordagens comportamentais, associadas a lesões de regiões neuroanatômicas específicas, ou com a utilização de métodos farmacológicos (IZQUIERDO & McGAUGH, 2000), vêm permitindo a progressiva dissecação bioquímica dos processos de aprendizagem, consolidação e evocação das memórias de curta e de longa duração (McGAUGH, 2000).

Uma das primeiras propostas de explicação dos mecanismos celulares envolvidas na memória data de 1911, quando o grande neuroanatomista espanhol Santiago Ramón y Cajal sugeriu que novas memórias eram representadas por modificações precisas nas intensidades das conexões neuronais existentes, e não por uma modificação no número de células ou de processos neuronais. Grande parte do que se conhece atualmente a respeito dos

mecanismos celulares e moleculares envolvidos nos fenômenos de plasticidade neuronal deve-se à descrição do fenômeno da LTP feito por Bliss & Lomo, em 1973, fenômeno que já havia sido previsto de um modo mais amplo em 1949 por Donald Hebb (BEAR, 1996), segundo o qual a transmissão de informações entre dois neurônios deveria ser facilitada e tornar-se estável quando ocorresse coincidência (sincronia) entre os disparos do primeiro e do segundo neurônio. A LTP (do inglês *long term potentiation*), que significa potenciação de longa duração, consiste em um aumento na eficiência da transmissão sináptica em resposta a uma rajada de estímulos de alta frequência (BEAR, 1996). Ao longo dos anos, demonstrou-se que a LTP compartilha inúmeras e importantes características com o aprendizado de memórias sendo apontado pelos estudiosos do assunto como um mecanismo de memória (BLISS & COLINGRIDGE, 1993; IZQUIERDO & MEDINA, 1995, 1997a). Há evidências que mostram semelhança entre os dois fenômenos: o processo da LTP ocorre em estruturas cerebrais envolvidas no processo da memória (MAREN & BAUDRY, 1995); camundongos mutantes com defeitos enzimáticos com prejuízo no fenômeno na LTP possuem prejuízo de memória e existem atualmente vários experimentos farmacológicos mostrando uma grande similaridade entre LTP e memória (KANDEL, 2000).

Os eventos bioquímicos envolvidos na formação da memória e da LTP incluem, inicialmente, a ativação de receptores glutamatérgicos dos tipos AMPA (α - amino- 3 – hidroxil- 5- metil-4- isoxizolproprionato) responsáveis pela transmissão sináptica basal seguida pela ativação dos receptores glutamatérgicos NMDA (N-metil- D- aspartato) e dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGlu) (IZQUIERDO & MEDINA, 1995, 1997a). O sinal de indução para a LTP é um aumento pós-sináptico das concentrações intracelulares de cálcio, $[Ca^{2+}]_i$. O sinal geralmente resulta da ação prolongada do

glutamato, liberado por estimulação tetânica de um terminal pré-sináptico, sobre a pós-sinapse. Na membrana pós-sináptica, há receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, que tornam-se ativos somente após a união de glutamato concomitantemente com uma despolarização prévia e mantida causada pelo efeito do glutamato sobre receptores AMPA adjacentes. Esta despolarização prévia é necessária para que haja a saída do íon Mg^{2+} do canal iônico do NMDA, desbloqueando-o, enquanto a união do glutamato resulta na abertura deste canal desbloqueado à passagem de íons Ca^{2+} . Trata-se, portanto, de um mecanismo de detecção de atividade simultânea na pré e na pós-sinapse. O aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} ativa na espinha dendrítica a enzima NOS (NO sintase) que produz NO (óxido nítrico) a partir da l-arginina presente na célula. O NO, por ser um gás, difunde-se ao longo de poucos diâmetros celulares. Ao penetrar na terminação pré-sináptica, o NO induzirá um aumento na probabilidade de liberação de vesículas contendo glutamato em resposta à chegada de um potencial de ação, mas apenas se coincidir com a atividade ainda em curso da chegada de potenciais de ação nesta terminação pré-sináptica. O resultado disso é que a ação do NO é atividade-dirigida, atuando apenas naquelas sinapses que estiverem ativas no momento do desencadeamento da LTP. Esta fase inicial de otimização da eficiência pré-sináptica caracteriza a fase imediata da LTP (SQUIRE & KANDEL, 2003).

O glutamato presente na fenda também se une a receptores glutamatérgicos metabotrópicos, mGlu1 e mGlu5. Ativados, estes receptores ligam-se a proteína G (G_q), que muda de conformação, e sua subunidade α_q diminui sua afinidade por GDP, trocando-o por GTP. Uma vez com GTP, a subunidade α separa-se das outras duas subunidades ($\beta\gamma$). A subunidade α_q -GTP difunde-se pela face citoplasmática da membrana e liga-se a

fosfolipase C (PLC), ativando-a. Esta ativação cessa quando a subunidade α hidrolisa o GTP, devido à sua atividade GTPásica intrínseca. A fosfolipase C hidrolisa um lipídio de membrana, o fosfatidil-inositol bisfosfato (PIP₂), originando diacilglicerol (DAG) e inositol trisfosfato (IP₃). O primeiro difunde-se pela membrana, até se ligar à proteína cinase C (PKC). O segundo, IP₃, difunde-se pelo citosol, ligando-se a um canal na membrana do retículo endoplasmático, que se abre e permite a saída de Ca²⁺ estocado em seu interior, aumentando ainda mais o nível citoplasmático de Ca²⁺. O Ca²⁺ presente no citoplasma liga-se à calmodulina, e o complexo Ca²⁺/calmodulina ativa as adenilil-ciclases AC1 e AC8, a proteína cinase dependente de cálcio-calmodulina II (CaMKII) e, juntamente com o DAG, ativa a PKC. A CaMKII e a PKC fosforilam e ativam outras proteínas, dentre as quais as enzimas da via das MAPK (proteínas cinase ativadas por mitógenos). A adenilil-ciclase sintetiza cAMP a partir de ATP. O cAMP liga-se à subunidade regulatória da proteína cinase dependente de cAMP (PKA), que então se separa da subunidade catalítica desta proteína. A subunidade catalítica da PKA, então desinibida, ativa no citosol a Rap1 (proteína associada a Ras) e/ou migra para o núcleo, onde fosforila o fator de transcrição CREB (proteína ligante ao elemento responsivo ao cAMP), ativando-o. A Rap1 fosforila no citoplasma a proteína cinase regulada por sinal extracelular (ERK, isoformas 1 e 2). A ERK1/2 fosforilada migra para o núcleo e fosforila a Rsk-2 (proteína cinase S6-ribossomal, isoforma 2), e/ou fosforila o fator de transcrição Elk1. A Rsk2, então ativada, fosforila o fator de transcrição CREB. CREB liga-se ao DNA numa seqüência de bases específica denominada CRE (elemento responsivo ao cAMP), que se situa nos promotores de um conjunto específico de genes, dentre eles um grupo de genes imediatos, ativando a

transcrição destes genes. Já Elk-1 ativa a transcrição de um outro conjunto de genes, alguns deles pertencentes ao conjunto que é ativado por CREB.

Os genes imediatos codificam mRNA para outros fatores de transcrição, que então se ligarão aos promotores de um outro conjunto de genes, os chamados genes tardios, ativando sua transcrição. Já os genes tardios codificam mRNA para proteínas estruturais, de adesão ou receptores (AMPA, NMDA, metabotrópicos), que serão requisitadas para a produção de novos sítios sinápticos que irão reforçar especificamente as sinapses que desencadearam todo este processo. Esta última etapa caracteriza a chamada fase tardia da LTP, que dura de dias a semanas (SQUIRE & KANDEL, 2003).

A LTP apresenta diversas características que a tornam uma candidata muito apropriada para o mecanismo de armazenamento da memória de longa duração. Primeiro, ocorre em cada uma das vias principais por onde a informação flui no hipocampo: a via das colaterais de Schaffer, como demonstrado pioneiramente por Bliss e Lømo (1973), e também nas vias perforantes e das fibras musgosas. Depois, é induzida rapidamente, de tal modo que uma única série de estímulos elétricos de alta frequência pode dobrar a efetividade de uma conexão sináptica. E finalmente, uma vez induzida, é estável por horas ou mesmo dias, dependendo do número de vezes que o estímulo tetânico é aplicado.

Assim como a fase inicial da LTP, a memória de curta duração é transitória, não necessita de alterações morfológicas para ser mantida e não necessita de nova síntese protéica. Já a fase tardia da LTP é estável e auto-sustentável, implica alterações morfológicas e necessita de nova síntese de mRNA e de proteína. Um dos fatores determinantes na conversão da fase inicial da LTP na fase tardia é a repetição do estímulo, havendo uma proporcionalidade direta entre a quantidade de repetição e probabilidade de

conversão. O mesmo vale para a consolidação, pois a repetição do aprendizado aumenta a consolidação. Entretanto, essas características que a LTP apresenta não provam por si que ela seja o mecanismo de consolidação da memória em seres vivos, mas indicam fortemente a existência de um paralelo entre estes dois fenômenos (LYNCH, 2003; BLISS & COLLINGRIDGE, 1993; IZQUIERDO & MEDINA, 1995). Torna-se então interessante investigar o nível de fidedignidade do paralelo traçado entre a LTP imediata e a memória de curta duração e entre a LTP tardia e a memória de longa duração, o que, no presente trabalho, será feito em relação à participação da PKC, conforme detalhado e justificado a seguir.

III.7 - As proteínas cinases C

As proteínas cinases ativadas por cálcio (do inglês PKC, protein kinases Ca⁺² dependent) são serina/treonina cinases que estão envolvidas em vias de transdução celular neuronais através da fosforilação de diferentes substratos.

Essa classe de proteínas cinases foram descritas pela primeira vez por Takai e colaboradores em 1977 no Japão e foram denominadas posteriormente como PKCs (TAKAI et al., 1977).

A família das PKCs pode ser dividida em três grupos de acordo com sua estrutura e características bioquímicas (**Quadro 1**).

Quadro 1: Classificação das isoformas da PKC (Fonte: adaptada de VAN DER ZEE & DOUMA -1997).

Classificação	Isoformas	O que requerem para serem ativadas
PKC Clássica ou convencional (PKC c)	α , β I, β II e γ .	Requerem Ca^{+2} e DAG
PKC “nova” (PKCn)	ϵ , δ , η , θ e μ .	Requerem Ca^{+2} , mas não DAG
PKC atípicas (PKCa)	ξ , ι e λ ,	Não requerem Ca^{+2} nem DAG

A proteína cinase C está amplamente distribuída no SNC de mamíferos, bem como de invertebrados (NOGUES, 1996) além de ser encontrada em outros tecidos (**Quadro 2**) (TAKAI et al., 1977).

Quadro 2: Isoformas da PKC em tecidos de mamíferos (Adaptado de NISHIZUKA, 1995)

Isoformas	Subtipos	Nº de resíduos de a.a.	Dependência de Ca^{2+} e lipídios ativadores*	Expressão tecidual
cPKC	α	672	Ca^{2+} , DAG, PS, FFAs, lysoPC	universal
	β I	671	Ca^{2+} , DAG, PS, FFAs, lysoPC	alguns tecidos
	β II	671	Ca^{2+} , DAG, PS, FFAs, lysoPC	Muitos tecidos
	γ	697	Ca^{2+} , DAG, PS, FFAs, lysoPC	Apenas cérebro
nPKC	δ	673	DAG, PS	universal
	ϵ	737	DAG, PS, FFA, PIP_3	cérebro e outros tecidos
	η (L)	683	DAG, PS, PIP_3 , sulfato de colesterol	pele, pulmão, coração
	θ	707	?	músculos, linfócitos T, etc.
	μ	912	?	Células NRK
aPKC	ζ	592	PS, FFA, PIP_3 ?	universal
	λ (ι)	587	?	Muitos tecidos

No SNC de mamíferos, é particularmente concentrada no neocórtex, córtex cingulado, córtex entorrinal e piriforme e em quase toda a formação hipocampal, no cerebelo, na substância nigra, no núcleo lateral e basolateral da amígdala, no bulbo olfatório, no córtex frontal, no córtex fronto-parietal e no parietal posterior (VAN DER

ZEE et al., 1997). Apesar de sua ampla distribuição em todo o SNC, diferentes técnicas demonstraram que isoforma β II se expressa mais abundantemente no hipocampo de mamíferos e que há uma distinta distribuição sub-celular das diferentes isoformas nesta estrutura (**ver quadro 3**) (VAN DER ZEE et al., 1997; TANAKA & SAITO, 1992; KOSE et al., 1990). Tendo em vista sua ampla distribuição, é possível que esta proteína esteja envolvida em processos celulares incluindo secreção, exocitose, expressão gênica, modulação da condução iônica, proliferação celular (GOULD & MANJI, 2002).

Quadro 3 - Imuno-reatividade à PKC em hipocampo de rato, camundongo e coelho* (Adaptado de VAN DER ZEE ET AL., 1997).

Espécies	PKC	Subículum	Neurônios piramidais em CA1	Neurônios piramidais em CA3	Neurônios piramidais no giro denteado	Neurônios granulares	Interneurônios da região Hilar	Interneurônios Oriens / piramidais
Rato	α	+	+	+	+	+/-	+	+
	β 1	-	-	-	-	-	-	-
	β 1	++	++	++	+	+	+	+/-
	β 2	+	++	+/-	-	-	-	-
	β 2	+	+	+	+	+	-	+
	γ	+	++	+	+	+	+	+/-
Camundongo	α	++	++	++	++	+	+/-	+
	β 1	++	++	++	++	+	+/-	+
	β 2	++	+	+	+	+/-	+/-	-
	γ	++	++	++	++	+	+	-
Coelho	α	+	+	++	+	+	+	+/-
	β 1	+	+	++	+	+	+	+
	β 2	+	+	+	+	+	+/-	+/-
	γ	++	++	++	+	+	+	+

* A presença de imuno-reatividade está ordenada como ausente (-), fraca (+/-), claramente presente (+) ou forte (++). Deve-se frisar, não obstante, que a comparação da intensidade de marcação para as isoformas da PKC entre e dentro das espécies não necessariamente refletem a quantidade de uma isoforma porque a imunomarcação também depende da afinidade do anticorpo pela sua respectiva isoforma da PKC. Portanto, o nível geralmente maior de imunomarcação no hipocampo de camundongo pode ser devido a maior afinidade dos anticorpos por PKC murina, e não necessariamente a um maior conteúdo de PKC nas células de camundongo do que nas de rato e coelho.

III.8 - Como a PKC é ativada

A PKC é ativada por vários neurotransmissores, entre eles a acetilcolina e o glutamato (BLISS & COLLINGRIDGE, 1993). A PKC encontra-se, usualmente, em uma forma inativa no citosol, porém ativa-se de maneira reversível quando se liga à membrana fosfolipídica na presença de Ca^{+2} (TAKAI et al., 1979 a e b) como já descrito brevemente no item III.6. Trabalhos mostram que pequena quantidade de DAG aumenta significativamente a afinidade desta enzima por Ca^{+2} e fosfolipídios (KISHIMOTO, et al. 1980).

A ativação da PKC requer, além de DAG, um aumento da concentração intracelular de Ca^{+2} . Este íon promove a interação do subgrupo cálcio-dependente da PKC com a fosfatidilserina da membrana, tornando-a ativa (CASABONA , 1997).

Uma característica importante da PKC é que como o Ca^{+2} , ele estimula a adenilato ciclase e portanto a síntese de AMP_C (YOSHIMURA & COOPER, 1993).

III.9 - PKC e substratos

A PKC possui mais de 100 substratos (CASABONA, 1997). Segue abaixo alguns exemplos.

Quadro 4 – Substratos da PKC

Substratos	Atividade do substrato da PKC no meio celular
B50/GAP-43	Proteína associada à membrana pré-sináptica que está envolvida nos processos de plasticidade neuronal (PASINELLI et al., 1995);
Neurogranina	Proteína associada à membrana pós-sináptica que está envolvida nos processos de modulação das vias de sinalização pós sinápticas (CHEN et al., 1997b)(WU et al., 2003);
Subunidade NR2B do receptor NMDA	O receptor NMDA está diretamente relacionado a eventos de neuroplasticidade. A fosforilação da subunidade NR2 leva a um aumento das correntes iônicas através deste (LIAO et al., 2001);
Raf-1 (do inglês Ras associated factor):	Proteína cinase que está envolvida na via de sinalização das MAPK (KOLCH et al., 1993).
CREB (do inglês “cyclic AMP responsive element bindin protein”)	Proteína que participa se eventos de sinalização intracelular incluindo proliferação celular (YANG et al., 1996), regulação dos ritmos circadianos (GINTY et al., 1993), formação de memória (CAMMAROTA et al., 2000), vias de sinalização da nocicepção (KAWASAKI et al., 2004)
Subunidade GluR2 do receptor AMPA	Os receptor AMPA medeiam a transmissão excitatória rápida no cérebro e tem papel central na plasticidade (MCDONALD et al., 2001);
GSK3-β	Proteína citosólica que fosforila muitos substratos como “promotores” de genes prococes de expressão rápida (IGEs, do inglês “immediate early genes”) por exemplo c-jun (GOODE et al., 1992);

III.10 - PKC, Plasticidade e Memória

Há uma ampla literatura mostrando o envolvimento das proteínas cinases na LTP (potenciação de longa duração-descrita previamente) (MALENKA et al., 1989). Dentre essas cinases, a PKC parece exercer um papel crucial na indução, manutenção e expressão da LTP (ANGENSTEIN et al., 1994; KLANN et al., 1993; THOMAS et al., 1994).

Hussain e Carpenter mostraram que diferentes isoformas da PKC são cruciais para a indução de LTP (HUSSAIN & CARPENTER, 2005). Routtenberg e colaboradores mostraram que na LTP primeiro a isoforma γ pós-sináptica é ativada e, logo a seguir, a isoforma pré-sináptica β , que por sua vez fosforila a proteína GAP-43 (ROUTTENBERG

&LOVINGER, 1985; COLLEY & ROUTTENBERG, 1993). Outros experimentos mostraram que a infusão intracelular de PKC purificada em neurônios piramidais de fatias de CA1 hipocampal melhora a transmissão sináptica, efeito que foi abolido quando a enzima era infundida na forma inativa (HU et al., 1987).

Além de participar da indução, a PKC parece ser importante na manutenção da LTP. Yang e colaboradores observaram que ocorria tanto a inibição da indução como a reversão da manutenção da LTP em espinha dorsal de ratos quando utilizavam diferentes inibidores de PKC (queleretrine ou Go 6983) (YANG et al., 2004). Além disso, o bloqueio da manutenção da LTP por inibição da PKC também foi observado em neurônios da região CA1 do hipocampo (REYMANN et al., 1988).

Além de participar dos processos de neuroplasticidade, a PKC também parece regular a excitabilidade neuronal.

Estudos mostraram que a infusão intracelular da enzima purificada ou a ativação da PKC endógena pela utilização de forbol-éster (que mimetiza a ação do DAG sobre PKC) aumenta a corrente iônica conduzida por canais Ca^{+2} voltagem dependentes em neurônios de Aplísia (DERIEMER et al., 1985).

Evidências da ligação direta entre a ativação da PKC e memória foram demonstrados por Farley e Auerbach em 1986, condizendo com os dados conhecidos sobre o mecanismo da LTP. Estes autores, administrando enzima PKC purificada ou forbol-éster intracelularmente em Hermissenda, induziram redução nas correntes de K^{+} , de modo similar ao que ocorre no aprendizado associativo (FARLEY & AUERBACH, 1986). Posteriormente, em 1990, Sacktor e Schwartz verificaram que em neurônios sensoriais de Aplísia a sensibilização induzia a translocação da PKC ativa do citosol para a membrana (SACKTOR & SCHWARTZ, 1990).

Nos primeiros experimentos utilizando um inibidor de PKC, Ali e colaboradores verificaram que pintos que haviam recebido infusão intra-cerebral do inibidor após o treino em esQUIVA inibitória apresentaram prejuízo na consolidação de memória (ALI et al., 1988). Ainda na década de 80 comprovou-se que, além de estar relacionada à plasticidade celular em invertebrados e em experimentos *ex-vivo* (por exemplo LTP), a PKC era ativada na formação de diferentes tipos de memória em mamíferos (NOGUÉS, 1997).

Utilizando forbol éster tritiado, Old e colaboradores demonstraram - pelo método de auto-radiografia - haver um aumento de PKC na região CA1, após condicionamento clássico em coelhos (OLD et al., 1989). Em um trabalho posterior, utilizando a mesma metodologia, verificaram que, além de haver uma migração para a membrana intrínseca à sua ativação, a PKC também migrava do corpo celular (um dia após o treino) para os dendritos (três dias após o treino) em células piramidais de hipocampo de ratos treinados (OLDS & ALKON, 1991).

