



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO NEUROCIÊNCIAS**

**BRUNO POPIK**

**O PAPEL CENTRAL DA CALPAÍNA NA CONSOLIDAÇÃO, EVOCAÇÃO E  
RECONSOLIDAÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS**

**Porto Alegre – RS**

**2018**

**BRUNO POPIK**

**O PAPEL CENTRAL DA CALPAÍNA NA CONSOLIDAÇÃO, EVOCAÇÃO E  
RECONSOLIDAÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS**

**Dissertação a ser apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Neurociências da Universidade Federal  
do Rio Grande do Sul – UFRGS, como  
pré-requisito para obtenção do título de  
Mestre em Neurociências.**

**Orientador: Lucas de Oliveira Álvares**

**Porto Alegre – RS**

**2018**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao meu orientador, Lucas de Oliveira Alvares, por ter exercido o verdadeiro papel de orientador, orientar. Agradeço acima de tudo a liberdade de pensar e executar as minhas ideias, e claro as suas contribuições para executar todas ou quase todas elas. Agradeço muito a paciência dele ao longo desses dois anos que me aceitou orientar.

Agradeço aos meus amigos e colegas de laboratório que ajudaram na execução tanto prática como teórica desse trabalho, e claro, pelas inúmeras risadas e bons momentos passados tanto dentro como fora do laboratório, um agradecimento especial para a Kami, a Ana Crestani, o Mateus, a Mirelle, a Ana Menegola, a Kétlyn, a Rossana, o Jadier, a Bruna e a Laura. Caso tenha esquecido alguém, desculpe minha falha de memória. Enfim ao grupo LNM, que está se construindo e se fortalecendo como ponto de referência na área de memória.

À Dona Zelma, que sempre será a mãe do laboratório.

A todos os professores do PPG pelas conversas e pelas disciplinas lecionadas que foram essenciais para a minha formação, tanto como cientista e como pessoa.

Aos meus pais que sempre me apoiaram e acreditaram que alcançaria mais esta etapa da minha vida.

À minha irmã favorita, que sempre me apoiou e sempre teve tempo para uma conversa.

Aos meus amigos e companheiros de apartamento, Tiago e William, por várias conversas e momentos descontraídos que tornaram Porto Alegre mais habitável.

E por fim, minha namorada, Suellen, muito obrigado por me aguentar mais essa etapa, estando sempre presente e me ajudando sempre a ser uma pessoa e cientista melhor. Um agradecimento imensurável a minha companheira.

*“Theory without data is fantasy, but data without theory is chaos”*

LAWLER, E. 1971

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS .....	v
LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO.....	v
LISTA DE GRÁFICOS DO ARTIGO .....	v
LISTA DE FIGURAS DO MATERIAL SUPLEMENTAR .....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	vii
RESUMO .....	7
ABSTRACT .....	8
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
1.1 MEMÓRIA .....	9
1.2 DURAÇÃO DA MEMÓRIA.....	10
1.3 ESTRUTURA ENCEFÁLICA .....	11
1.3.1 Tarefa comportamental .....	12
1.4 POTENCIAÇÃO E DEPRESSÃO DE LONGA DURAÇÃO.....	13
1.5 ESPINHOS DENDRÍTICOS.....	13
1.6 RECEPTORES GLUTAMATERGICOS .....	15
1.7 CARACTERIZAÇÃO DAS CALPAÍNAS.....	16
1.8 PAPEL FISIOLÓGICO DA CALPAÍNA .....	18
2 HIPÓTESE .....	19
3 OBJETIVOS GERAIS .....	20
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
4 RESULTADOS .....	20
4.1 ARTIGO CIENTÍFICO .....	20
5 CONCLUSÃO.....	41
6 FIGURAS SUPLEMENTARES .....	42
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	44
8 ANEXO .....	50
8.1. Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA .....	50

## LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

### LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO

**Figura 1.** Desenho esquemático das fases da consolidação da memória (McGaugh, 2000). 11

---

**Figura 2.** Desenho esquemático do hipocampo de ratos *Wistar* em corte coronal. Representação da formação hipocampal (giro denteado e Corno de Amon - CA, subdividido nas regiões CA1, CA2 e CA3 e das suas principais conexões. Representando a via trissináptica do hipocampo (adaptado de Deng et al, 2010). 12

---

**Figura 3.** Desenho esquemático de um espinho dendrítico e as consequências da LTP e LTD no mesmo (adaptado de Levy, 2014). 13

---

**Figura 4.** Desenho esquemático das diferentes morfologias do espinho dendrítico, bem como uma fotomicrografia de cada morfologia (adaptado de Maite 2015). 14

---

### LISTA DE GRÁFICOS DO ARTIGO

**Figure 1.** *Memory consolidation requires calpain activity* 28

---

**Figure 2.** *Calpain inhibition after training is time-dependent* 29

---

**Figure 3.** *Calpain controls fear memory retrieval* 31

---

**Figure 4.** *Calpain inhibition impairs memory reconsolidation* 32

---

## LISTA DE FIGURAS DO MATERIAL SUPLEMENTAR

<b>Figura 1.</b> Infusões do antagonista das calpaínas fora do hipocampo dorsal.	41
<hr/>	
<b>Figura 2.</b> Representação histológica da localização das infusões do antagonista no <i>Striatum</i> – CPu.	42
<hr/>	
<b>Figura 3.</b> Representação histológica da localização das infusões do antagonista no Córtex Retrosplenial – RSC.	42
<hr/>	
<b>Figura 4.</b> Representação histológica da localização das infusões do antagonista no hipocampo dorsal.	43
<hr/>	