Nosso grupo, utilizando o paradigma de esQUIVA inibitória para o estudo de memórias aversivas, demonstrou que diferentes inibidores de PKC, estausporina, CGP 41231 e Go 7874, são amnésicos no paradigma de esQUIVA inibitória quando administrados intra-hipocampo nos primeiros 120 min pós-treino (JERUSALINSKY et al., 1994; VIANNA et al., 2000; IZQUIERDO et al., 1997b). Além de experimentos farmacológicos a atividade da PKC foi medida na região CA1 do hipocampo, após o treino em esQUIVA inibitória utilizando diferentes métodos, um menos específico, utilizando forbol éster (BERNABEU et al., 1995), e outro mais específico, utilizando como substrato um peptídeo sintético e um inibidor específico que distingue as isoformas de PKC total (CAMMAROTA et al., 1997) e em particular a isoforma β I (PARATCHA et al., 2000).

Esses dois experimentos revelam um grande aumento na atividade da PKC na região CA1 de animais treinados em relação aos choqueados e aos “*naive*” (controles absolutos). De acordo com estes estudos, o aumento da atividade desta enzima se inicia imediatamente após o treino na EI, tem um pico aos trinta min e retrocede ao nível basal 120 min após o treino. Um padrão similar de aumento na atividade, mas com menor intensidade, foi observado na amígdala, córtex pré-frontal, parietal, entorrinal, e em menor grau, no cerebelo (BERNABEU et al., 1995). Nosso grupo também detectou um aumento na fosforilação da GAP-43 no hipocampo 30 min após o treino em EI, que coincide com o pico de PKC e que foi bloqueado com inibidor de PKC (CAMMAROTA et al., 1997).

Correlacionando-se a atividade da PKC e o desempenho mnemônico, Nogués e colaboradores verificaram que quando utiliza um ativador da PKC parece haver uma melhora na aprendizagem em diferentes tarefas (NOGUÉS et al., 1996). Estudos prévios haviam mostrado que a administração aguda intraventricular de forbol-éster em ratos acarreta uma melhora tanto na aquisição como na evocação de memória espacial no labirinto aquático de Morris (PAYLOR et al., 1991). Foi verificado também que a infusão intra-hipocampal de 1-oleoil-2-acetil-glicerol – um análogo sintético de DAG – melhora a retenção na tarefa do labirinto radial (NÓGUES et al., 1996).

O papel da PKC no aprendizado espacial também foi alvo de investigação. Nogués e colaboradores verificaram que a memória de referência no labirinto radial ocasiona um decréscimo na atividade da PKC citosólica mas não altera essa atividade na membrana (NÓGUES et al., 1994). Porém Beldhuis e colaboradores utilizando outro paradigma para analisar memória de referência, o “hole-board”, verificaram um aumento na atividade enzimática nos animais após o treino (BELDHUIS et al., 1992). Por outro lado, quando o

paradigma de LAM foi utilizado, observou-se uma redução na atividade da enzima na região CA3 do hipocampo (OLDS et al., 1990).

Utilizando camundongos transgênicos *knockout* para o gene que codifica a isoforma γ da PKC foi verificado que os mesmos apresentam déficits tanto na LTP como na memória (ABELIOVICH et al., 1993), e camundongos transgênicos *knockout* para o gene que codifica a isoforma β -I da PKC também apresentam déficits na LTP, e na tarefa de medo condicionado (WEEBER et al., 2000).

Tendo-se então como base a seqüência de eventos característicos da LTP, e estas informações provenientes da literatura que evidenciam a grande importância da PKC em mecanismos chave de plasticidade neuronal, como a LTP, o foco de investigação do presente trabalho foi dirigido para a análise da participação da PKC na formação de memórias de curta e de longa duração. Assim como na LTP, a PKC é necessária para a formação de memórias de curta e/ou de longa duração em ratos? Se for, em que etapa (aquisição, consolidação, etc), e em que momentos após a aquisição e/ou durante a consolidação? Em quais estruturas a PKC é necessária para a formação de memórias de curta ou de longa duração? Finalmente, em uma mesma estrutura-chave (hipocampo, como já descrito anteriormente), a PKC é igualmente requisitada para a formação de tipos distintos de memória, como memória aversiva (esquiva inibitória) ou memória espacial (labirinto aquático de Morris), e, em caso positivo, o padrão temporal da requisição de sua ativação é o mesmo? Foi o objetivo de contribuir com mais informações para as elucidações destas questões o que inspirou a elaboração dos objetivos do presente trabalho, descritos a seguir.

IV. OBJETIVOS

IV.1 Objetivo Geral

Analisar a participação da PKC na formação e expressão de memória espacial e aversiva em ratos, utilizando respectivamente as tarefas de labirinto aquático de Morris (LAM) e de esquiva inibitória (EI).

IV.2 Objetivos Específicos

1) Investigar o efeito de diferentes doses de inibidores das isoformas clássicas de PKC, Go 6976, quando infundido bilateralmente intra-CA1 do hipocampo dorsal 15 min pré-treino no LAM, sobre a memória de longa duração testada 24 horas pós-treino.

2) Investigar o efeito de diferentes doses de Go 6976 quando infundido bilateralmente intra-CA1 dorsal imediatamente pós-treino no LAM, sobre a memória de longa duração testada 24 horas pós-treino.

3) Investigar o efeito da dose ótima de Go 6976 quando infundido bilateralmente intra-CA1 dorsal imediatamente pós-treino no LAM, sobre a memória de curta duração testada três horas pós-treino.

4) Investigar o efeito da dose ótima de Go 6976, quando infundido bilateralmente intra-CA1 dorsal a diferentes intervalos pós-treino no LAM (0, 30 e 90 minutos), sobre a memória de longa duração testada 24 horas pós-treino;

5) Investigar o efeito da dose ótima de Go 6976, quando infundido bilateralmente intra-CA1 dorsal quinze minutos pré-teste (teste realizado 24 horas pós-treino no LAM), sobre a evocação de memória de longa duração para a tarefa de LAM;

6) Investigar o efeito da dose ótima de Go 6976, quando infundido bilateralmente intra-CA1 dorsal imediatamente após a reativação do traço mnemônico (realizada 24 horas pós-treino no LAM), sobre a reconsolidação de memória espacial recente, avaliada 24 horas pós-reativação;

7) Investigar o efeito da dose ótima de Go 6976, quando infundido bilateralmente intra-CA1 dorsal imediatamente após a reativação do traço mnemônico (realizada 120 horas pós-treino no LAM), sobre a reconsolidação de memória espacial remota, avaliada 120 horas pós-reativação;

8) Investigar o efeito da dose ótima de Go 6976, quando infundido bilateralmente intra-CA1 dorsal imediatamente pós-treino reverso no LAM (realizado 24 horas pós-treino normal) sobre a memória de longa duração testada 24 horas pós-treino reverso;

9) Na versão não-espacial do protocolo do LAM, investigar o efeito da dose ótima de Go 6976, quando infundido bilateralmente intra-CA1 dorsal quinze minutos pré-treino e nos mesmos instantes pós-treino nos quais o Go 6976 tiver causado algum efeito, sobre a aquisição e a consolidação de memória de longa duração não-espacial;

10) Investigar o decaimento fisiológico da memória espacial (esquecimento) no protocolo de LAM desenvolvido neste trabalho;

11) Investigar o efeito de Go 6976, quando infundido bilateralmente na amígdala basolateral e no córtex parietal posterior a diferentes intervalos de tempo pós-treino (0, 30, 90, 180, 270, 360 minutos) em EI, sobre a memória de longa duração para esta tarefa;

12) Investigar o efeito do inibidor geral das PKCs, Go 7874, quando infundido na amígdala basolateral e no córtex parietal posterior em diferentes tempos pós-treino (0, 30, 90, 180, 270 e 360 minutos) em EI, sobre a memória de longa duração.

PARTE II

CAPÍTULO I
MATERIAIS E MÉTODOS

I. 1- Animais Experimentais

Para a realização dos estudos, utilizaram-se ratos Wistar machos adultos, pesando entre 225 e 350 gramas, provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica, ICBS, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais eram mantidos em caixas apropriadas com capacidade para 5 animais, forradas com maravalha. Recebiam água e comida à vontade, e foram submetidos a ciclos de claro-escuro de 12 horas (luz a partir das 7:00 h e escuro a partir das 19:00 h), a uma temperatura ambiente mantida em torno de 22°C. As caixas eram trocadas a cada 3 dias. O máximo de precaução foi deliberado com o intuito de minimizar o sofrimento dos animais e de reduzir o número de animais utilizados. Todos os experimentos estiveram de acordo com as normas dos “*Principles of laboratory animal care*” (NIH publication N° 85-23, revised 1996).

I.2 - Procedimento Cirúrgico

Para administração dos fármacos em regiões cerebrais específicas os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para a implantação de cânulas de 0,2 mm de diâmetro posicionadas 1,0 mm acima da região alvo (**Figura 5**). Assim cânulas foram implantadas na região CA1 do hipocampo dorsal, amígdala basolateral (ABL) e córtex parietal posterior (CPP) (**Figura 6**). As coordenadas utilizadas para a cirurgia estereotáxica foram adaptadas do Atlas anatômico de Paxinos e Watson (1986) para que as drogas atingissem a camada piramidal da região CA1 [Antero Posterior (AP): = -4,2 mm; Médio Lateral (MD) = ± 3,0 mm; Dorso Ventral (DV) = -1,3 mm; Inclinação Latero-lateral (INCL LL) = 0°], a amígdala basolateral (AP = -2,3 mm; ML = ± 4,5 mm; DV = -4,0 mm; INCL LL = 0°), ou o córtex parietal (AP = -2,8 mm; ML = ± 1,0 mm; DV = -2,0 mm; INCL LL = 17°).

Todo o procedimento foi realizado com os animais previamente anestesiados com tiopental 30 mg/kg, intra-peritonial.

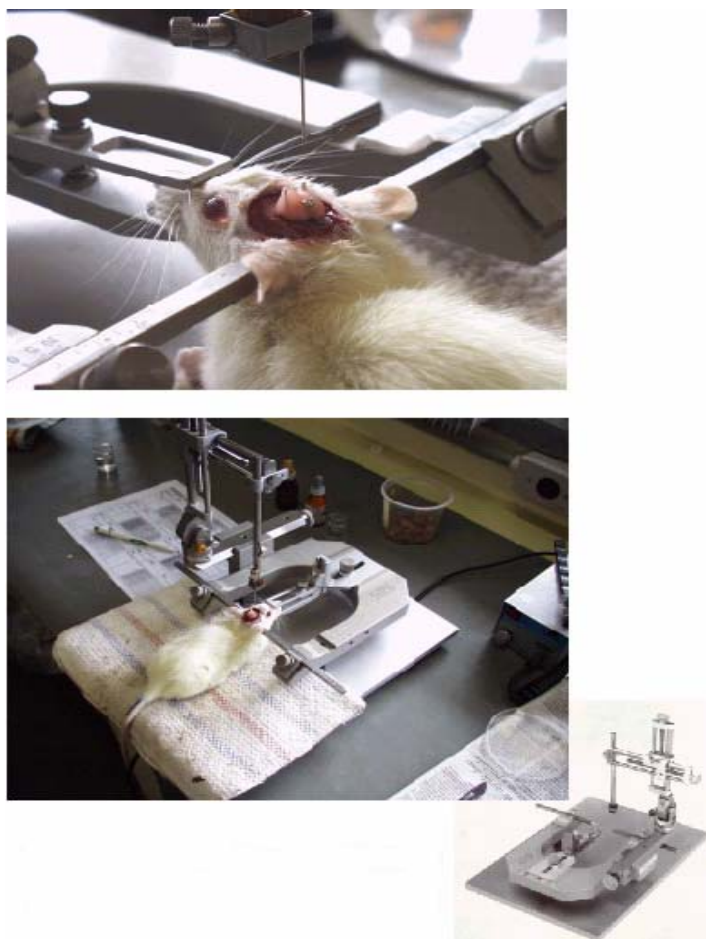


Figura 5 - Figuras do animal cirurgiado no aparelho estereotáxico, David Kopf modelo 1404, utilizado para a colocação intracerebral das cânulas à estrutura-alvo. No detalhe, vista geral do aparelho estereotáxico.

Para aumentar a fixação do capacete sobre o crânio, foi posicionado um parafuso acima do cerebelo, fixado apenas ao osso occipital, sem perfurá-lo. Este procedimento não afetou o comportamento dos animais nos experimentos e diminuiu a perda pós-cirúrgica de capacetes.

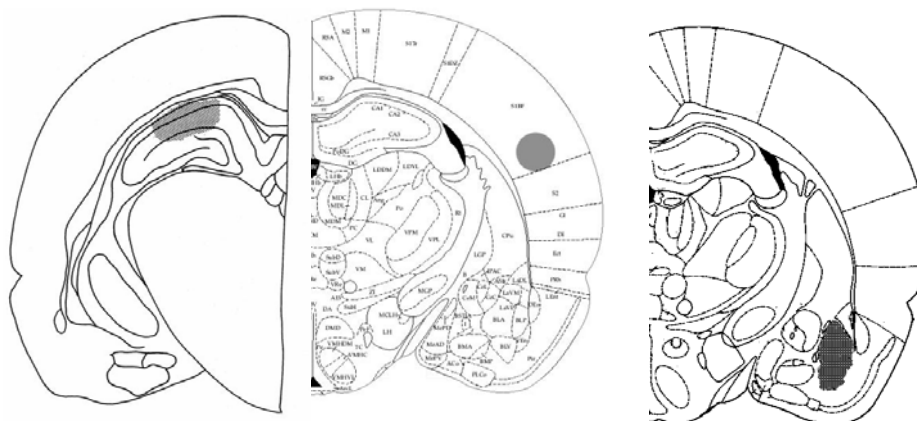


Figura A

Figura B

Figura C

Figura 6 : Representação esquemática de um corte histológico de hemisfério cerebral. A parte grifada mostra a área alvo das infusões realizadas nos experimentos. Animais nos quais a infusão de azul de metileno, realizada durante a verificação de posicionamento das cânulas, estava fora da área indicada acima não foram considerados durante a análise dos dados. Figura A (Região CA1 do hipocampo), Figura B (córtex parietal posterior) , Figura C (amígdala basolateral)

I.3 - Manipulação

Dois a quatro dias após a cirurgia, os animais passaram por duas sessões de manipulação. Durante cada sessão, foram levados do biotério até a sala onde os experimentos seriam conduzidos, retirados da gaiola e manuseados durante dois minutos.

I.4 - Esquiva Inibitória

Na tarefa de EI o animal primeiramente é exposto a caixa de esquiva, e exibirá uma resposta inata exploratória, que também é condicionável. Após descer da plataforma no interior da caixa, rumo a um assoalho metálico, aprende a associar a descida da plataforma

(resposta exploratória, condicionável, perante um estímulo condicionável, a caixa de esquiva), com um choque aplicado nas patas (estímulo incondicionado). Com isso, em uma segunda exposição à caixa de esquiva, o rato evitará expressar sua resposta inata exploratória, ou seja, evitará descer da plataforma. Esta inibição da expressão de sua resposta inata reflete o condicionamento desta resposta à associação aprendida. Este é o chamado condicionamento clássico, descrito pioneiramente em 1928 pelo fisiologista russo Ivan Pavlov (1849-1936). O aprendizado em EI envolve várias habilidades, incluindo percepção espacial e visual, sensibilidade a dor, e um componente emocional amplamente modulado por hormônios relacionados ao estresse (IZQUIERDO, 1989; IZQUIERDO & MEDINA, 1997a).

O aparelho utilizado para a esquiva inibitória de uma única sessão consiste em uma caixa de madeira de 50,0 x 25,0 x 50,0 cm, com a parte frontal feita de acrílico. O assoalho do aparelho é formado por barras de aço inoxidável, paralelas, com 3,0 mm de diâmetro e afastadas 1,0 cm umas das outras. No lado esquerdo da caixa, há uma plataforma de 2,5 cm de altura, por 7,0 cm de largura (**Figura 7**).

No dia seguinte à última sessão de manipulação, os animais foram inicialmente submetidos a uma sessão de treinamento individual na qual eram, cuidadosamente, colocados sobre a plataforma fixa na lateral esquerda da caixa de esquiva inibitória para que explorassem a mesma. Quando desciam da plataforma com as quatro patas na grade de barras de bronze eletrificáveis, que constituem o assoalho da caixa, recebiam um choque elétrico de 0,5 mA por 2 segundos (CAMMAROTA et al., 2003). Posteriormente eram retirados e infundidos com diferentes drogas (se a droga fosse administrada 0 minutos pós-treino) ou retornavam para a caixa moradia.

Para avaliar a memória de longa duração, os animais eram submetidos à sessão de teste vinte e quatro horas após o treino. O procedimento na sessão de teste foi idêntico à sessão treino, exceto que ao descer da plataforma o animal não recebia choque. Para ambas as sessões foram adotados tempos máximos de descida, sendo 20 s para a sessão de treino e 180 s para a sessão de teste, após os quais o animal era devolvido à sua caixa moradia. A diferença entre o tempo que o animal permanece sobre a plataforma na sessão de teste (latência de teste) e o tempo que permanece sobre a mesma na sessão de treino (latência de treino) é o valor utilizado como medida de aprendizagem (latência).

A EI é uma tarefa ideal para estudar processos de memória iniciados durante e após o treino porque:

- a) em geral pode ser aprendida com uma única sessão de treino;
- b) não é contaminada por sessões prévias ou subseqüentes, como ocorre nas tarefas de labirinto aquático, labirinto radial ou esquivas ativa (IZQUIERDO, 1989);
- c) a neuroquímica e a farmacologia envolvida na sua modulação é bastante conhecida (IZQUIERDO & McGAUGH, 2000).

Apesar de não ser possível extrapolar diretamente os resultados da EI para outros comportamentos, principalmente os complexos comportamentos humanos, diferentes evidências apontam para o fato de que os mecanismos básicos da aquisição, consolidação e evocação são essencialmente os mesmos nos diferentes tipos de memória (IZQUIERDO & MCGAUGH, 2000).



Figura 7 - Vista geral da caixa de condicionamento automatizada (fabricação Albarsch) utilizada no teste comportamental de Esquiva Inibitória.

I.5 - Versão espacial do Labirinto Aquático de Morris (LAM)

Dentre os diversos procedimentos e aparelhos desenvolvidos para avaliar o desempenho de animais em labirintos, o teste de aprendizagem espacial no labirinto aquático, introduzido em 1981 por Richard Morris (MORRIS et al., 1982), vem se destacando nos estudos sobre a neurobiologia da memória (GALLAGHER et al., 1993). O aprendizado sobre locais, pode envolver diferentes estratégias, por meio das quais os animais:

- a) Podem se guiar usando o eixo egocêntrico, i.e., realizando viradas à direita, à esquerda, seguindo reto ou retornando (estratégia práxica) ;
- b) Podem se valer de uma pista conspícua olfativa, visual, auditiva, táctil ou até mesmo gustativa que é usada como referência para a orientação (estratégia táxica);

c) Podem aprender as relações espaciais que existem entre os objetos do ambiente e utilizar essas relações para formar um mapa aloccêntrico (ou mapa cognitivo, espacial) que é utilizado para encontrar o local desejado. Já se demonstrou que o hipocampo é fundamental para a construção e retenção deste mapa aloccêntrico (O'KEEFE & NADEL, 1978).

Para a realização da tarefa do LAM, utilizou-se um tanque circular preto (180 cm de diâmetro e 55 cm de altura) com 25 cm de água a 21-24°C (**Figura 8**). O tanque é virtualmente dividido em quatro quadrantes, sendo que no centro de um desses quadrantes posicionou-se uma plataforma de acrílico pintada de preto, quadrada (20 cm de lado), contendo a superfície superior áspera. Esta plataforma encontrava-se fixamente submersa a 1 cm do nível da água.

Dicas visuais, na forma de cartazes com cores e padrões geométricos bastante diferentes, estavam dispostas nas quatro paredes da sala e eram visíveis pelo animal de qualquer ponto dentro do tanque. A exclusão das pistas proximais e ênfase nas pistas distais força o uso pelo rato de estratégias de mapeamento espacial para a localização da plataforma de escape submersa (O'KEEFE & NADEL, 1978).



Figura 8 - Vista geral do Labirinto Aquático.

I.5.1 - Treino da Versão Espacial do Labirinto Aquático de Morris

O treino consistiu de uma sessão de dezesseis tentativas sequenciais com teto de 120 segundos cada. O intervalo entre cada tentativa consistia no tempo que o rato permanecia sobre a plataforma, seja após encontrá-la espontaneamente ou após ser conduzido gentilmente a ela pelo experimentador após o teto. Este intervalo era de sessenta segundos após as quatro primeiras tentativas, quarenta segundos após a quinta até após a oitava, e de vinte segundos após a nona até após a décima sexta tentativa (**Figura 9**). Uma tentativa consiste primeiramente em colocar o animal na água com o focinho voltado para a parede

da piscina; em seguida, ao ser logo liberado, o animal nadava livremente até encontrar a plataforma submersa, na qual subia como forma de evitar sua permanência na água. Após encontrá-la, o rato permanece sobre a plataforma, de onde pode observar tranqüilamente as pistas externas (**Figura 9**). Quando o animal não encontrava a plataforma até o tempo de teto, era então conduzido cuidadosamente até ela. Em cada tentativa, o animal era largado de uma posição cardeal (norte, sul, leste ou oeste) diferente, executando largadas cruzadas, isto é, N-S-L-O, S-N-O-L, L-O-N-S ou O-L-S-N, sendo a primeira largada randomizada entre os diferentes ratos. Este procedimento visa a forçar o uso de estratégias de mapeamento espacial por minimizar a estratégia práxica (O'KEEFE & NADEL, 1978). A sessão inteira, no caso dos ratos controles, dura aproximadamente 20 minutos.

O teste ocorria em diferentes tempos após o final da sessão de treino, onde o animal era largado de uma única determinada posição, sendo esta, a que fosse mais distante do local em que se encontrava a plataforma na sessão de treino. Para analisar a memória de curta duração, o teste foi feito três horas após o treino e para avaliar a memória de longa duração o teste foi feito 24 horas após o treino.

Durante o teste, a plataforma não estava presente. A medida utilizada como retenção de memória foi a latência de chegada ao local onde se encontrava a plataforma na sessão de treino (latência de escape).

Além da latência de escape, há várias outras medidas que podem ser utilizadas para avaliar a retenção da memória no LAM (STEWART & MORRIS, 1993), como a distância de escape (distância percorrida pelo rato do ponto da largada até o local da plataforma de escape), direcionalidade (ângulo entre a primeira direção de trajeto do animal após a largada, e a direção da reta unindo o local de largada e o local da plataforma), a velocidade de deslocamento, teste de transferência (porcentagem de tempo que o animal permanece no

quadrante que contém o local da plataforma em relação ao tempo total da sessão de teste) e número de cruzamentos sobre o local da plataforma durante a sessão de teste. Neste estudo utilizamos a latência de escape por ser a medida mais sensível a lesões ou drogas (STEWART & MORRIS, 1993) dirigidas ao SNC. Outra medida utilizada em alguns experimentos, para evidenciar melhor a variação entre a retenção de memórias conflitantes (aprendizado reverso), foi o número cruzamentos sobre o local da plataforma (DASH et al., 2002).

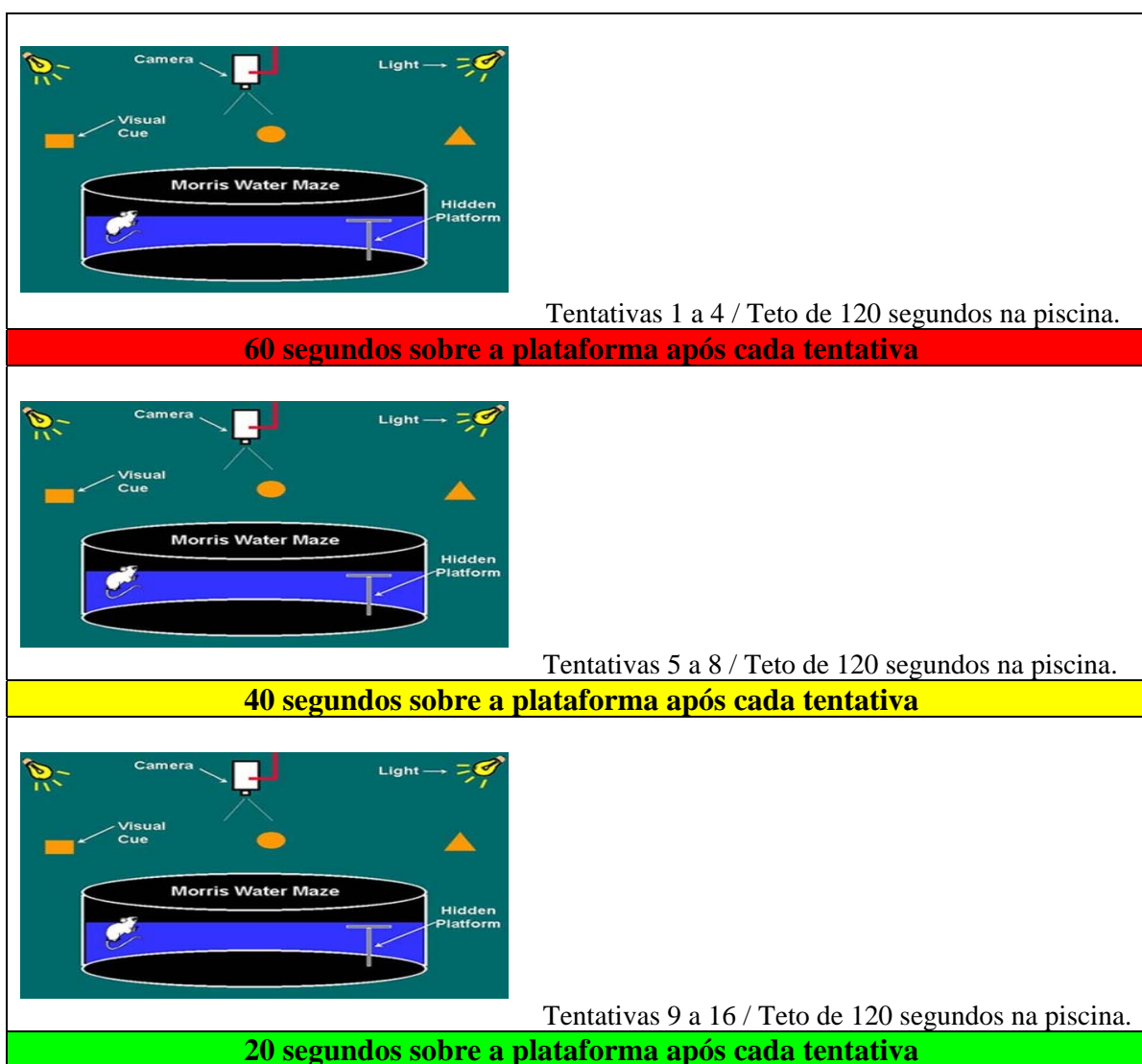


Figura 9: Esquema do treino de um dia contendo 16 tentativas sequenciais no Labirinto Aquático de Morris.

I.6 – Versão não - espacial do Labirinto Aquático de Morris

Embora o Labirinto Aquático de Morris seja um paradigma usado primordialmente para estudo de aprendizagem espacial, vários protocolos de memória não-espacial utilizando este paradigma têm sido desenvolvidos. A versão não-espacial deste protocolo auxilia particularmente no controle de tarefas que visam estudar a especificidade de um tratamento sobre memória espacial. Um exemplo é a tarefa de discriminação visual que é aprendida perfeitamente por ratos com lesão hipocampal (STEWART & MORRIS, 1993).

Para a realização da versão não-espacial do LAM, utilizou-se novamente o tanque circular (180 cm de diâmetro e 55 cm de altura) com 25 cm de água a 21-24°C, mas agora rodeado por cortinas pretas que envolviam toda circunferência da piscina até o teto, deste modo obstruindo as pistas externas. O tanque é virtualmente dividido em quatro quadrantes, onde no centro de um desses quadrantes posicionou-se uma plataforma de acrílico pintada de preto, quadrada com 20 cm de lado, contendo a superfície áspera. Na face lateral da plataforma anexou-se um mastro de madeira com uma bandeira de dimensões quinze cm de comprimento e sete cm de altura. A bandeira ficava a 25 cm fora da água, de maneira que o rato pudesse percebê-la. Esta plataforma se encontrava submersa 1 cm do nível da água (**Figura 10**).

I.6.1 Treino da Versão não-espacial do Labirinto Aquático de Morris

O treino consistiu em dezesseis tentativas seqüenciais com teto de 120 s cada. No intervalo entre cada tentativa os animais ficavam dez segundos sobre a plataforma e 20 s em uma caixa de polietileno (dimensões 30 x 20 x 13 cm) fora do labirinto aquático. Cada tentativa iniciou-se ao se colocar o animal na água com o focinho voltado para a parede da

piscina; liberado, o animal nadava livremente até encontrar a plataforma submersa onde estava a bandeira presa, na qual subia como forma de evitar sua permanência na água. Se o animal não encontrasse a plataforma, era conduzido cuidadosamente até esta. Em cada tentativa, o animal era largado de uma mesma posição, do sul, sendo que a plataforma era deslocada de posição entre cada tentativa, de modo a forçar o animal a encontrar a plataforma por meio da visualização da bandeira, e não por memorizar sua posição. O teste ocorria 24 h após o final da sessão de treino, onde o animal era largado de uma única posição determinada, posição sul. As medidas utilizadas como retenção de memória foram a latência de chegada ao local onde se encontrava a plataforma (**Figura 10**).

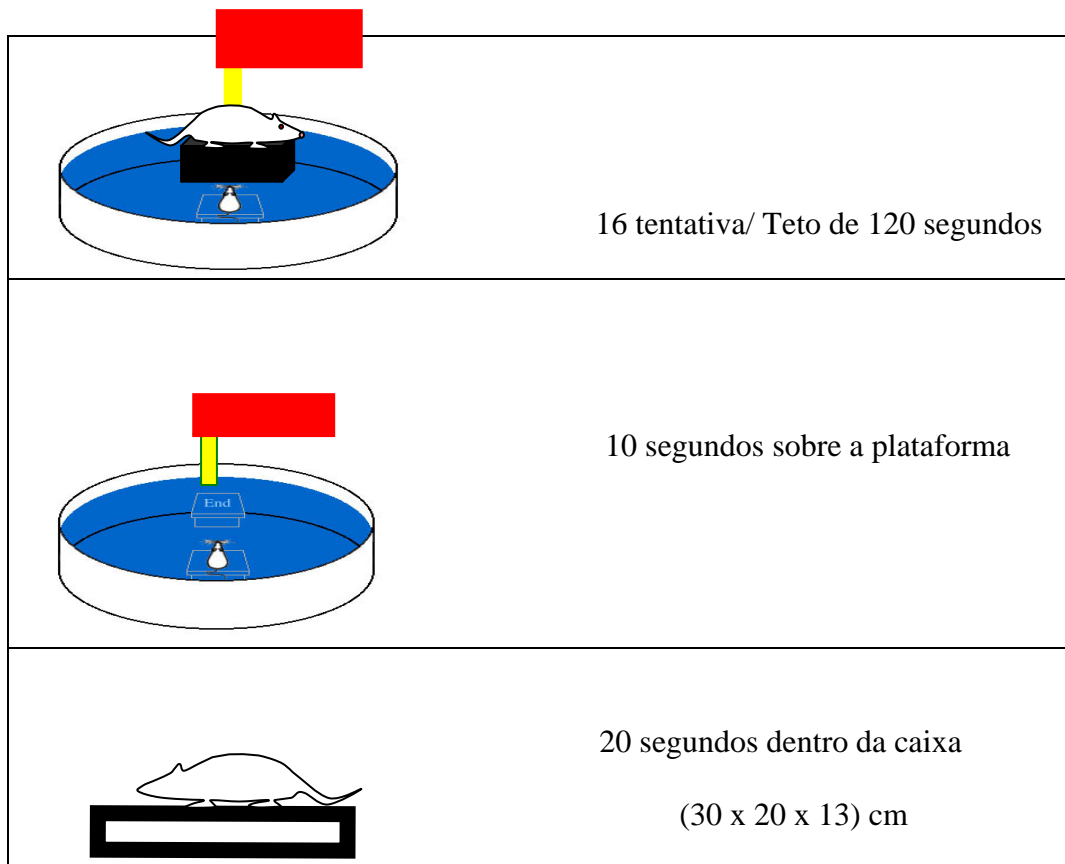


Figura 10: Esquema do treino LAM versão não-espacial

I.7 - Tratamento Farmacológico

Para a realização deste procedimento, utilizou-se uma cânula de infusão (0,05 mm de diâmetro), conectada a uma micro-seringa por meio de um tubo de polietileno. Esse aparato era carregado logo antes da infusão com o material a ser infundido. Neste momento, a cânula de infusão foi acoplada então à luz da cânula guia e a infusão foi realizada durante 30 s em um lado e depois no outro a uma velocidade de 1 μ l/min. Ao término de cada infusão, a cânula foi deixada no local por 30 s adicionais para evitar refluxo (**Figura 11**).

Para um melhor entendimento dos experimentos realizados nesta tese, os procedimentos farmacológicos utilizados para esquiiva inibitória ou Labirinto Aquático de Morris serão explicados separadamente.

I.7.1 - Tratamento Farmacológico no paradigma de esquiiva inibitória

Os ratos foram treinados como descrito no I.4. Posteriormente foram infundidos bilateralmente a diferentes intervalos de tempo (0, 30, 90, 180, 270 ou 360 min) pós-treino. Infundiu-se 0,5 μ L de veículo ou Go 6976 ou Go 7874, na amígdala basolateral ou córtex parietal posterior, como descrito no item III.1.

I.7.2 - Tratamento Farmacológico no Labirinto Aquático de Morris

O treino foi realizado como está descrito na **Figura 9**. Para a investigação do efeito Go 6976 sobre diferentes fases da memória (ver esquemas explicativos que seguem), os animais receberam infusões bilaterais de 0,5 μ L de veículo com ou sem fármaco dissolvidos (Go 6976), através de suas cânulas guias diretamente na região CA1 do

hipocampo dorsal, como descrito no item I.7.



Figura. 11: Aparato para infusão de fármacos através das cânulas-guia esterotaxicamente implantadas. A cânula de infusão, 1,0 mm maior em comprimento do que a cânula-guia, é introduzida na luz desta, atingindo a região-alvo onde se deseja que o fármaco seja infundido.

I.7.3 - Tratamentos utilizados no paradigma de Labirinto Aquático de Morris – Versão Espacial

- I.7.3.1 - Efeito do Go 6976 sobre aquisição de memória espacial

Os ratos foram infundidos 15 min pré-treino para verificar o efeito do Go 6976 sobre a aquisição da memória. O treino foi realizado no LAM como está esquematizado na **Figura 9**. O teste ocorreu 24 horas após o final das sessões de treino, onde o animal era largado de uma única determinada posição – posição sul. A medida utilizada como retenção de memória foi a latência de chegada ao local onde se encontrava a plataforma durante o treino (noroeste). Durante o teste, a plataforma não estava presente (**Figura 12**).

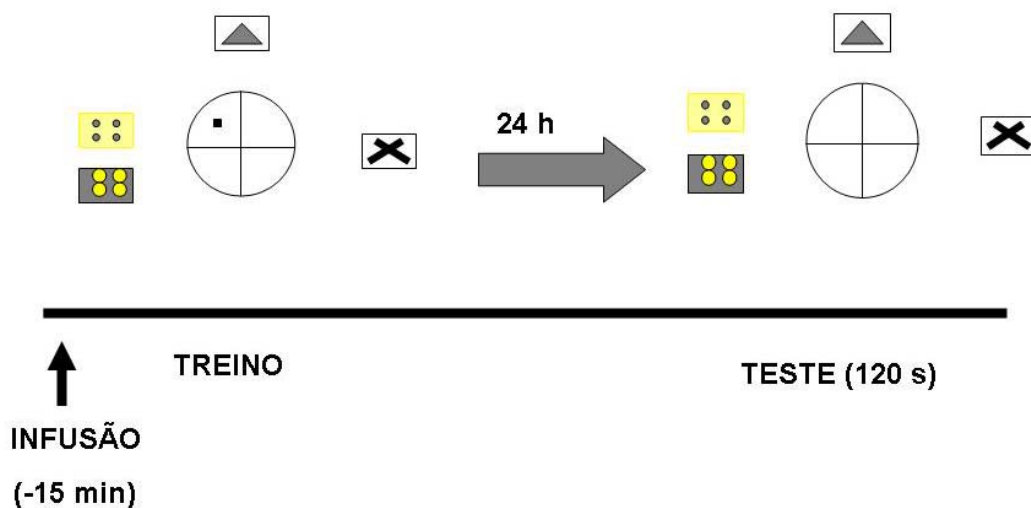


Figura 12: Esquema de execução do experimento (aquisição).

- I.7.3.2 – Curva dose-resposta do Go 6976 na consolidação de memória espacial de longa duração

Os ratos foram treinados como está esquematizado na **figura 9**, e posteriormente foram infundidos imediatamente pós-treino com diferentes doses de Go 6976 (1 pg/lado, 10 pg/lado, 30 pg/lado). O teste ocorreu 24 horas após o final da sessão de treino, para medir memória de longa duração (**Figura 13**). O animal era largado da posição sul e a medida utilizada como retenção de memória foi a latência de chegada ao local onde estava a plataforma durante o treino (noroeste).

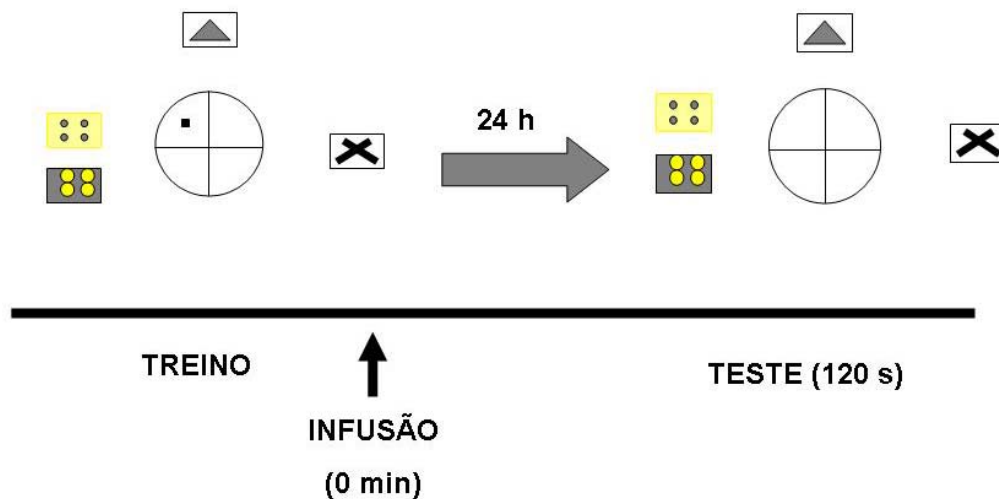


Figura 13: Esquema de execução do experimento (curva de dose).

- 1.7.3.3 – Curva temporal do Go 6976 sobre consolidação de memória espacial de longa duração

Os ratos foram treinados como está esquematizado na **figura 9**, posteriormente foram injetados em diferentes tempos 0 ou 30 ou 90 min pós-treino para verificar a ativação temporal da PKC sobre a consolidação da memória. O teste ocorreu 24 horas após o final da sessão de treino, para medir memória de longa duração (**Figura 14**). O animal era largado da posição sul e a medida utilizada como retenção de memória foi a latência de chegada ao local onde estava a plataforma durante o treino (noroeste).

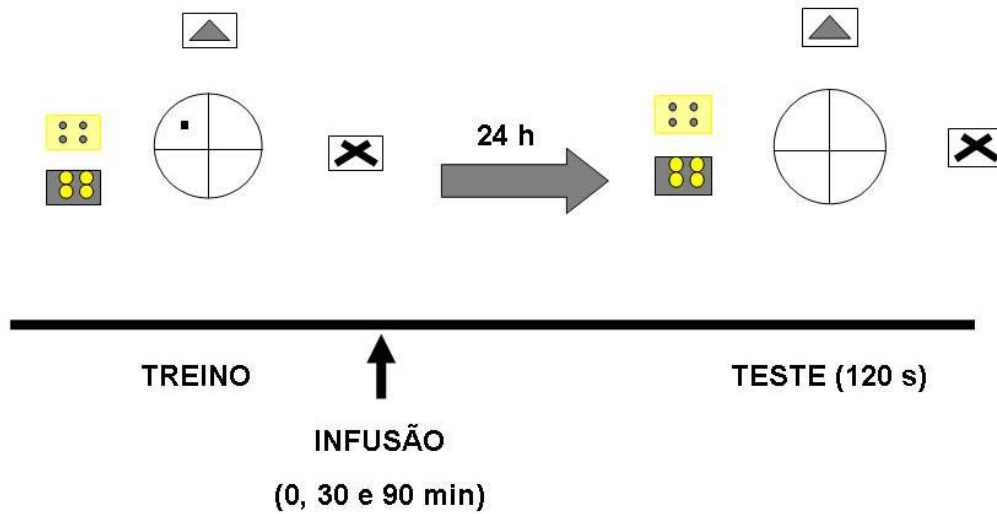


Figura 14: Esquema de execução do experimento (curva de tempo.)

• I.7.3.4 - Efeito do Go 6976 sobre consolidação de memória espacial de curta duração

Os ratos foram injetados 0 min pós-treino para verificar a participação da PKC na memória de curta duração. O treino foi realizado como está esquematizado na **figura 9**. O teste ocorreu 3 horas após o treino (**Figura 15**). Na sessão de teste o animal era largado da posição sul e a medida utilizada como retenção de memória foi a latência de chegada ao local onde estava a plataforma durante o treino (noroeste).

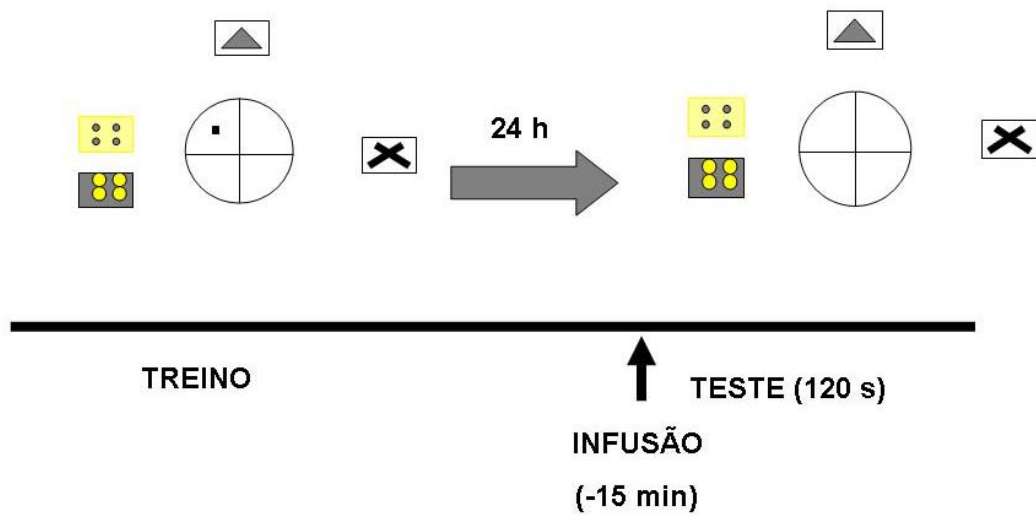


Figura 16: Esquema de execução do experimento (evocação)

- I.7.3.6 - Efeito do Go 6976 sobre a reconsolidação de memória espacial recentes

Os ratos foram treinados como está esquematizado na **figura 9**, e 24 horas após o treino foi realizado a reativação do traço mnemônico (sessão de sessenta segundos sem a presença da plataforma). Imediatamente após a reativação, o Go 6976 foi infundido bilateralmente intra-CA1 dorsal. A memória foi testada 24 horas após a reativação (48 horas pós-treino). A latência de escape foi a medida utilizada para avaliar a retenção da memória (**Figura 17**).

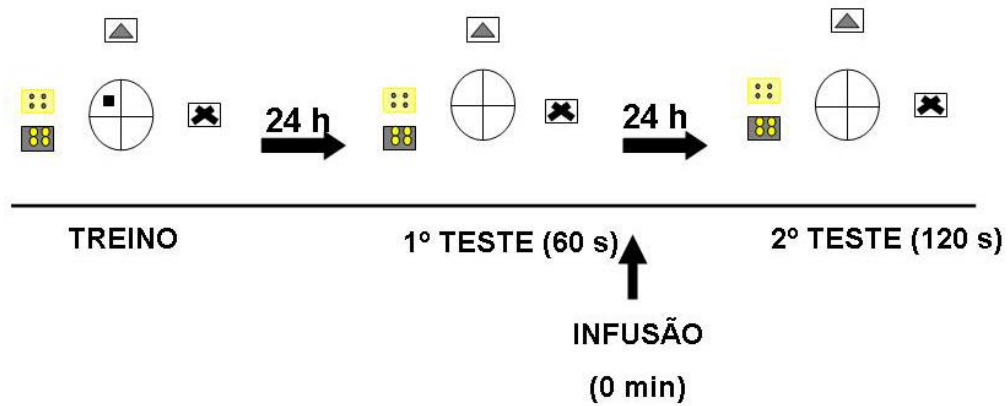


Figura 17: Esquema de execução do experimento (**reconsolidação memória recente**)

• I.7.3.7 - Efeito do Go 6976 sobre memória espacial recente 24 horas pós infusão

Os ratos foram treinados como está esquematizado na **figura 9**, e 24 horas após o treino infundiu-se Go 6976 bilateralmente intra-CA1 dorsal. Realizou-se a sessão de teste 48 horas pós-treino. A latência de escape foi a medida utilizada para avaliar a retenção da memória (**Figura 18**).

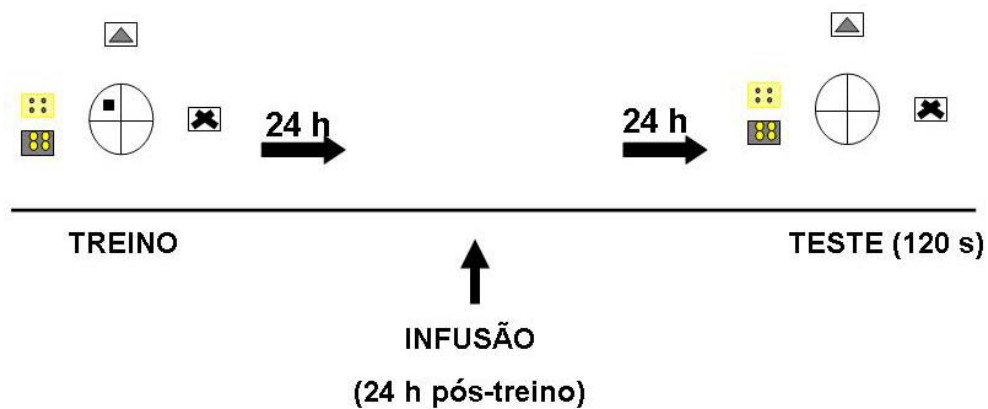


Figura 18: Esquema de execução do experimento (**infusão do Go sobre memória recentes**)

- I.7.3.8 - Efeito do Go 6976 sobre a reativação com plataforma de memória espacial recente

Os ratos foram treinados como está esquematizado na **figura 9**, e 24 horas após-treino infundiu-se Go 6976 bilateralmente intra-CA1 dorsal imediatamente após uma sessão de teste com reforço (presença da plataforma) e mediu-se a latência de escape em uma segunda sessão de teste (sem reforço), realizada 24 horas após a primeira sessão de teste (**Figura 19**).

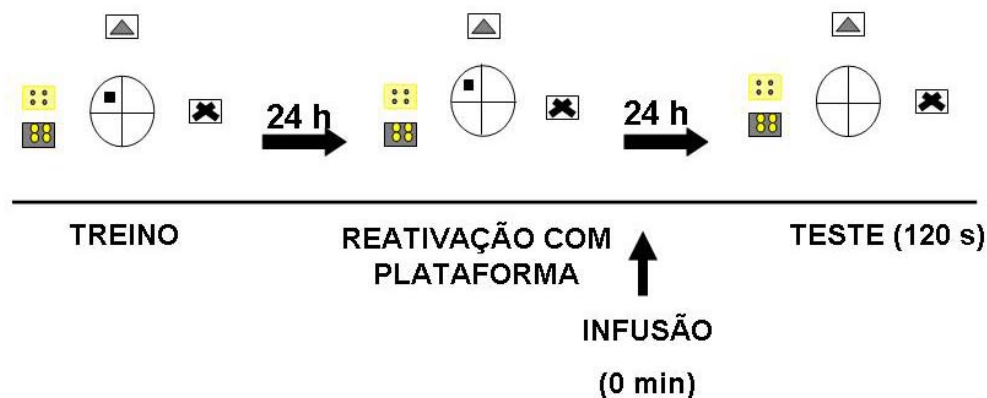


Figura 19: Esquema de execução do experimento (reativação com plataforma de memória espacial recente)

- I.7.3.9 - Efeito do Go 6976 sobre a reconsolidação de memória espacial antigas

Os ratos foram treinados como está esquematizado na **figura 9**, e 120 horas após-treino foi realizada a reativação do traço mnemônico (sessão de sessenta segundos sem a presença da plataforma). Imediatamente após a reativação, o Go 6976 foi infundido bilateralmente intra-CA1 dorsal. A memória foi avaliada 120 horas após a reativação (240 horas pós-treino). A latência de escape foi a medida utilizada para avaliar a retenção da memória (**Figura 20**).

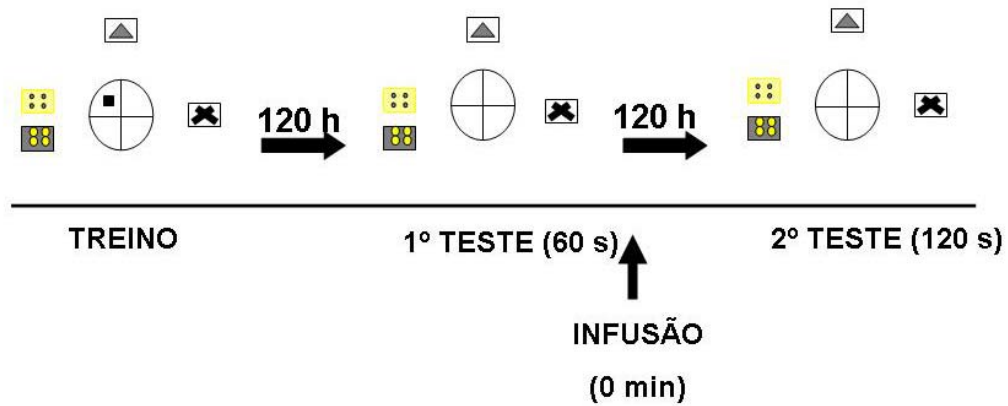


Figura 20: Esquema de execução do experimento (**reconsolidação de memória antiga**)

- I.7.3.10 - Efeito do Go 6976 sobre memória espacial antiga 120 horas pós-infusão

Os ratos foram treinados como está esquematizado na **figura 9**, e 120 horas após-treino infundiu-se o Go 6976 bilateralmente intra-CA1 dorsal. Realizou-se a sessão de teste 240 horas após o treino. A latência de escape foi a medida utilizada para avaliar a retenção da memória (**Figura 21**).

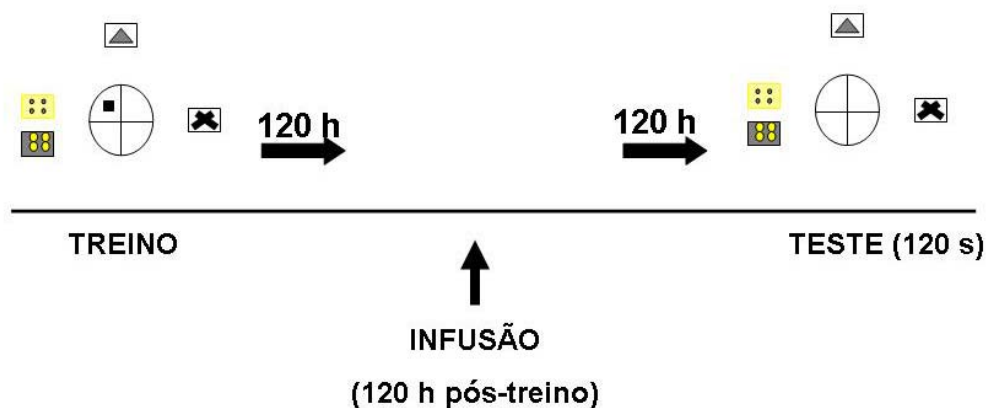


Figura 21: Esquema de execução do experimento (**infusão do Go sobre memória antigas**)

- I.7.3.11 - Efeito do Go 6976 sobre a reativação com plataforma de memória espacial remota

Os ratos foram treinados como está esquematizado na **figura 9**, e 120 horas após o treino infundiu-se Go 6976 bilateralmente intra-CA1 dorsal imediatamente após uma sessão de teste com reforço (presença da plataforma) e mediu-se a latência de escape em uma segunda sessão de teste (sem reforço), realizada 120 horas após a primeira sessão. (**Figura 22**).

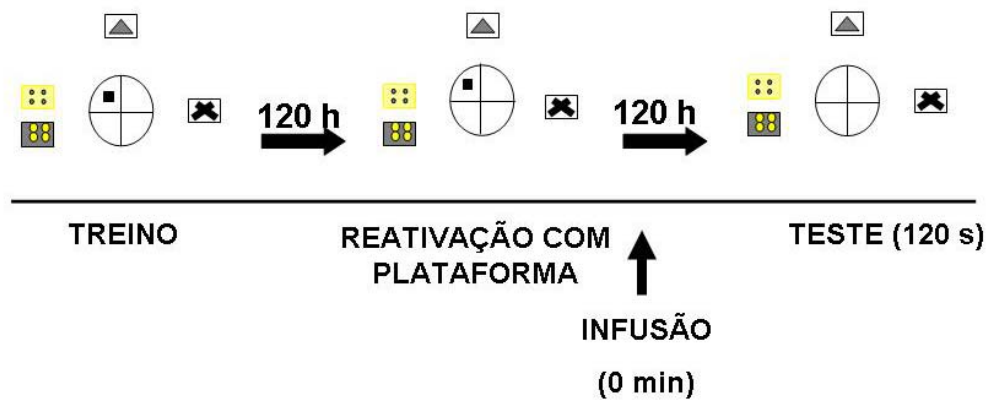


Figura 22: Esquema de execução do experimento (**reativação com plataforma de memória espacial antiga**)

- I.7.3.12 - Efeito do Go 6976 sobre o aprendizado reverso de memória espacial

Os ratos foram treinados como está esquematizado na **figura 9**. Vinte e quatro horas após o treino original com a plataforma entre o norte e o oeste (no centro do quadrante) o animal foi treinado com o mesmo protocolo (16 tentativas; as 4 primeiras com 60 s sobre a plataforma, 4 posteriores tentativas com 40 s sobre a plataforma, e as 8 últimas tentativas permanecendo 20 segundos sobre a plataforma) com a plataforma entre sul e leste (**Figura 23**). Os ratos foram infundidos 0 min após o término do treino reverso. O teste se realizou

24 horas após o treino reverso, sem a plataforma. Uma das medidas realizadas da formação da memória foi latência de escape para passar sobre a localização da plataforma no local “original” (centro do quadrante delimitado entre o “norte” e o “oeste”) e “reverso”(centro do quadrante delimitado entre o “sul” e o “leste”). Outro parâmetro analisado, foi o número de vezes que o animal passou sobre a localização da plataforma no local “original” (centro do quadrante delimitado entre o “norte” e o “oeste”) e “reverso”(centro do quadrante delimitado entre o “sul” e o “leste”) referido como número de cruzamentos.

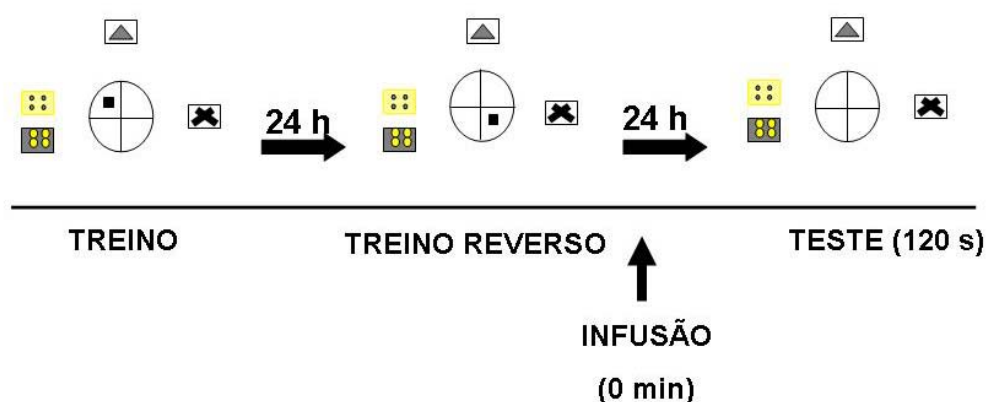


Figura 23: Esquema de execução do experimento (**aprendizado reverso**)

I.7.4 - Tratamentos utilizados no paradigma de Labirinto Aquático de Morris – Versão Não-espacial

- I.7.4.1 - Efeito do Go 6976 sobre aquisição de memória de Labirinto Aquático de Morris – Versão não- espacial

Os ratos foram infundidos 15 minutos pré-treino para verificar o efeito do Go 6976 sobre a aquisição da memória não-espacial. O treino da versão não-espacial do LAM foi realizado como está esquematizado na **figura 10**. O teste ocorreu 24 hs após o final da

sessão de treino, onde o animal era largado de uma única posição (sul) e a medida utilizada como retenção de memória não-espacial foi a latência de chegada à plataforma (**Figura 24**).

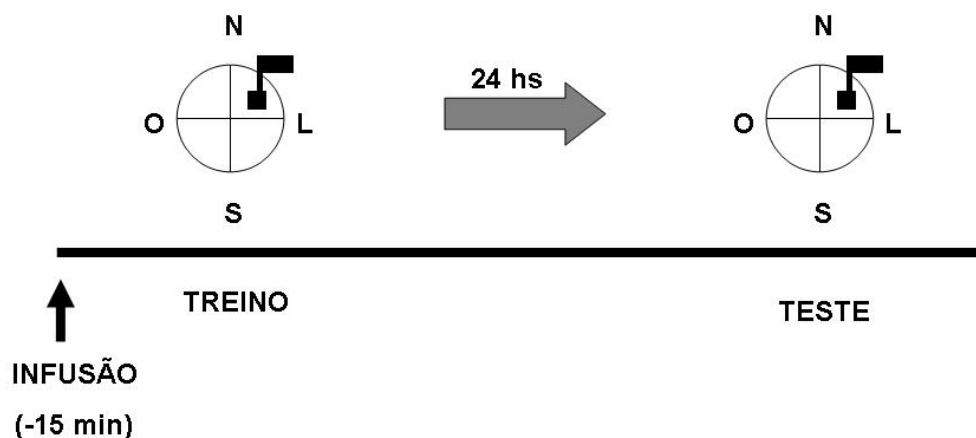


Figura 24: Esquema de execução do experimento (**Aquisição- Versão não-espacial**)

- I.7.4.2 - Efeito do Go 6976 sobre consolidação de memória do Labirinto Aquático de Morris – Versão não - espacial

Os ratos foram treinados, como está esquematizado na **figura 10**, e foram infundidos 0 min pós-treino. O teste ocorreu 24 horas após o final da sessão de treino, quando o animal era largado da posição sul e a medida utilizada como retenção de memória não-espacial foi a latência de chegada à plataforma (**Figura 25**).

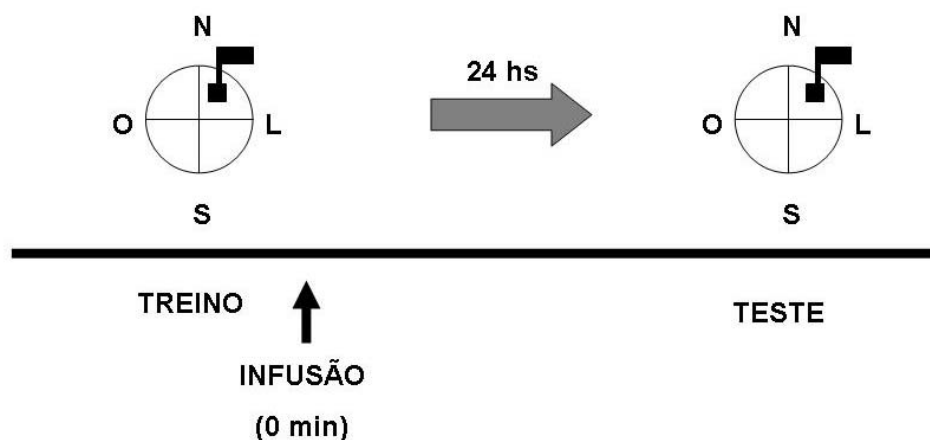


Figura 25: Esquema de execução do experimento (**Consolidação - Versão não-espaial**)

I.8 - Curva da retenção do traço mnemônico

Os ratos foram treinados como está esquematizado na **figura 9**. Posteriormente os ratos foram testados na ausência da plataforma, 1 dia, 2 dias, 5 dias, 7 dias, 15 dias, 30 dias ou 45 dias após o treino. Deste modo, investigou-se o decaimento fisiológico da memória espacial de longa duração para o protocolo padronizado e utilizado nesta tese.

No teste o animal era largado da posição sul, e a medida utilizada como retenção de memória foi a latência de chegada ao local onde estava a plataforma (noroeste). No tempo decorrido entre o treino e o teste, os animais permaneceram no biotério.

I.9 - Controle histológico da localização das cânulas-guia e do local de infusão

A verificação anatômica do posicionamento das cânulas implantadas e do local atingido pela infusão foi realizada *post mortem*. Para isso, depois dos procedimentos comportamentais aos quais os animais foram submetidos, estes receberam 0,5 µl de uma solução de azul de metileno 0,1% através das cânulas como descrito no item I.7. Quinze

minutos depois, eles foram sacrificados e seu cérebro removido e colocado em uma solução de formol 4% por um período de quatro a sete dias. Após, procedeu-se à análise da posição da cânula, com auxílio de uma lupa. Somente animais onde a localização da mancha de azul de metileno encontrava-se dentro de um raio de 2 mm do local desejado foram considerados na análise estatística dos dados (**Figura 6**).

I.10 – Fármacos Utilizados

Neste estudo, um dos fármacos utilizados foi o inibidor das isoformas clássicas de PKC, Go 6976 (CalBiochem, San Diego, CA), em diferentes doses dissolvidos em DMSO 2%. Outro fármaco utilizado foi o inibidor geral das PKCs, Go 7874 (CalBiochem, San Diego, CA) dissolvido em DMSO 2%. As drogas foram infundidas a temperatura ambiente, na ausência de luz (uma vez que Go 6976 é sensível a luz) e pH 7,4. As doses utilizadas foram determinadas com base em experimentos-piloto e em estudos prévios mostrando o efeito sobre aprendizado e memória, também em outras variáveis comportamentais e fisiológicas. Os animais do grupo controle receberam infusão bilateral 0,5 µL de veículo utilizado para a preparação dos fármacos estudados (DMSO 2% em salina) (**Figura 11**).

I.11 - Análise Estatística dos Dados

Para a análise dos dados obtidos no paradigma experimental do Labirinto Aquático de Morris a análise estatística utilizada foi paramétrica.

Para analisar o efeito do inibidor sobre a curva de aquisição de memória espacial, realizada ANOVA de medidas repetidas seguido de post-hoc de Bonferroni.

As latências de escape para a chegada na plataforma no dia do teste foram

comparadas por teste t em relação ao grupo controle. Na curva dose-resposta da consolidação de memória espacial foi realizada ANOVA de UMA VIA entre as latências de teste das diferentes doses, seguido do teste Dunnet para comparar com o controle ou ANOVA de UMA VIA seguido do teste Newmann-Keuls para comparar as latências de escape do teste da curva de perdurabilidade.

No paradigma experimental de esquiva inibitória, as latências para a descida da plataforma na sessão de teste da tarefa de esquiva inibitória obedeciam a um tempo máximo de 180 segundos de permanência na plataforma, acarretando a necessidade de utilização de estatística não-paramétrica para análise dos dados. As latências das sessões foram analisadas utilizando análise de variância de Kruskal-Wallis seguido de teste de Mann-Whitney.

Valores de p menores do que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes. Para a análise estatística dos dados, utilizamos o software Graph-Pad Prism.

PARTE III

CAPÍTULO I
DISCUSSÃO

Os resultados apresentados nesta tese mostram que o inibidor das isoformas clássicas de PKC, Go 6976, quando infundido na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos 15 min pré-treino ou imediatamente pós-treino no LAM, piora de maneira dose-dependente a aquisição e a consolidação, respectivamente, da memória espacial de longa duração. Estes resultados são similares àqueles previamente encontrados por outros autores que utilizaram inibidores e/ou tarefas diferentes (VIANNA et al., 2000; JERUSALINSKY et al., 1994; PARATCHA et al., 2000; SCHARENBERG et al., 1991, SUNAYASHI-KUSUZAKI et al., 1993).

Resultados prévios do nosso grupo investigando um substrato da PKC que se localiza no terminal pré-sináptico e que está envolvido com a liberação de neurotransmissores e crescimento neurítico, B-50/GAP-43, mostraram que o pico de fosforilação deste substrato ocorre 30 min pós-treino na tarefa de esquivas inibitória em preparação sináptica de hipocampo (CAMMAROTA et al., 1997). Estes resultados *in vivo* corroboram com o achado que mostra *in vitro* que a indução de LTP conduz a um aumento da fosforilação de B-50/GAP-43 (GIANOTTI et al., 1992).

Apesar de haver algumas diferenças entre os mecanismos bioquímicos envolvidos no fenômeno da LTP e no aprendizado de novas memórias, a LTP é apontada como um processo chave necessário para a formação de memórias (BLISS & COLINGRIDGE, 1993).

Trabalhos atuais sobre a indução e a manutenção da plasticidade sináptica no hipocampo mostram que tanto a LTP artificialmente induzida como a aprendizagem acarretam mudanças morfológicas nas espinhas dendríticas, o que poderia contribuir para a codificação da memória. Já está bem descrito que a memória de longa duração, bem como a manutenção a longo prazo da LTP dependem da síntese de proteínas, que serão utilizadas

para a montagem e estabilização de novas sinapses. Vários achados evidenciam que a síntese protéica é necessária durante o período de consolidação das memórias de longa duração. Os fatores de transcrição regulam a taxa de síntese de muitas proteínas, e vários estudos já mostraram que a expressão de genes regulados especialmente por um destes fatores de transcrição, o CREB (vide introdução), é crítica para a consolidação de memória de longo prazo (YIN & TULLY, 1996).

Roberson e colaboradores (1999) observaram que a PKC pode modular a atividade da CREB e conseqüentemente regular a expressão de genes envolvidos na manutenção da LTP e na formação da memória de longa duração, e em outras formas de plasticidade sináptica hipocampal (ROBERSON et al., 1999). Matthies e colaboradores haviam mostrado previamente que inibidores da PKC bloqueiam a fase tardia da LTP (MATTHIES et al., 1991). Além disso, Akers e colaboradores sugeriram que a translocação da PKC do citosol para a membrana poderia ser determinante para a LTP hipocampal (AKERS et al., 1986). Além de modular a atividade da CREB, a PKC também exerce efeito modulatório sobre o estado de fosforilação da subunidade NR2 do receptor NMDA (LIAO et al., 2001).

Com base nos fatos expostos até aqui, pode-se especular que o efeito amnésico observado do Go 6976 na memória espacial de longa duração se deva a um bloqueio da fosforilação de CREB pela inibição da PKC. Além disso, a inibição da PKC pode impedir a fosforilação de seu substrato pré-sináptico B-50/GAP-43 ou de seu substrato pós-sináptico neurogranina, que participam da liberação de neurotransmissores e do crescimento neurítico. Entretanto, devido ao grande espectro de ação da PKC sobre diferentes proteínas relacionadas à plasticidade sináptica, nossas possíveis respostas para explicar o efeito encontrado no nível molecular ficam bastante restritas a especulações.

O efeito inibitório sobre a consolidação foi observado apenas quando o Go 6976 foi administrado imediatamente pós-treino, mas não 30 ou 90 minutos pós-treino, sugerindo que o efeito amnésico deste inibidor se deve a uma piora tempo-dependente do processo de consolidação, e que não se trata de uma consequência de efeitos tardios sobre a evocação.

O desempenho na tarefa do LAM pode ser influenciada por vários fatores como sexo, espécie dos animais, peso corporal, idade, área da piscina, temperatura da água, protocolo de treino dentre outros fatores (BRANDEIS et al., 1989). Além disso, para que haja um bom desempenho no LAM, várias habilidades são necessárias, dentre estas uma boa percepção espacial e visual e um bom desempenho motor. Visando discriminar o efeito amnésico do Go 6976 sobre a aquisição e consolidação de memória espacial, de uma possível interferência da droga sobre o sistema locomotor e/ou visual dos animais, utilizamos a versão não-espacial do LAM. Quando o Go 6976 foi infundido na dose máxima 15 min pré-treino ou imediatamente pós-treino na versão não-espacial no LAM, não observamos efeito tanto sobre aquisição como sobre a consolidação da memória quando esta foi avaliada 24 horas após o treino (**Figura 31 e 32**), demonstrando que o efeito observado é de fato sobre a memória e não sobre a atividade locomotora ou visual do animal.

Para verificar se as isoformas clássicas da PKC participam da formação da memória espacial de curta duração, infundimos Go 6976 0 min pós-treino e realizamos o teste 3 horas após o treino na versão espacial do LAM. Verificamos que, apesar de a PKC participar da formação da memória de longa duração, as isoformas clássicas da PKC parecem não participar dos estágios iniciais da consolidação da memória espacial de curta duração avaliada 3 horas pós-treino no LAM (**Figura 28**). Os resultados encontrados estão de acordo com dados prévios de Bianchin et al. (1999), que mostram que a PKC não

participa do processo de consolidação da memória de curta duração para a tarefa de esquiva inibitória (BIANCHIN et al., 1999).

A separação da STM e LTM e de suas vias bioquímicas particulares foram demonstradas em numerosos ensaios, onde diversos experimentos farmacológicos direcionados ao hipocampo resultaram no bloqueio da STM sem alterar a LTM nos mesmos animais, quando treinados na tarefa de esquiva inibitória (IZQUIERDO et al., 2000; VIANNA et al., 2000). Estes resultados sugerem que a consolidação da memória espacial no labirinto aquático de Morris possivelmente ocorra de forma paralela e não em série, do mesmo modo como evidenciado na tarefa de esquiva inibitória. Outra possibilidade a ser considerada é que a memória espacial de curta duração seja processada primeiro no córtex parietal, como sugere Nadel & Moscovitch, 1997, explicando o porquê de a infusão de Go 6976 no hipocampo não resulta em prejuízo da formação de memória de curta duração (NADEL & MOSCOVITCH, 1997).

Investigamos também a participação das isoformas clássicas da PKC na evocação da memória espacial no LAM. A evocação das memórias é normalmente desencadeada por um estímulo ou conjunto de estímulos, sendo estes estímulos iguais ou semelhantes àqueles inerentes a cada experiência de aprendizado (IZQUIERDO, 1989). Para que isso ocorra, é necessário a participação simultânea de várias estruturas cerebrais, como o hipocampo, córtex entorrinal, córtex parietal posterior, córtex cingulado posterior e amígdala basolateral, como já demonstrado para a tarefa de esquiva inibitória (BARROS et al., 2003). Apesar do avanço nos conhecimentos neuroanatômicos sobre o processo de evocação da memórias aversivas, pouco se sabe sobre as cascatas bioquímicas envolvidas na evocação de memória espacial.

Os resultados expostos na **figura 30** mostram que as PKCs clássicas hipocampais participam da evocação da memória espacial de longa duração. Nosso resultado está de acordo com resultados prévios do grupo que mostram que a infusão de Go 6976 na região CA1 dorsal do hipocampo piora a retenção de memória associada à tarefa de esQUIVA inibitória (VIANNA et al., 2000). Por outro lado, estes resultados diferem de outros publicados anteriormente que mostram que a micro-infusão estereotaxicamente localizada de outro inibidor da PKC, queleretrine, no núcleo supra-braquial do tronco cerebral de ratos, não altera retenção de memória associada à tarefa de condicionamento ao gosto aversivo (SACCHETTI & BIELAVSKA, 1998). Essa discrepância encontrada pode ser decorrente da abordagem metodológica, incluindo o intervalo de tempo e a via de administração dos compostos sob investigação, a região cerebral alvo de infusão, a espécie animal utilizada, o tipo de memória avaliada, além da especificidade do inibidor utilizado.

Durante muito tempo acreditou-se que no processo de consolidação, uma nova memória inicialmente lábil que pode ser bloqueada por vários interferentes como eventos ou tratamentos farmacológicos, torna-se estável com o passar do tempo até tornar-se insensível a qualquer interferência, levando a crer que uma vez consolidada a memória tornava-se permanente (McGAUGH, 2000; SQUIRE & ALVAREZ, 1995). Esta visão começou a ser questionada quando Misanin e colaboradores em 1968 mostraram que descargas eletroconvulsivas provocavam amnésia retrógrada quando administradas no momento da evocação de memórias. Posteriormente Nader e colaboradores observaram que quando infundiam anisomicina, inibidor de síntese protéica, na amígdala imediatamente após a reativação de uma memória consolidada há 14 dias resultava em amnésia retrógrada (NADER et al., 2000). Estes resultados acrescidos de outros achados sugeriram que a evocação de uma memória pode iniciar um processo chamado de reconsolidação, segundo

o qual quando uma memória já consolidada é evocada (reativada) torna-se lábil e capaz de alterar-se ou recompor-se, se neste momento for introduzida nova informação ou algum tratamento específico.

Então a próxima dúvida que surgiu foi se esta nova fase da memória denominada de reconsolidação não seria a consolidação propriamente dita, já que estes processos parecem utilizar os mesmos substratos nas mesmas regiões cerebrais. Recentemente Lee e colaboradores, infundindo oligonucleotídeos antisense para BDNF ou Zif 268 intra-hipocampal em rato, mostraram que a consolidação e a reconsolidação são dois processos dissociáveis, pois utilizam substratos cerebrais diferentes. Eles mostraram que a consolidação do medo contextual envolve o fator neurotrófico neuronal (BDNF) mas não o fator de transcrição Zif 268 no hipocampo de rato. A reconsolidação, ao contrário, requereu Zif 268 mas não BDNF (Lee et al., 2004). Sugeriu-se então que esta dissociação poderia indicar que quando se evoca uma memória, não se forma um novo traço desta memória, mas ao invés disso se ativa um processo celular diferente que serviria para manter a memória já existente (MYERS & DAVIS, 2004). Várias evidências posteriores, utilizando ferramentas farmacológicas e bioquímicas mostraram que o processo de reconsolidação requeria, além de síntese protéica, ativação de receptor NMDA (KIDA et al., 2002), MAPK (DUVARCI et al., 2005), PKA (TRONSON et al., 2006), fosforilação de CREB (PRZYBYSLAWSKI & SARA, 1997). Levando em conta a participação destas proteínas cinases e do receptor NMDA no processo de reconsolidação em diferentes tipos de memória, resolvemos investigar se as isoformas clássicas da PKC poderiam ser requisitadas na reconsolidação de memórias espaciais.

Como é possível observar na **figura 33**, a administração de Go 6876 no hipocampo dorsal imediatamente após a reativação do traço mnemônico que ocorreu 24 horas após o

treino (sem a presença da plataforma), prejudicou a reconsolidação da memória espacial de referência avaliada 24 horas após a reativação. Para nos certificarmos de que o efeito observado não foi devido a uma ação prejudicial do Go 6976 sobre a habilidade visuo-motora dos ratos, nem devido a uma ação tardia do Go 6976 sobre a consolidação ou sobre a evocação, o Go 6976 foi infundido no hipocampo, 24 horas após o treino na ausência de reativação, e nenhum efeito foi observado sobre a memória do animal 24 horas após a infusão (**Figura 34**). A ausência de efeito foi observado também quando a infusão intra-hipocampal do Go 6976 foi realizada imediatamente após reativação 24 horas pós-treino com reforço (na presença da plataforma), testando-se a memória espacial 24 horas após esta reativação, mostrando que o reforço do aprendizado contrabalanceia o efeito prejudicial que o Go 6976 exerceu sobre a reconsolidação de uma memória espacial de longa duração.

Decidimos investigar também se a reconsolidação tinha um gradiente temporal, isto é, se memórias antigas poderiam estar mais consolidadas e portanto mais resistentes a interferências quando fossem evocadas. Para testar esta hipótese espaçamos 120 horas entre o treino no LAM e a reativação sem reforço. Quando o Go 6976 foi administrado no hipocampo dorsal imediatamente após a reativação 120 horas pós-treino do traço mnemônico (sem a presença da plataforma), verificou-se novamente um prejuízo na memória espacial avaliada 5 dias após a reativação (240 horas pós-treino) (**Figura 36**). Da mesma forma como no experimento anterior, para nos certificarmos que o efeito do Go 6976 encontrado na **figura 36** era de fato sobre o processo de reconsolidação da memória, infundiu-se o Go 6976 bilateralmente intra-CA1 dorsal 120 horas pós-treino, e realizou-se a sessão de teste 120 horas pós infusão, e nenhum efeito foi observado sobre a memória espacial de longa duração remota (**Figura 37**), eliminando as hipóteses de o efeito observado ter sido sobre a habilidade visuo-motora dos animais ou devido a uma ação

tardia do Go 6976 sobre a consolidação ou sobre a evocação. Verificou-se também ausência de efeito quando a infusão intra-hipocampal do Go 6976 foi realizada imediatamente após reativação 120 horas pós-treino com reforço (na presença da plataforma), testando-se a memória espacial 240 horas após esta reativação, mostrando que o reforço do aprendizado contrabalança o efeito prejudicial que o Go 6976 exerceu sobre a reconsolidação de uma memória espacial de longa duração também quando esta é mais antiga (**Figura 39**).

Nossos dados apontam que tanto as memórias de longa duração recentes quanto as remotas apresentam uma suscetibilidade ao Go 6976. A partir destes achados, podemos sugerir que as isoformas clássicas da PKC são requeridas tanto na reconsolidação de memórias espaciais de longa duração recentes quanto remotas. Além disso, o efeito inibitório do Go 6976 sobre a reconsolidação não é um efeito transitório pois observamos que este efeito permanece por pelo menos 5 dias após a infusão do inibidor.

Porém, estes efeitos do Go 6976 revelados nestes experimentos projetados para investigação da reconsolidação poderiam ser devidos a ação do Go 6976 sobre um outro fenômeno, a extinção, de modo que poder-se-ia argumentar que o Go 6976 ao invés de estar bloqueando a reconsolidação poderia estar potencializando a extinção disparada pela sessão de reativação sem a plataforma. Para responder esta dúvida, decidimos investigar o efeito do Go 6976 sobre a consolidação de um aprendizado espacial conflitante em relação a um aprendizado espacial prévio (**Figura 40**). O conflito é gerado pela mudança do local da plataforma para o quadrante reverso na execução do segundo treino, realizado 24 horas após o primeiro treino na versão espacial do LAM. Este conflito entre a representatividade dos mapas espaciais memorizados no primeiro e no segundo dia acarreta na substituição do mais antigo pelo mais recente, ou em outras palavras, na extinção do aprendizado espacial desenvolvido no primeiro treino (PAVLOV, 1926). Observando a **Figura 40**, verifica-se

que quando o Go 6976 (30 pg/lado) foi infundido bilateralmente intra-CA1 imediatamente pós-treino reverso, houve um prejuízo na consolidação da memória espacial de longa duração relativa ao local onde se encontrava a plataforma no treino reverso (local reverso), mas não houve prejuízo sobre a retenção ou sobre a evocação do local onde a plataforma se encontrava durante o primeiro treino (local original), comparando-se com o grupo veículo. Para que possamos visualizar mais claramente o efeito do Go 6976 sobre o processo de extinção imposto pelo aprendizado reverso sobre o aprendizado original, devemos analisar as Tabelas 1 e 2, que dispõem estrategicamente os resultados obtidos para otimizar sua compreensão.

Tabela 1: Comparação estatística (teste t não pareado) entre as latências de teste, obtidas no experimento de aprendizado reverso, na versão espacial do LAM, quando infundiu-se veículo ou Go 6976 imediatamente pós-treino reverso (24 horas pós-treino original, teste 24 horas pós-treino reverso):

	Latência Original (s)	Latência Reversa (s)	
Veículo	28,31 ± 6,06	8,69 ± 2,21	P = 0,0056 (**)
Go 6976	45,07 ± 9,10	36,71 ± 9,53	P = 0,5314
	P = 0,1437	P = 0,0105 (*)	

Tabela -2: Comparação estatística (teste t não pareado) entre os cruzamentos sobre os locais alvo durante a sessão de teste, obtidos no experimento de aprendizado reverso, na versão espacial do LAM, quando infundiu-se veículo ou Go 6976 imediatamente pós-treino reverso (24 horas pós-treino original, teste 24 horas pós-treino reverso):

	Crossing Original	Crossing Reverso	
Veículo	3,15 ± 0,36	8,00 ± 1,13	P = 0,0004 (***)
Go 6976	2,29 ± 0,60	4,64 ± 0,96	P = 0,0468 (*)
	P = 0,2318	P = 0,0314 (*)	

Na **Tabela 1**, comparando-se a latência original com a latência reversa no grupo veículo, observa-se que o aprendizado reverso de fato tende a extinguir o aprendizado original ($p = 0,0056$ para latência original vs. latência reversa). Igualmente, na **Tabela 2**, comparando-se o número de cruzamentos sobre o local reverso com o número de cruzamentos sobre o local original no grupo veículo ($p = 0,0004$ para cruzamentos original vs. cruzamentos reverso), e também no grupo Go 6976 ($p = 0,0468$ para cruzamentos original vs. cruzamentos reverso), observa-se novamente o efeito da extinção do aprendizado reverso sobre o aprendizado original.

Como já dito anteriormente, nota-se claramente que o Go 6976 prejudicou a retenção do aprendizado reverso ($p = 0,0105$ para latência veículo vs. latência Go 6976; $p = 0,0314$ para cruzamentos veículo vs. cruzamentos Go 6976), mas não teve efeito sobre a retenção do aprendizado original ($p = 0,1437$ para latência veículo vs. latência Go 6976; $p = 0,2318$ para cruzamentos veículo vs. cruzamentos Go 6976).

Estes resultados em conjunto permitem concluir que o efeito do Go 6976 nos experimentos de reconsolidação foram de fato sobre a reconsolidação (prejudicando a reconsolidação), e não sobre a extinção (potencializando a extinção), pois como houve um processo de extinção da retenção do local original, devido a retenção do local reverso, verifica-se que o Go 6976 não potencializa a extinção, pois se o fizesse teria piorado, em relação ao grupo salina, significativamente a retenção do local original da plataforma.

Especulações sobre a reconsolidação sugerem que a reativação que ocorreria antes que o traço mnemônico seja completamente consolidado resultaria no rearranjo de muitas destas sinapses representativas da informação original, e como consequência a memória seria parcialmente reeditadas para armazenar as informações mais recentes (MYERS & DAVIS, 2002). Assim pode-se supor que a interferência de fármacos como o Go 6976,

quando infundidos após a reativação do traço mnemônico, poderia ser devida a uma interferência no rearranjo sináptico, desta forma impedindo a reconstrução do traço mnemônico. A possibilidade de interferir nas memórias já consolidadas faz do fenômeno de reconsolidação um processo de especial importância a ser investigado, pois poderia oferecer a possibilidade de tratar memórias indesejáveis como por exemplo do estresse pós-traumático (MORGADO, 2005).

Resolvemos ainda analisar o decaimento da intensidade do traço mnemônico espacial no decorrer do tempo desde o treino na tarefa do LAM segundo o protocolo utilizado neste trabalho. Como mostrado na **figura 40**, o traço mnemônico espacial aferido por meio deste protocolo parece enfraquecer-se levemente (porém de maneira estatisticamente não significativa) até atingir um platô que se estende por pelo menos 60 dias após a aquisição, cujas latências situam-se bem abaixo da latência máxima verificada no início do treino.

Com exceção de memórias isoladas, sabe-se que a simples passagem do tempo determina um inevitável enfraquecimento das memórias que inicialmente eram claras e cheias de detalhes. Essa perda de intensidade do traço mnemônico com o decorrer do tempo refere-se ao fenômeno de esquecimento, que é fisiológico e desempenha um papel adaptativo como parte importante no funcionamento do cérebro. Mas pode-se questionar se realmente esquecemos uma informação ou apenas perdemos a capacidade de evocá-la, mesmo que seu engrama ainda exista e possa, de alguma forma, tornar-se novamente acessível. Com base em estudos disponíveis até o momento, uma das hipóteses é que o esquecimento observado logo após umas horas ou dias deva-se em parte a uma perda real da informação, e que algumas das modificações sinápticas que ocorrem no momento do aprendizado de fato regridam. O cenário mais provável é que novos episódios de

armazenamento de informação formatem de novo, e, continuamente, representações previamente existentes (SQUIRE & KANDEL, 2003).

Estudos anteriores a esta tese haviam demonstrado que as PKCs participam da formação de memórias em diferentes tarefas comportamentais dependentes de hipocampo, como esQUIVA inibitória (CAMMAROTA et al., 1997; BERNABEU et al., 1995; VIANNA et al., 2000), esQUIVA ativa (CHEN et al., 1997), memória não-associativa (SUTTON et al., 2004) e memória espacial (NOGUES et al., 1994). Apesar de sabermos que o armazenamento de memórias declarativas não se restringe ao hipocampo, ainda são poucos os estudos que investigam as cascatas bioquímicas relacionadas a formação de memórias em outras estruturas encefálicas (BARROS et al., 2000; IZQUIERDO et al., 1997a,b; SQUIRE & ZOLA-MORGAN, 1991; KNOWLTON & SQUIRE, 1994).

Tendo em vista que a consolidação das memórias ocorre de forma distribuída em diferentes estruturas cerebrais, decidimos investigar se as PKCs estão envolvidas na consolidação de memórias aversivas na amígdala basolateral. Após décadas de estudos já está bem estabelecido que a amígdala exerce um efeito modulador sobre as memórias, pois parece receber, na hora da formação da memória, o impacto inicial de hormônios periféricos (corticóides, adrenalina) liberados no sangue em resposta a estresse ou a uma emoção excessiva. A ativação de circuitos neuronais na amígdala por estes hormônios determina uma maior fixação das memórias inerentes a estes estados emocionais, (IZQUIERDO, 2002).

Para verificarmos se as PKCs participavam da consolidação de memórias aversivas na amígdala basolateral, o inibidor não-seletivo da PKC Go 7874 e o inibidor seletivo das isoformas clássicas da PKC, Go 6976, foram infundidos a diferentes tempos nesta estrutura. Os resultados (**Figura 41**) mostram que os inibidores Go 7874 e Go 6976 pioram a

retenção da memória de longa duração medida 24 horas após o treino quando infundidos imediatamente ou 30 min após-treino, mas não nos tempos mais tardios. Com base nestes resultados sugere-se que as PKCs devam ser necessárias nas fases iniciais do processo de consolidação de memória aversivas na amígdala basolateral para a tarefa de esQUIVA inibitória.

Nossos resultados estão de acordo com observações anteriores feitas por nosso grupo, que mostram que a PKC é ativada na amígdala logo após o treino na tarefa de esQUIVA inibitória (BERNABEU et al., 1995). Além disso, a infusão bilateral de outros inibidores de PKC (stauroporina e CGP 41231) na amígdala basolateral causam amnésia retrógrada quando infundidos 0 ou 30 min pós-treino no paradigma de esQUIVA inibitória (JERUSALINSKY et al., 1994). Em concordância com esses dados, foi visto que infusão de H7, inibidor de PKC, na amígdala basolateral inibe o aprendizado de medo condicionado (GOSENS et al., 2000). Estudos utilizando camundongos *knockout* para isoforma β da PKC mostram que estes animais apresentam um déficit severo de aprendizagem para tarefas de medo condicionado, o qual está diretamente relacionado com a atividade da amígdala (WEEBER et al., 2000).

Experimentos farmacológicos utilizando como substrato anatômico a amígdala e o hipocampo mostram que nas fases iniciais da consolidação para a tarefa de esQUIVA inibitória requer-se, além de PKC, a ativação dos receptores glutamatérgicos NMDA, AMPA e glutamatérgico metabotrópico tipo I, e a ativação da via das MAPK (IZQUIERDO 1992, 1997 a e b, ZANATTA et al, 1997, ROSSATO et al., 2004). Assim, pode-se sugerir que há uma coincidência temporal dos mecanismos bioquímicos no

hipocampo e na amígdala para o processo de consolidação de memórias aversivas (IZQUIERDO et al., 1992).

Como exposto na introdução, o córtex parietal faz parte do córtex associativo e parece estar diretamente envolvido na formação de memórias espaciais (CHIBA et al., 2002; SQUIRE & KANDEL, 2003). Outra função bem estabelecida desta estrutura é o processamento contínuo de informações na memória operacional (QUINTANA & FUSTER, 1999). Assim, outro objetivo delineado nesta tese foi investigar o envolvimento das PKCs presentes no córtex parietal posterior na formação de memórias aversivas utilizando para isso o paradigma de esquiva inibitória. Para este fim, infundiu-se o inibidor não-seletivo da PKC, Go 7874, e o inibidor seletivo das isoformas clássicas da PKC, Go 6976, a diferentes tempos intra-córtex parietal posterior.

O Go 7874, inibidor não-seletivo da PKC, quando infundido no córtex parietal posterior 180, 270 e 360 minutos pós-treino na tarefa de esquiva inibitória impediu a consolidação da memória de longa duração em ratos, testada 24 horas pós-treino por outro lado quando o inibidor seletivo das isoformas clássicas da PKC, Go 6976 foi infundido intra-CPP, inibiu a consolidação da memória de longa duração apenas quando infundido 270 e 360 min pós-treino. Estes resultados sugerem que as PKCs são necessárias nos tempos tardios da consolidação da memória de longa duração no córtex parietal posterior. Nesta região cerebral, as isoformas clássicas da PKC não são essenciais para a consolidação de memórias aversivas 180 minutos pós-treino, ao contrário das demais isoformas que parecem ser necessárias neste tempo, mostrando-se serem necessárias apenas 270 e 360 minutos pós-treino em EI.

Experimentos anteriores do nosso grupo mostraram que a infusão de AP5 (antagonista glutamatérgico) ou muscimol (agonista GABA A) no hipocampo e na

amígdala imediatamente pós-treino na esQUIVA inibitória produz amnésia retrógrada, enquanto que a infusão das mesmas drogas no córtex parietal posterior e no córtex entorrinal produz amnésia retrógrada somente quando infundidas 180 min pós-treino na tarefa de esQUIVA (IZQUIERDO et al., 1997b). Além disso, a infusão de inibidor de ERK (U0126) intra-CPP é amnésico somente 180 min e 360 min após o treino na tarefa de esQUIVA inibitória (ROSSATO et al., 2004). Os resultados aqui encontrados condizem com os demais trabalhos anteriores de nosso grupo, que sugerem que o córtex parietal posterior participa ativamente nos momentos mais tardios da consolidação das memórias aversivas (IZQUIERDO et al, 1992, 1997a,b; ZANATTA et al., 1997, ROSSATO et al., 2004). A infusão de CNQX (antagonista do receptor AMPA) na amígdala ou no hipocampo pré-teste realizado 24 horas pós-treino em EI, ou no córtex entorrinal pré-testes realizados 24 horas ou 31 dias pós-treino, ou ainda no córtex parietal pré-testes realizados 24 horas, 31 ou 60 dias pós-treino, resultou em prejuízo na evocação da memória aversiva em EI (IZQUIERDO & MEDINA, 1997). Estes dados sugerem que durante o armazenamento do traço mnemônico, o hipocampo e a amígdala seriam necessários primeiramente, seguido temporalmente pelas demais estruturas, sendo o córtex parietal um dos locais de armazenamento das informações a longo prazo (KESSNER, 2000; IZQUIERDO & MEDINA, 1997). Alguns modelos assumem que o córtex parietal participa ativamente do processo de armazenamento de memórias remotas (MAVIEL, et al., 2004).

Vimos então nos experimentos realizados nesta tese que as isoformas clássicas da PKC são requisitadas em várias etapas do processo de formação de memórias tanto espaciais quanto aversivas. No caso das aversivas, observamos também que as isoformas clássicas e não-clássicas da PKC em conjunto são requisitadas em diferentes estruturas cerebrais, em uma escala temporal própria para cada estrutura. A partir dos resultados

obtidos e do que se discutiu a partir destes, podemos chegar a várias conclusões, expostas a seguir, sobre as questões propostas neste trabalho visando possibilitar uma maior compreensão da participação da PKC no processamento de memórias durante várias etapas de sua formação e manutenção.

CAPÍTULO II
CONCLUSÃO

- 1) A inibição das isoformas clássicas da PKC na região CA1 do hipocampo dorsal 15 min pré-treino no LAM, piora a retenção da memória espacial de longa duração em ratos, testada 24 horas pós-treino, de maneira dose dependente.
- 2) A inibição das isoformas clássicas da PKC na região CA1 do hipocampo dorsal imediatamente após o treino inibe a consolidação da memória de longa duração de maneira dose dependente no LAM, quando testada 24 horas pós-treino;
- 3) A inibição das isoformas clássicas da PKC na região CA1 do hipocampo dorsal 30 ou 90 min pós-treino não interferiu na consolidação da memória de longa duração no LAM quando testada 24 horas pós-treino;
- 4) A inibição das isoformas clássicas da PKC na região CA1 do hipocampo dorsal imediatamente após o treino não interfere na consolidação da memória de curta duração no LAM quando testada 3 horas pós-treino;
- 5) A inibição das isoformas clássicas da PKC na região CA1 do hipocampo dorsal 15 min pré-treino inibe a evocação da memória espacial de longa duração no LAM quando testada 24 horas pós-treino;
- 6) A inibição das isoformas clássicas da PKC na região CA1 do hipocampo imediatamente após reativação sem reforço (24 horas pós-treino), inibe a reconsolidação de memória espacial de longa duração recente, avaliada 48 horas pós-treino;
- 7) A inibição das isoformas clássicas da PKC na região CA1 do hipocampo imediatamente após reativação sem reforço (120 horas pós-treino), inibe a reconsolidação de memória espacial de longa duração remota, avaliada 240 horas pós-treino;

- 8) A inibição das isoformas clássicas da PKC na região CA1 do hipocampo imediatamente após o treino do aprendizado reverso no LAM, não potencializa a extinção da memória de longa duração avaliada 24 horas após o treino do aprendizado reverso;
- 9) A inibição das isoformas clássicas da PKC na região CA1 do hipocampo dorsal 15 min pré-treino na versão não-espacial do LAM, não altera a aquisição da memória de longa duração em ratos, testada 24 horas pós-treino;
- 10) A inibição das isoformas clássicas da PKC na região CA1 do hipocampo dorsal imediatamente pós-treino na versão não-espacial do LAM, não impede a consolidação da memória de longa duração em ratos, testada 24 horas pós-treino;
- 11) A inibição das isoformas clássicas e não-clássicas da PKC (Novas e Atípicas) na amígdala basolateral imediatamente e 30 minutos pós-treino na tarefa de esquiva inibitória impede a consolidação da memória de longa duração em ratos, testada 24 horas pós-treino;
- 12) A inibição das isoformas clássicas da PKC no córtex parietal posterior 270 e 360 minutos pós-treino na tarefa de esquiva inibitória impede a consolidação da memória de longa duração em ratos, testada 24 horas pós-treino;
- 13) A inibição das isoformas não-clássicas da PKC (Novas e Atípicas) no córtex parietal posterior 180, 270 e 360 minutos pós-treino na tarefa de esquiva inibitória impede a consolidação da memória de longa duração em ratos, testada 24 horas pós-treino

BIBLIOGRAFIAS

ABELIOVICH A, PAYLOR R, CHEN C, KIM JJ, WEHNER JM, TONEGAWA S. PKC gamma mutant mice exhibit mild deficits in spatial and contextual learning. *Cell*. 1993 Dec 31;75(7):1263-71.

AKERS RF & ROUTTENBERG A. Calcium-promoted translocation of protein kinase C to synaptic membranes: relation to the phosphorylation of an endogenous substrate (protein F1) involved in synaptic plasticity. *J Neurosci*. 1987 Dec; 7 (12):3976-83.

AKERS RF, LOVINGER DM, COLLEY PA, LINDEN DJ, ROUTTENBERG A. Translocation of protein kinase C activity may mediate hippocampal long-term potentiation. *Science*. 1986 Feb 7;231(4738):587-9.

ALI, S.M., BULLOCK, S. AND ROSE, S.P.R Protein kinase C inhibitors prevent long-term memory formation in the one-day-old chick. *Neurosci. Res. Commun.* (1988) 3:133-140.

ANGENSTEIN F, RIEDEL G, REYMANN KG, STAAK S. Hippocampal long-term potentiation in vivo induces translocation of protein kinase C gamma. *Neuroreport*. 1994 Jan 12;5(4):381-4.

BARROS DM, IZQUIERDO LA, MEDINA JH, IZQUIERDO I. Pharmacological findings contribute to the understanding of the main physiological mechanisms of memory retrieval.

BARROS DM, IZQUIERDO LA, MEDINA JH, IZQUIERDO I. Pharmacological findings contribute to the understanding of the main physiological mechanisms of memory retrieval. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 2003 Apr; 2(2):81-94. Review.

BARROS DM, IZQUIERDO LA, MELLO E SOUZA T, ARDENGHI PG, PEREIRA P, MEDINA JH, IZQUIERDO I. Molecular signalling pathways in the cerebral cortex are required for retrieval of one-trial avoidance learning in rats. *Behav Brain Res*. 2000 Sep;114(1-2):183-92.

BARROS DM, IZQUIERDO LA, MELLO E SOUZA T, ARDENGHI PG, PEREIRA P, MEDINA JH, IZQUIERDO I. Molecular signalling pathways in the cerebral cortex are required for retrieval of one-trial avoidance learning in rats. *Behav Brain Res*. 2000 Sep;114(1-2):183-92.

BEAR MF. A synaptic basis for memory storage in the cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Nov 26;93(24):13453-9. Review.

BELDHUIS HJ, EVERTS HG, VAN DER ZEE EA, LUITEN PG, BOHUS B. Amygdala kindling-induced seizures selectively impair spatial memory. *Hippocampus*. 1992 Oct;2(4):397-409.

BERNABEU R, IZQUIERDO I, CAMMAROTA M, JERUSALINSKY D, MEDINA JH. Learning-specific, time-dependent increase in [3H]phorbol dibutyrate binding to protein kinase C in selected regions of the rat brain. *Brain Res*. 1995 Jul 10;685(1-2):163-8.

BIANCHIN M, MELLO E SOUZA T, MEDINA JH, IZQUIERDO I. The amygdala is involved in the modulation of long-term memory, but not in working or short-term memory. *Neurobiol Learn Mem.* 1999 Mar;71(2):127-31.

BLISS TV & LOMO T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path.

BLISS TVP & COLLINGRIDGE GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993; 361:31-39.

BRANDEIS R, BRANDYS Y, YEHUDA S. The use of the Morris Water Maze in the study of memory and learning. *Int J Neurosci.* 1989 Sep;48(1-2):29-69. Review.

CAMMAROTA M, BEVILAQUA LR, ARDENGHI P, PARATCHA G, LEVI DE STEIN M, IZQUIERDO I, MEDINA JH. Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade. *Brain Res Mol Brain Res.* 2000 Mar 10;76(1):36-46.

CAMMAROTA M, BEVILAQUA LR, KERR D, MEDINA JH, IZQUIERDO I. Inhibition of mRNA and protein synthesis in the CA1 region of the dorsal hippocampus blocks reinstatement of an extinguished conditioned fear response. *J Neurosci.* 2003 Feb 1;23(3):737-41.

CAMMAROTA M, PARATCHA G, LEVI DE STEIN M, BERNABEU R, IZQUIERDO I, MEDINA JH. B-50/GAP-43 phosphorylation and PKC activity are increased in rat hippocampal synaptosomal membranes after an inhibitory avoidance training. *Neurochem Res.* 1997 Apr;22(4):499-505.

CASABONA G. Intracellular signal modulation: a pivotal role for protein kinase C. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 1997 Apr;21(3):407-25. Review. PMID: 9153066 [PubMed - indexed for MEDLINE]

CASABONA G. Intracellular signal modulation: a pivotal role for protein kinase C. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 1997 Apr;21(3):407-25. Review.

CHEN HH, MA T, PAUL IA, SPENCER JL, HO IK. Developmental lead exposure and two-way active avoidance training alter the distribution of protein kinase C activity in the rat hippocampus. *Neurochem Res.* 1997a Sep;22(9):1119-25.

CHEN SJ, SWEATT JD, KLANN E. Enhanced phosphorylation of the postsynaptic protein kinase C substrate RC3/neurogranin during long-term potentiation. *Brain Res.* 1997b Feb 28;749(2):181-7

CHIBA AA, KESNER RP, JACKSON PA. Two forms of spatial memory: a double dissociation between the parietal cortex and the hippocampus in the rat. *Behav Neurosci.* 2002 Oct;116(5):874-83.

COLLEY PA & ROUTTENBERG A. Long-term potentiation as synaptic dialogue. *Brain Res Brain Res Rev.* 1993 Jan-Apr;18(1):115-22. Review.
Curr Drug Targets CNS Neurol Disord. 2003 Apr;2(2):81-94. Review.

DASH PK, MACH SA, BLUM S, MOORE AN. Intrahippocampal wortmannin infusion enhances long-term spatial and contextual memories. *Learn Mem.* 2002 Jul-Aug;9(4):167-77.

DERIEMER SA, STRONG JA, ALBERT KA, GREENGARD P, KACZMAREK LK. Enhancement of calcium current in *Aplysia* neurones by phorbol ester and protein kinase C. *Nature.* 1985 Jan 24-30;313(6000):313-6.

DUVARCI S, NADER K, LEDOUX JE. Activation of extracellular signal-regulated kinase- mitogen-activated protein kinase cascade in the amygdala is required for memory reconsolidation of auditory fear conditioning. *Eur J Neurosci.* 2005 Jan;21(1):283-9.

FARLEY J & AUERBACH S. Protein kinase C activation induces conductance changes in *Hermissenda* photoreceptors like those seen in associative learning. *Nature.* 1986 Jan 16-22;319(6050):220-3. Erratum in: *Nature* 1986 Dec 18-31;324(6098):702.

FERREIRA MB, DA SILVA RC, MEDINA JH, IZQUIERDO I. Late posttraining memory processing by entorhinal cortex: involvement of NMDA and GABAergic receptors. *Pharmacol Biochem Behav.* 1992a Apr;41(4):767-71.

FERREIRA MB, WOLFMAN C, WALZ R, DA SILVA RC, ZANATTA MS, MEDINA JH, IZQUIERDO I. NMDA-receptor-dependent, muscimol-sensitive role of the entorhinal cortex in post-training memory processing. *Behav Pharmacol.* 1992b Aug;3(4):387-391.

GALLAGHER M, BURWELL R, BURCHINAL M. Severity of spatial learning impairment in aging: development of a learning index for performance in the Morris water maze. *Behav Neurosci.* 1993 Aug;107(4):618-26.

GIANOTTI C, NUNZI MG, GISPEN WH, CORRADETTI R. Phosphorylation of the presynaptic protein B-50 (GAP-43) is increased during electrically induced long-term potentiation. *Neuron.* 1992 May;8(5):843-8.

GINTY DD, KORNHAUSER JM, THOMPSON MA, BADING H, MAYO KE, TAKAHASHI JS, GREENBERG ME. Regulation of CREB phosphorylation in the suprachiasmatic nucleus by light and a circadian clock. *Science.* 1993 Apr 9;260(5105):238-41.

GOLDMAN-RAKIC PS. Memory: recording experience in cells and circuits: diversity in memory research. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Nov 26;93(24):13435-7. Review.

GOODE N, HUGHES K, WOODGETT JR, PARKER PJ. Differential regulation of glycogen synthase kinase-3 beta by protein kinase C isoforms. *J Biol Chem.* 1992 Aug 25;267(24):16878-82.

GOOSENS KA, HOLT W, MAREN S. A role for amygdaloid PKA and PKC in the acquisition of long-term conditional fear memories in rats. *Behav Brain Res.* 2000 Sep;114(1-2):145-52.

GOULD TD & MANJI HK. Signaling networks in the pathophysiology and treatment of mood disorders. *J Psychosom Res.* 2002 Aug;53(2):687-97. Review.

HAGAN JJ, BOHUS B, DE WIED D. Post-training vasopressin injections may facilitate or delay shuttle-box avoidance extinction. *Behav Neural Biol.* 1982 Nov;36(3):211-28. No abstract available.

HU GY, HVALBY O, WALAAS SI, ALBERT KA, SKJEFLO P, ANDERSEN P, GREENGARD P. Protein kinase C injection into hippocampal pyramidal cells elicits features of long term potentiation. *Nature.* 1987 Jul 30-Aug 5;328(6129):426-9.

HUSSAIN RJ & CARPENTER DO. A comparison of the roles of protein kinase C in long-term potentiation in rat hippocampal areas CA1 and CA3. *Cell Mol Neurobiol.* 2005 Jun;25(3-4):649-61.

HYMAN IE JR & RUBIN DC. *Memorabilia*: a naturalistic study of long-term memory.

INDA MC, DELGADO-GARCIA JM, CARRION AM. Acquisition, consolidation, reconsolidation, and extinction of eyelid conditioning responses require de novo protein synthesis. *J Neurosci.* 2005 Feb 23;25(8):2070-80.

IZQUIERDO I & MCGAUGH JL Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. *Behav Pharmacol.* 2000 Nov;11(7-8):517-34. Review.

IZQUIERDO I & MEDINA JH. Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. *Neurobiol Learn Mem.* 1995 Jan;63(1):19-32

IZQUIERDO I, DA CUNHA C, ROSAT R, JERUSALINSKY D, FERREIRA MB, MEDINA JH. Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. *Behav Neural Biol.* 1992 Jul;58(1):16-26.

IZQUIERDO I & MEDINA JH. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem.* 1997a Nov;68(3):285-316. Review.

IZQUIERDO I, QUILLFELDT JA, ZANATTA MS, QUEVEDO J, SCHAEFFER E, SCHMITZ PK, MEDINA JH. Sequential role of hippocampus and amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats. *Eur J Neurosci.* 1997b Apr;9(4):786-93

IZQUIERDO, I. Different forms of post-training memory processing. *Behav Neural Biol.* 1989 Mar;51(2):171-202. Review.

IZQUIERDO, I. Memória. Artmed, Porto Alegre, 2002.

JERUSALINSKY D, QUILLFELDT JA, WALZ R, DA SILVA RC, MEDINA JH, IZQUIERDO I. Post-training intrahippocampal infusion of protein kinase C inhibitors causes amnesia in rats. *Behav Neural Biol.* 1994a Mar;61(2):107-9.

JERUSALINSKY D, QUILLFELDT JA, WALZ R, DA SILVA RC, MEDINA JH, IZQUIERDO I. Post-training intrahippocampal infusion of protein kinase C inhibitors causes amnesia in rats. *Behav Neural Biol.* 1994b Mar; 61(2):107-9.

KANDEL, 2000. Neuroscience: breaking down scientific barriers to the study of brain and mind. *Science.* 2000 Nov 10;290(5494):1113-20.

KAWASAKI Y, KOHNO T, ZHUANG ZY, BRENNER GJ, WANG H, VAN DER MEER C, BEFORT K, WOOLF CJ, JI RR. Ionotropic and metabotropic receptors, protein kinase A, protein kinase C, and Src contribute to C-fiber-induced ERK activation and cAMP response element-binding protein phosphorylation in dorsal horn neurons, leading to central sensitization. *J Neurosci.* 2004 Sep 22;24(38):8310-21.

KESSNER RP. Behavioral analysis of the contribution of the hippocampus and parietal cortex to the processing of information: interactions and dissociations. *Hippocampus.* 2000;10(4):483-90.

KIDA S, JOSSELYN SA, DE ORTIZ SP, KOGAN JH, CHEVERE I, MASUSHIGE S, SILVA AJ. CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. *Nat Neurosci.* 2002 Apr;5(4):348-55.

KISHIMOTO, A., TAKAI, Y., MORI, T., KIKKAWA, U. and NISHIZUKA, Y. (1980) Activation of calcium and phospholipid dependent protein kinase by diacylglycerol: its possible relation to phosphatidyl inositol turnover. *J. Biol. Chem.* -2 55: 2273-2276.

KLANN E, CHEN SJ, SWEATT JD. Mechanism of protein kinase C activation during the induction and maintenance of long-term potentiation probed using a selective peptide substrate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Sep 15;90(18):8337-41.

KNOWLTON BJ & SQUIRE LR. The information acquired during artificial grammar learning. *J Exp Psychol Learn Mem Cogn.* 1994 Jan;20(1):79-91.

KNOWLTON BJ, SQUIRE LR. The learning of categories: parallel brain systems for item memory and category knowledge. *Science.* 1993 Dec 10;262(5140):1747-9.

KOLCH W, HEIDECKER G, KOCHS G, HUMMEL R, VAHIDI H, MISCHAK H, FINKENZELLER G, MARME D, RAPP UR. Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature.* 1993 Jul 15;364(6434):249-52.

KOSE A, ITO A, SAITO N, TANAKA C. Electron microscopic localization of gamma- and beta II-subspecies of protein kinase C in rat hippocampus. *Brain Res.* 1990 Jun 4;518(1-2):209-17.

LATTAL KM & ABEL T. Behavioral impairments caused by injections of the protein synthesis inhibitor anisomycin after contextual retrieval reverse with time. : Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Mar 30;101(13):4667-72. Epub 2004

LIAO GY, WAGNER DA, HSU MH, LEONARD JP. Evidence for direct protein kinase-C mediated modulation of N-methyl-D-aspartate receptor current. Mol Pharmacol. 2001 May;59(5):960-4.

LYNCH G. Long-term potentiation in the Eocene. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2003 Apr 29;358(1432):625-8

MALENKA RC, KAUER JA, PERKEL DJ, MAUK MD, KELLY PT, NICOLL RA, WAXHAM MN. An essential role for postsynaptic calmodulin and protein kinase activity in long-term potentiation. Nature. 1989 Aug 17;340(6234):554-7.

MAREN S & BAUDRY M. Properties and mechanisms of long-term synaptic plasticity in the mammalian brain: relationships to learning and memory. Neurobiol Learn Mem. 1995 Jan;63(1):1-18. Review.

MAREN S. Long-term potentiation in the amygdala: a mechanism for emotional learning and memory. Trends Neurosci. 1999 Dec;22(12):561-7.

MARTIN GM, HARLEY CW, SMITH AR, HOYLES ES, HYNES CA. Spatial disorientation blocks reliable goal location on a plus maze but does not prevent goal location in the Morris maze. J Exp Psychol Anim Behav Process. 1996 Apr;23(2):183-93.

MATTHIES H JR, BEHNISCH T, KASE H, MATTHIES H, REYMANN KG. Differential effects of protein kinase inhibitors on pre-established long-term potentiation in rat hippocampal neurons in vitro. Neurosci Lett. 1991 Jan 2;121(1-2):259-62.

MAVIEL T, DURKIN TP, MENZAGHI F, BONTEMPI B. Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory. Science. 2004 Jul 2;305(5680):96-9.

MCDONALD AJ. Cortical pathways to the mammalian amygdala. Prog Neurobiol. 1998 Jun;55(3):257-332. Review.

MCDONALD BJ, CHUNG HJ, HUGANIR RL. Identification of protein kinase C phosphorylation sites within the AMPA receptor GluR2 subunit. Neuropharmacology. 2001 Nov;41(6):672-9.

MCGAUGH JL. Memory: a century of consolidation. Science. 2000 Jan 14;287(5451):248-51. Review Mem Cognit. 1990 Mar;18(2):205-14.

MISANIN JR, MILLER RR, LEWIS DJ. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. Science. 1968 May 3;160(827):554-5.

- MORGADO I. The psychobiology of learning and memory: fundamentals and recent advances. *Rev Neurol*. 2005 Mar 1-15;40(5):289-97. Review. Spanish.
- MORRIS R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*. 1984 May;11(1):47-60.
- MYERS KM & DAVIS M. Systems-level reconsolidation: reengagement of the hippocampus with memory reactivation. *Neuron*. 2002 Oct 24;36(3):340-3. Review.
- NADEL L & MOSCOVITCH M. Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex. *Curr Opin Neurobiol*. 1997 Apr;7(2):217-27. Review.
- NADER K, SCHAFE GE, LE DOUX JE. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):686-7.
- NISHIZUKA Y. Membrane phospholipid degradation and protein kinase C for cell signalling. *Neurosci Res*. 1992 Oct;15(1-2):3-5. Review. No abstract available.
- NISHIZUKA Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J*. 1995 Apr;9(7):484-96. Review.
- NOGUES X, JAFFARD R, MICHEAU J. Investigations on the role of hippocampal protein kinase C on memory processes: pharmacological approach. *Behav Brain Res*. 1996 Feb;75(1-2):139-46.
- NOGUES X, MICHEAU J, JAFFARD R. Protein kinase C activity in the hippocampus following spatial learning tasks in mice. *Hippocampus*. 1994 Feb;4(1):71-7.
- NOGUES X. Protein kinase C, learning and memory: a circular determinism between physiology and behaviour. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1997 Apr;21(3):507-29. Review
- OLDS JL & ALKON DL. A role for protein kinase C in associative learning. *New Biol*. 1991 Jan;3(1):27-35.
- OLDS, JL; ANDERSON ML, MCPHIE DL, STATEN LD, ALKON DL. Imaging of memory-specific changes in the distribution of protein kinase C in the hippocampus. In: *Science*. 1989 Aug 25;245(4920):866-9.
- OLDS, JL; GOLSKI, S; MCPHIE, DL; OLTON, D; MISHKIN, M; ALKON, DL. Discrimination learning alters the distribution of protein kinase C in the hippocampus of rats. *Journal of Neuroscience*. 1990 Nov; 10(11):3707-13.
- PARATCHA G, FURMAN M, BEVILAQUA L, CAMMAROTA M, VIANNA M, DE STEIN ML, IZQUIERDO I, MEDINA JH. Involvement of hippocampal PKC β 1 isoform in the early phase of memory formation of an inhibitory avoidance learning. *Brain Res*. 2000 Feb 14;855(2):199-205.

PASINELLI P, RAMAKERS GM, URBAN IJ, HENS JJ, OESTREICHER AB, DE GRAAN PN, GISPEN WH. Long-term potentiation and synaptic protein phosphorylation. *Behav Brain Res.* 1995 Jan 23;66(1-2):53-9. Review.

PAVLOV, I.P. Lectures on conditioned reflexes. Liveright, New York, 1928.

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

PAYLOR R, RUDY JW, WEHNER JM. Acute phorbol ester treatment improves spatial learning performance in rats. *Behav Brain Res.* 1991 Nov 26;45(2):189-93.

PITKANEN A, JOLKKONEN E, KEMPPAINEN S. Anatomic heterogeneity of the rat amygdaloid complex. *Folia Morphol (Warsz).* 2000;59(1):1-23. Review.

PRZYBYSLAWSKI J, SARA SJ. Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behav Brain Res.* 1997 Mar;84(1-2):241-6.

QUINTANA J & FUSTER JM. From perception to action: temporal integrative functions of prefrontal and parietal neurons. *Cereb Cortex.* 1999 Apr-May;9(3):213-21. Review.

RESCORLA RA. Retraining of extinguished Pavlovian stimuli. *J Exp Psychol Anim Behav Process.* 2001 Apr;27(2):115-24.

REYMANN KG, FREY U, JORK R, MATTHIES H. Polymyxin B, an inhibitor of protein kinase C, prevents the maintenance of synaptic long-term potentiation in hippocampal CA1 neurons. *Brain Res.* 1988 Feb 9;440(2):305-14.

ROBERSON D, DAVIDOFF J, BRAISBY N. Similarity and categorisation: neuropsychological evidence for a dissociation in explicit categorisation tasks. *Cognition.* 1999 May 3;71(1):1-42.

ROSSATO JI, BONINI JS, COITINHO AS, VIANNA MR, MEDINA JH, CAMMAROTA M, IZQUIERDO I. Retrograde amnesia induced by drugs acting on different molecular systems. *Behav Neurosci.* 2004 Jun;118(3):563-8.

ROUTTENBERG A & LOVINGER DM. Selective increase in phosphorylation of a 47-kDa protein (F1) directly related to long-term potentiation. *Behav Neural Biol.* 1985 Jan;43(1):3-11.

SACCHETTI & BIELAVSKA. Chelerythrine, a specific PKC inhibitor, blocks acquisition but not consolidation and retrieval of conditioned taste aversion in rat. *Brain Res.* 1998 Jul 13;799(1):84-90.

SACKTOR TC & SCHWARTZ JH. Sensitizing stimuli cause translocation of protein kinase C in Aplysia sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Mar;87(5):2036-9.

SAH P, LOPEZ DE ARMENTIA M. Excitatory synaptic transmission in the lateral and central amygdala. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Apr;985:67-77.

SARA SJ. Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. *Learn Mem.* 2000 Mar-Apr;7(2):73-84

SCHARENBERG AM, OLDS JL, SCHREURS BG, CRAIG AM, ALKON DL. Protein kinase C redistribution within CA3 stratum oriens during acquisition of nictitating membrane conditioning in the rabbit. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Aug 1;88(15):6637-41.

SCOVILLE WB & MILNER B Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1957 Feb;20(1):11-21

SQUIRE LR & ALVAREZ P. Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. *Curr Opin Neurobiol.* 1995 Apr;5(2):169-77.

SQUIRE LR & ZOLA-MORGAN S. The medial temporal lobe memory system. *Science.* 1991 Sep 20;253(5026):1380-6. Review.

SQUIRE, L.R.; KANDEL, E.R. *Memória: da mente às moléculas.* Artmed, Porto Alegre, 2003.

SQUIRE, L.R.; ZOLA, S.M. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93, 13515-13522, 1996

STEWART & MORRIS, *The watermaze In: Behavioural Neuroscience - A Practical Approach,* (Sahgal, A) Volume I Oxford University Press, New York, 1993.

SUNAYASHIKI-KUSUZAKI K, LESTER DS, SCHREURS BG, ALKON DL. Associative learning potentiates protein kinase C activation in synaptosomes of the rabbit hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 May 1;90(9):4286-9.

SUTTON MA, BAGNALL MW, SHARMA SK, SHOBE J, CAREW TJ. Intermediate-term memory for site-specific sensitization in aplysia is maintained by persistent activation of protein kinase C. *J Neurosci.* 2004 Apr 7;24(14):3600-9.

SZAPIRO G, IZQUIERDO LA, ALONSO M, BARROS D, PARATCHA G, ARDENGHI P, PEREIRA P, MEDINA JH, IZQUIERDO I. Participation of hippocampal metabotropic glutamate receptors, protein kinase A and mitogen-activated protein kinases in memory retrieval. *Neuroscience.* 2000;99(1):1-5.

TAKAI, Y., KISHIMOTO, A., IWASA, Y., KAWAHARA, Y., MORI, T., NISHIZUKA, Y., TAMURA, A; FUJII, T. (1979b) A role of membranes in the activation of a new multifunctional protein kinase system. *J. Biochem.* 86: 575-578.

TAKAI, Y., KISHIMOTO, A., KIKKAWA, U., MORI, T. and NISHIZUKA, Y. (1979a) Unsaturated diacylglycerol as a possible messenger for the activation of calcium-activated, phospholipiddependent protein kinase system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91: 1218-1224.

TAKAI, Y., YAMAMOTO, M., INOUE, M., KISHIMOTO, A., NISHIZUKA, Y. (1977) A proenzyme of cyclic nucleotide-independent protein kinase and its activation by calcium-dependent neutral protease from rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* II: 542-550.

TANAKA C & SAITO N. Localization of subspecies of protein kinase C in the mammalian central nervous system. *Neurochem Int.* 1992 Dec;21(4):499-512. Review

THOMAS KL, LAROCHE S, ERRINGTON ML, BLISS TV, HUNT SP. Spatial and temporal changes in signal transduction pathways during LTP. *Neuron.* 1994 Sep;13(3):737-45.

TRONSON NC, WISEMAN SL, OLAUSSON P, TAYLOR JR. Bidirectional behavioral plasticity of memory reconsolidation depends on amygdalar protein kinase A. *Nat Neurosci.* 2006 Feb;9(2):167-169.

VAN DER ZEE EA & DOUMA BR Historical review of research on protein kinase C in learning and memory. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 1997 Apr;21(3):379-406. Review.

VIANNA MR, BARROS DM, SILVA T, CHOI H, MADCHE C, RODRIGUES C, MEDINA JH, IZQUIERDO I. Pharmacological demonstration of the differential involvement of protein kinase C isoforms in short- and long-term memory formation and retrieval of one-trial avoidance in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 2000 May;150(1):77-84.

WEEBER EJ, ATKINS CM, SELCHER JC, VARGA AW, MIRNIKJOO B, PAYLOR R, LEITGES M, SWEATT JD. A role for the beta isoform of protein kinase C in fear conditioning. *J Neurosci.* 2000 Aug 15;20(16):5906-14.

WU J, HUANG KP, HUANG FL. Participation of NMDA-mediated phosphorylation and oxidation of neurogranin in the regulation of Ca²⁺- and Ca²⁺/calmodulin-dependent neuronal signaling in the hippocampus. *J Neurochem.* 2003 Sep;86(6):1524-33.

YANG HW, HU XD, ZHANG HM, XIN WJ, LI MT, ZHANG T, ZHOU LJ, LIU XG. Roles of CaMKII, PKA, and PKC in the induction and maintenance of LTP of C-fiber-evoked field potentials in rat spinal dorsal horn. *J Neurophysiol.* 2004 Mar;91(3):1122-33.

YIN JC & TULLY T. CREB and the formation of long-term memory. *Curr Opin Neurobiol.* 1996 Apr;6(2):264-8. Review.

YOSHIMURA M & COOPER DM. Type-specific stimulation of adenylylcyclase by protein kinase C. *J Biol Chem.* 1993 Mar 5;268(7):4604-7.

ZANATTA MS, QUILLFELDT JH, SCHAEFFER E, SCHMITZ PK, QUEVEDO J, MEDINA JH, IZQUIERDO I. Involvement of the hippocampus, amygdala, entorhinal cortex and posterior parietal cortex in memory consolidation. *Braz J Med Biol Res.* 1997 Feb;30(2):235-40.

ARTIGO CIENTÍFICO

A parte dos resultados apresentados nesta Tese de Doutorado referentes ao paradigma de esquiva inibitória estão publicados na revista *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 80 (2005) 63–67, conforme segue abaixo, enquanto que a parte dos resultados referente ao paradigma do labirinto aquático de Morris está para ser submetida em breve.

Juliana S. Bonini, Martín Cammarota, Daniel S. Kerr, Lia R.M. Bevilaqua, Iván Izquierdo. **Inhibition of PKC in basolateral amygdala and posterior parietal cortex impairs consolidation of inhibitory avoidance memory.** *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 80 (2005) 63–67.

ANEXO

Inhibition of PKC in basolateral amygdala and posterior parietal cortex impairs consolidation of inhibitory avoidance memory

Juliana S. Bonini, Martín Cammarota, Daniel S. Kerr, Lia R.M. Bevilaqua, Iván Izquierdo*

Center for Memory Research, ICBS, Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Ramiro Barcelos 2600-Anexo, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil

Memory Research Laboratory, Institute for Cell Biology and Neuroscience "Prof. Dr. Eduardo de Robertis", School of Medicine, University of Buenos Aires, Paraguay 2155 3° Floor, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, CP 1121, Argentina

Received 12 July 2004; received in revised form 15 October 2004; accepted 15 October 2004
Available online 14 November 2004

Abstract

Hippocampal α - and β I/ β II protein kinase C (PKC) are crucial for the formation of different types of memory in several species, including that for a one trial inhibitory avoidance (IA) task in rats. Many studies, however, have shown that other brain structures besides the hippocampus, notably the basolateral amygdala (BLA) and posterior parietal cortex (PC) are also necessary for memory consolidation. Here, we examine the role of α - and β I/ β II PKC in the BLA and PC on the consolidation of the memory for IA in rats. The selective inhibitor of α - and β I/ β II-PKC Gö 6976 and the nonselective PKC inhibitor Gö 7874 were administered into these structures at different times after training at concentrations known to inhibit PKC and to produce retrograde amnesia when given into the hippocampus. Gö 7874 blocked consolidation of IA memory when infused into BLA immediately and 30 min or into PC 180 to 360 min posttraining. Gö 6976 caused amnesia when given into the BLA also immediately or 30 min posttraining but in the PC hindered memory retention only when infused 270 and 360 min after the training session. Our data indicate that α - and β I/ β II-PKC are critical for consolidation of IA memory shortly after training in BLA and that, first other isoforms and subsequently the α - and β I/ β II PKC are required 3 or more hours after training in the PC. The findings on BLA are similar to those previously reported in the hippocampus, but those on PC suggest an entirely different molecular dynamics for memory formation in that area. © 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Memory; Learning; Inhibitory avoidance; PKC; Parietal cortex; Amygdala

1. Introduction

Protein kinase C (PKC) is a family of phospholipid-dependent kinases (Nishizuka, 1995) that regulate synaptic transmission and neuronal function at various levels, including neurotransmitter release (Malenka et al., 1986; Majewski and Iannazzo, 1998), membrane properties (Hoffman and Johnston, 1998; Manseau et al., 1998), receptor functionality (Macek et al., 1998; Suen et al., 1998), gene expression (Routtenberg et al., 2000), and the early stages of

hippocampal long-term potentiation (LTP) (Abeliovich et al., 1993; Ben-Ari et al., 1992). Molecular cloning studies have revealed the existence of at least 12 isozymes of PKC, which are divided into calcium-dependent conventional (α , β I, β II and γ isozymes) and calcium-independent subfamilies. PKC isoforms are differentially distributed in brain cells and are also differently activated by second messengers. It is generally assumed that intracellular calcium mobilization and stimulation of phospholipid turnover promote the translocation and activation of PKC. A key role for PKC in memory consolidation has been envisaged since the pioneering work of Routtenberg et al. (see Routtenberg et al., 2000 for references). Activation of PKC following learning (Farley and Auerbach, 1986; Sunayashiki-Kusuzaki et al., 1993; Bernabeu et al., 1995; Cammarota et al., 1997; Van der Zee et al., 1997a,b;

* Corresponding author. Center for Memory Research, ICBS, Department of Biochemistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Ramiro Barcelos 2600-Anexo, Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil. Tel.: +55 51 3316 5530; fax: +55 51 3316 5535.

E-mail address: izquier@terra.com.br (I. Izquierdo).

Paratcha et al., 2000), as well as translocation of the enzyme to the membrane (Routtenberg et al., 2000), has been described. The isoforms involved include PKC α and β I/ β II (Paratcha et al., 2000), which are mostly postsynaptic, and γ (Abeliovich et al., 1993; Routtenberg et al., 2000), which is also presynaptic (Tang et al., 2004; Van der Zee et al., 1997a). Bilateral inhibition of hippocampal PKC by the nonspecific inhibitors staurosporin and CGP 41231 in the first 1–2 h after training causes retrograde amnesia for step-down inhibitory avoidance (IA) memory (Jerusalinsky et al., 1994); in addition, the selective PKC α / β I inhibitor Gö 6976 and the non-isoform selective PKC inhibitor Gö 7874 block consolidation of the memory for the IA task when infused into the dorsal CA1 region at the time of training or up to 110 min later (Vianna et al., 2000).

It has been shown that consolidation of IA memory requires other cerebral regions besides the hippocampus, including the basolateral amygdala (BLA) and the posterior parietal cortex (PC; Bonini et al., 2003; Lorenzini et al., 1996; Rosatto et al., 2004). The same happens in several other simple paradigms, including fear conditioning and spatial learning tasks (Bontempi et al., 1999; Frankland et al., 2004; Maviel et al., 2004). This has been established through pharmacological manipulations, inactivation and diverse biochemical techniques. The dynamics of the participation of different types of glutamate receptors or of the ERK subfamily of mitogen-activated protein kinases is different in each of these brain regions. This indicates that they are all necessary for memory consolidation, but each uses a different sequence of molecular mechanisms for that. The sequences of molecular events used by all structures studied except the hippocampus is not analogous to that of LTP (Rosatto et al., 2004).

Here, we examine the effect of infusion in the BLA and PC of the general PKC inhibitor Gö7874 and of the selective inhibitor of α - and β I/ β II-PKC, Gö 6976 at various times after training, on memory consolidation of one-trial avoidance in rats.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male Wistar rats (3 months of age, 250–280 g of weight) from our own breeding stock were used. The animals were housed in plastic cages under a 12 h light/dark cycle (lights on at 7:00 AM), with water and Purina lab chow freely available and at a constant temperature of 23 °C. To deliver the pharmacological agents to be tested, rats were bilaterally implanted under deep thionembutal anesthesia with 27-gauge guides aimed 1.0 mm above the lower border of the basolateral amygdala nucleus or to the posterior parietal cortex, in accordance with coordinates (A -4.2 , L ± 3.0 , V 1.4 and A -2.8 , L ± 5.0 , V 2, respectively) taken from the atlas of Paxinos and Watson (2000). Animals were allowed

to recover for 4 days before submitting them to any other procedure. In all experiments, the “Principles of laboratory animal care” (NIH publication No. 85-23, revised 1996) were strictly followed.

2.2. Inhibitory avoidance training

After recovery from surgery, rats were trained in a one trial, step-down, inhibitory avoidance task, a fear motivated learning paradigm much used for the pharmacological and biochemical analysis of memory (Bevilaqua et al., 1999, 2003; Cammarota et al., 2000, 2003, 2004). In order to do that, animals were gently put on a 2.5-cm-high, 7.0-cm-wide wood platform placed inside and at the leftmost extreme of a 50×25×25 cm acrylic training box whose floor was made of a grid of parallel bronze bars. At the very moment, the animal stepped down from the platform and put its four paws on the grid, it received a 0.5-mA, 2-s scrambled footshock. After that, it was immediately removed from the training box. At the time of drug delivery, a 30-gauge cannula was tightly fitted into the implanted guide with its tip protruding 1.0 mm beyond that of the guide. The infusion cannula was linked by an acrylic tube to a microsyringe and infusions (0.5 μ l/side) were carried out over 60 s, first on the right and then on the left side; the 30-gauge cannula was left in place for 30 additional seconds to minimize backflow. Drugs (Gö 6976, 4.6 nM and Gö 7874, 8.0 nM) were obtained from Calbiochem (La Jolla, CA, USA) and dissolved in 2% DMSO. These concentrations have been previously found to inhibit α - and β I/ β II-PKC and all PKC activity by 90%, respectively, and to cause retrograde amnesia for the memory associated with the IA task when given into the hippocampus (Paratcha et al., 2000; Vianna et al., 2000). To evaluate memory retention, latency to step down onto the grid during the training session was compared to that obtained in a test session performed 24 h later. In the test session, the procedure was identical to that used during training except that the electric footshock was omitted. Cannula placement was verified postmortem by an experimenter blind to the behavioral data as described previously (Bonini et al., 2003). Briefly, 2–4 h after the behavioral test, 0.5 μ l of a 4% methylene blue solution was infused as described above and the extension of the dye 30 min thereafter was taken as indicative of the presumable diffusion of the vehicle or drug previously given to each animal. Infusions spread with a radius of less than 1 mm, as described before (Bonini et al., 2003) and were found to be correct (i.e., the cannulas were in the intended sites and diffusion of the dye was equal or less than 1 mm³) in 97% of the animals. This will not be illustrated here since the extension of the infusions was exactly as in many previous papers from our laboratories and as that of experiments using radio-labeled compounds and as that of experiments using radio-labeled compounds of molecular weight comparable to those used here (Martin, 1991). Data were analyzed using non-parametric statistics due to the introduction of a ceiling of 180 s in the duration of the retention test session.

3. Results

Fig. 1 shows the effect of Gö 6976 (4.6 nM) and Gö 7874 (8.0 nM) given bilaterally into BLA either immediately (0 min), or 30, 90, 180, 270 or 360 min after IA training on retention test latency as measured 24 h posttraining. Retrograde amnesia was observed in the animals that received the drugs either immediately or 30 min posttraining in the BLA. Drug infusions at later times were ineffective. Fig. 2 shows the effect of the same doses of the two PKC inhibitors given bilaterally into the PC at 0, 30, 90, 180, 270 or 360 min after training. Gö 6976 blocked memory consolidation when infused in the PC 270 or 360 min posttraining, but not at earlier times. Gö 7874 had a similar effect but in addition was also amnesic when given 180 min after training.

4. Discussion

The present findings illustrate the need for α - and β I/ β II-PKC activity in BLA and PC at different times: in the first half-hour after training in the BLA, and 4.5–6.0 h after training in the PC. In addition, other PKCs besides the α - and β I/ β II isoforms are necessary for consolidation at 180 min from training in the PC in order for memory consolidation to take place. This differs from earlier observations on the need for hippocampal PKC isoforms in the hippocampus. In that structure α - and β I/ β II-PKC, and perhaps also other isoforms of the enzyme (Jerusalinsky et al., 1994; Vianna et al., 2000) are required for consolidation between the time of training and 110 min later, but not beyond that. This further exemplifies two facts concerning the physiology of memory consolidation that

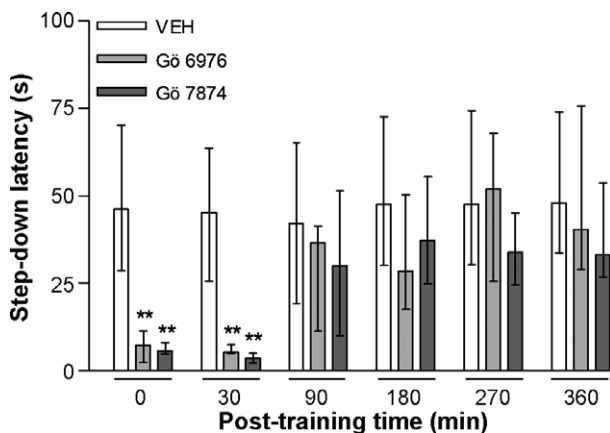


Fig. 1. Infusion of Gö 6976 or Gö 7874 into the basolateral amygdala impairs consolidation of inhibitory avoidance (IA) memory. Gö 6976 or Gö 7874 (4.6 and 8 nM, respectively) were bilaterally infused (0.5 μ l) into the basolateral amygdala at different times after IA training. Bars represent median (\pm interquartile range) of the step-down latencies measured in a memory retention test session carried out 24 h after training. $n=12$ –17 per group. * $p<0.05$ and ** $p<0.01$ vs. vehicle (VEH) in Dunn's comparison after Kruskal–Wallis test.

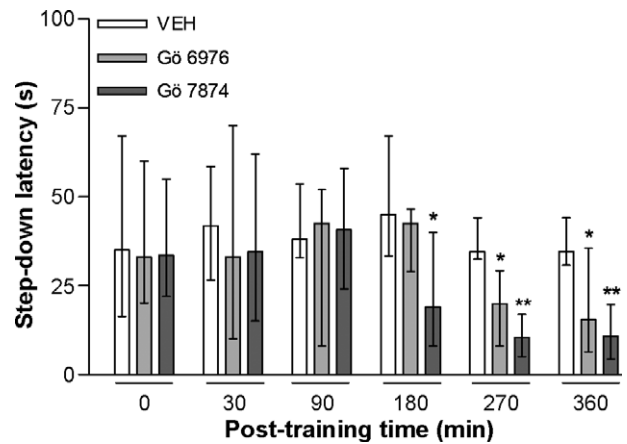


Fig. 2. Infusion of Gö 6976 or Gö 7874 into posterior parietal cortex impairs consolidation of inhibitory avoidance (IA) memory. Gö 6976 or Gö 7874 (4.6 and 8 nM, respectively) were bilaterally infused (0.5 μ l) into the posterior parietal cortex at different times after IA training. Bars represent median (\pm interquartile range) of the step-down latencies measured in a memory retention test session carried out 24 h after training. $n=11$ –16 per group. * $p<0.05$ and ** $p<0.01$ vs. vehicle (VEH) in Dunn's comparison after Kruskal–Wallis test.

have been overlooked by most of the literature in the field. As stated in the Introduction, a large number of techniques have shown quite unequivocally that, in many tasks, memory consolidation requires the BLA, PC and several other neocortical regions. The techniques involve pharmacological (Bonini et al., 2003; Rosatto et al., 2004), biochemical (Bernabeu et al., 1995; Frankland et al., 2004), brain imaging (Maviel et al., 2004), reversible inactivation experiments (Lorenzini et al., 1996), regional brain deoxyglucose uptake (Bontempi et al., 1999) and many others, applied both to IA and to other simple tasks. Much of the literature purporting to show that one or other region is necessary for consolidation relies on old lesion studies, which failed to analyze lesions in other brain areas (Izquierdo and Medina, 1997) and suffered from the fact that a retrieval effect could never be ruled out since the lesions are also present at the time of retrieval (Bontempi et al., 1999). In contrast, pharmacological, biochemical, reversible inactivation, glucose uptake and image techniques are applied at specific times after training and prior to retrieval and thus permit a clear distinction both between early and late phases of consolidation and between consolidation and retrieval.

The role of α - and β I/-PKC in hippocampus (Vianna et al., 2000), BLA and PC (Figs. 1 and 2) during IA memory consolidation, does not imply that other PKC isoforms are not important for this process. Mice with lacking γ -PKC are deficient both in spatial learning tasks that require the hippocampus and in hippocampal LTP (Abeliovich et al., 1993). Both membrane-bound total PKC activity and phosphorylation of the presynaptic substrate of γ -PKC, B50/GAP 43 (Routtenberg et al., 2000; Zhao et al., 1995) increase after one-trial avoidance with a peak at 30 min posttraining (Cammarota et al., 1997). The posttraining

increase of hippocampal PKC activity is largely restricted to α and $\beta I/\beta II$ PKC isoforms (Paratcha et al., 2000); but the phosphorylation of GAP43 suggests the additional activation of a presynaptic form of PKC, presumably PKC γ .

In conclusion, the present findings further illustrate the participation of more than one PKC isoforms during the consolidation process at different times after training. Like in the hippocampus (Paratcha et al., 2000; Vianna et al., 2000), α and $\beta I/\beta II$ PKCs are crucial for consolidation early after training in the BLA. In contrast, in the PC, other PKC isozymes are crucial for consolidation 3 h after training, and α and $\beta I/\beta II$ -PKC is required 4.5 and 6 h after training. Clearly, the consolidation of inhibitory avoidance learning requires several brain structures acting in a concerted fashion (Izquierdo and Medina, 1997). It is definitely not a one-structure task using an LTP-like process (Rosatto et al., 2004).

Acknowledgements

This work was supported by grants from CNPq, CAPES and FAPERGS, Brazil and ANPCyT and CONICET, Argentina.

References

- Abeliovich A, Chen C, Goda Y, Silva AJ, Stevens CF, Tonegawa S. 93 Modified hippocampal long-term potentiation in PKC gamma-mutant mice. *Cell* 1993;75:1253–62.
- Ben-Ari Y, Aniksztejn L, Bregestovski P. Protein kinase C modulation of NMDA currents: an important link for LTP induction. *Trends Neurosci* 1992;15:333–9.
- Bernabeu R, Izquierdo I, Cammarota M, Jerusalinsky D, Medina JH. Learning-specific, time-dependent increase in [3H]phorbol dibutyrate binding to protein kinase C in selected regions of the rat brain. *Brain Res* 1995;685:163–8.
- Bevilaqua LR, Cammarota M, Paratcha G, de Stein ML, Izquierdo I, Medina JH. Experience-dependent increase in cAMP-responsive element binding protein in synaptic and nonsynaptic mitochondria of the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 1999;11:3753–6.
- Bevilaqua LR, Kerr DS, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. Inhibition of hippocampal Jun N-terminal kinase enhances short-term memory but blocks long-term memory formation and retrieval of an inhibitory avoidance task. *Eur J Neurosci* 2003;17:897–902.
- Bonini JS, Rodrigues L, Kerr DS, Bevilaqua LR, Cammarota M, Izquierdo I. AMPA/kainate and group-I metabotropic receptor antagonists infused into different brain areas impair memory formation of inhibitory avoidance in rats. *Behav Pharmacol* 2003;14:161–6.
- Bontempi B, Laurent-Demir C, Destrade C, Jaffard R. Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. *Nature* 1999;400:671–5.
- Cammarota M, Paratcha G, Levi de Stein M, Bernabeu R, Izquierdo I, Medina JH. B-50/GAP-43 phosphorylation and PKC activity are increased in rat hippocampal synaptosomal membranes after an inhibitory avoidance training. *Neurochem Res* 1997;22:499–505.
- Cammarota M, Bevilaqua LR, Ardenghi P, Paratcha G, Levi de Stein M, Izquierdo I, et al. Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade. *Mol Brain Res* 2000;76:36–46.
- Cammarota M, Bevilaqua LR, Kerr D, Medina JH, Izquierdo I. Inhibition of mRNA and protein synthesis in the CA1 region of the dorsal hippocampus blocks reinstatement of an extinguished conditioned fear response. *J Neurosci* 2003;23:737–41.
- Cammarota M, Bevilaqua LR, Medina JH, Izquierdo I. Retrieval does not induce reconsolidation of inhibitory avoidance memory. *Learn Mem* 2004;11:572–8.
- Farley J, Auerbach S. Protein kinase C activation induces conductance changes in Hermissenda photoreceptors like those seen in associative learning. *Nature* 1986;319:220–3.
- Frankland PW, Bontempi B, Tolton LE, Kaczmarek L, Silva AJ. The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science* 2004;304:829–30.
- Hoffman DA, Johnston D. Downregulation of transient K⁺ channels in dendrites of hippocampal CA1 pyramidal neurons by activation of PKA and PKC. *J Neurosci* 1998;18:3521–8.
- Izquierdo I, Medina JH. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem* 1997;68:285–316.
- Jerusalinsky D, Quillfeldt JA, Walz R, Da Silva RC, Medina JH, Izquierdo I. Post-training intrahippocampal infusion of protein kinase C inhibitors causes amnesia in rats. *Behav Neural Biol* 1994;61:107–9.
- Lorenzini CA, Baldi E, Bucherelli C, Tassoni G. Amnesic effects of preacquisition, postacquisition, or preretrieval tetrodotoxin administration into the medial septal area on rat's passive avoidance memorization. *Neurobiol Learn Mem* 1996;66:80–4.
- Macek TA, Schaffhauser H, Conn PJ. Protein kinase C and A3 adenosine receptor activation inhibit presynaptic metabotropic glutamate receptor (mGluR) function and uncouple mGluRs from GTP-binding proteins. *J Neurosci* 1998;18:6138–46.
- Majewski H, Iannazzo L. Protein kinase C: a physiological mediator of enhanced transmitter output. *Prog Neurobiol* 1998;55:463–75.
- Malenka RC, Madison DV, Nicoll RA. Potentiation of synaptic transmission in the hippocampus by phorbol esters. *Nature* 1986;321:175–7.
- Manseau F, Sossin WS, Castellucci VF. Long-term changes in excitability induced by protein kinase C activation in Aplysia sensory neurons. *J Neurophysiol* 1998;79:1210–8.
- Martin JH. Autoradiographic matching of the extent of reversible inactivation produced by microinjection of lidocaine and muscimol in the rat. *Neurosci Lett* 1991;127:160–4.
- Maviel T, Durkin TP, Menzaghi F, Bontempi B. Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory. *Science* 2004;305:96–9.
- Nishizuka Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J* 1995;9:484–96.
- Paratcha G, Furman M, Bevilaqua L, Cammarota M, Vianna M, de Stein ML, et al. Involvement of hippocampal PKC beta1 isoform in the early phase of memory formation of an inhibitory avoidance learning. *Brain Res* 2000;855:199–205.
- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press; 2000.
- Rosatto JI, Bonini JS, Coitinho A, Vianna MR, Medina JH, Cammarota M, et al. Retrograde amnesia induced by drugs acting on different molecular systems. *Behav Neurosci* 2004;118:563–8.
- Routtenberg A, Cantalops I, Zaffuto S, Serrano P, Namgung U. Enhanced learning after genetic overexpression of a brain growth protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:7657–62.
- Suen PK, Wu K, Xu JL, Lin SY, Levine ES, Black IB. NMDA receptor subunits in the postsynaptic density of rat brain: expression and phosphorylation by endogenous protein kinases. *Mol Brain Res* 1998; 59:215–28.
- Sunayashiki-Kusuzaki K, Lester DS, Schreurs BG, Alkon DL. Associative learning potentiates protein kinase C activation in synaptosomes of the rabbit hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:4286–9.
- Tang FR, Lee WL, Gao H, Chen Y, Loh YT, Chia SC. Expression of different isoforms of protein kinase C in the rat hippocampus after pilocarpine-induced status epilepticus with special reference to CA1 area and the dentate gyrus. *Hippocampus* 2004;14:87–98.

- Van der Zee EA, Luiten PG, Disterhoft JF. Learning-induced alterations in hippocampal PKC-immunoreactivity: a review and hypothesis of its functional significance. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1997a;21:531–72.
- Van der Zee EA, Kronforst-Collins MA, Maizels ET, Hunzicker-Dunn M, Disterhoft JF. Gamma isoform-selective changes in PKC immunoreactivity after trace eyeblink conditioning in the rabbit hippocampus. *Hippocampus* 1997b;7:271–85.
- Vianna MR, Barros DM, Silva T, Choi H, Madche C, Rodrigues C, et al. Pharmacological demonstration of the differential involvement of protein kinase C isoforms in short-and long-term memory formation and retrieval of one-trial avoidance in rats. *Psychopharmacology* 2000; 150:77–84.
- Zhao WQ, Polya GM, Wang BH, Gibbs ME, Sedman GL, Ng KT. Inhibitors of cAMP-dependent protein kinase impair long-term memory formation in day-old chicks. *Neurobiol Learn Mem* 1995;64:106–18.