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ácido-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propiónico	AMPA
N-metil-D-aspartato	NMDA
Long Term Memory	LTM
Short Term Memory	STM
Corno de Amon	CA1, CA2 e CA3
Condicionamento aversivo contextual	CAC
Conditioned stimulus	CS
Unconditioned stimulus	US
Long Term Potentiation	LTP
Long Term Depression	LTD
Cálcio	Ca <sup>2+</sup>
Calcium-activated neutral protease	CANP
Micromolaridade	μM
Milimolar	mM
Synapse-associated protein 97	SAP-97
Glutamate-receptor-interacting protein	GRIP1
Universidade Federal do Rio Grande do Sul	UFRGS
Postsynaptic density	PSD
Conditioned place preference	CPP
Graus Celsius	°C
Miligrama	mg
Quilograma	Kg
Nanograma	ng
Milímetros	mm
Microlitro	μL
Segundo	S
Centímetro	cm
Standard error of the mean	SEM
Constante de ionização	Ki
Minuto	min



Hora	h
(Z)-3-(4-Iodophenyl)-2-mercapto-2-propenoic acid	PD150606
Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	MARCKS
Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent protein kinase	CAMKII
Activity regulated cytoskeleton associated protein	Arc
Ras homolog gene family, member A	RhoA
Mechanistic target of rapamycin	mTOR
Phosphatase and tensin homolog	PTEN
Suprachiasmatic nucleus circadian oscillatory protein	SCOP
Extracellular signal-regulated kinase	ERK
Córtex Retrosplenial	RSC
Striatum	CPu

## RESUMO

As calpaínas são proteases dependentes de cálcio e amplamente expressas em duas isoformas no encéfalo, calpaína-1 e calpaína-2. Uma das suas principais atividades resulta na modulação dos espinhos dendríticos, através da reorganização do citoesqueleto de actina e da degradação do córtex celular, principalmente da espectrina. Outra consequência da sua atividade é a endocitose de receptores glutamatérgicos (NMDA e AMPA), constituindo assim, um correlato para a formação e manutenção da memória. Então, testamos se a inibição farmacológica da calpaína no hipocampo dorsal afeta a consolidação, evocação e reconsolidação da memória aversiva em ratos *Wistar* machos. Assim, utilizamos o condicionamento aversivo contextual (CAC) para avaliar as memórias aversivas e um antagonista seletivo para ambas as isoformas da calpaína (PD150606) para estudar a sua função. Primeiro mostramos que a infusão imediatamente pós-treino do inibidor da calpaína PD150606 prejudicou a consolidação da memória de longo prazo, mas não a memória de curto prazo. Em seguida, mostramos que a infusão pré-teste do inibidor de calpaína inibiu completamente a evocação da memória. Finalmente, o bloqueio da atividade da calpaína após a reativação da memória acarretou em um prejuízo na reconsolidação. Em conjunto, nossos resultados mostraram que a calpaína desempenha um papel essencial no hipocampo, que contribui significativamente para a formação, expressão e reconsolidação da memória.

## ABSTRACT

Calpains are calcium-dependent proteases and are extensively expressed in two isoforms in the brain, calpain-1 and calpain-2. One of its main activities results in the modulation of dendritic spines by the reorganization of the actin cytoskeleton and the cellular cortex by degradation of spectrin. Another consequence of its activity is endocytosis of glutamatergic receptors (NMDA and AMPA), thus constituting a correlate for memory formation and maintenance. We tested whether the pharmacological inhibition of calpain in the dorsal hippocampus affects the consolidation, retrieval and reconsolidation of aversive memory in male Wistar rats. Thus, we used contextual fear conditioning (CFC) to evaluate aversive memories and a selective antagonist for both calpain isoforms (PD150606) to study its function. We first showed that the immediate post-training infusion of the PD150606 calpain inhibitor impaired long-term memory consolidation, but not short-term memory. Next, we showed that the pre-test infusion of the calpain inhibitor expressively inhibited memory retrieval. Finally, blocking calpain activity after memory reactivation disrupted reconsolidation. Taken together, our results shown that calpain plays an essential role in the hippocampus by enabling memory formation, expression, and reconsolidation.

# 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 1.1 MEMÓRIA

A memória permite o armazenamento de informações adquiridas ao longo do tempo, sendo uma das maiores capacidades dos seres vivos, pois define quem somos e permite a nossa sobrevivência. Dessa forma, a memória pode ser mensurada pelas alterações no comportamento do animal algum tempo depois do aprendizado, refletindo em muitos processos, incluindo a consolidação, evocação, reconsolidação, extinção e esquecimento.

A consolidação de uma memória está relacionada ao período imediatamente após a aquisição das informações. Esse período caracteriza-se por ser mais lábil, ou seja, suscetível a modulações no traço dessa memória, podendo melhorar ou prejudicar a sua consolidação, após esse período o traço da memória se torna menos sensível a modulações (Izquierdo and McGaugh, 2000, Rudy, 2015b). O processo de consolidação das memórias envolve uma reorganização tanto em níveis sinápticos como sistêmicos (Dudai et al., 2015). A consolidação sináptica pode estar completa com algumas horas de treino e envolvendo cascatas de sinalização intracelular, modulações da expressão gênica e na síntese proteica (Kandel et al., 2014), resultando em mudanças na conectividade sináptica em circuitos localizados, ou seja, tanto na estabilização das novas conexões como na reestruturação das já existentes (Kandel, 2001, Dudai, 2012).

Entretanto, a consolidação sistêmica consiste em um processo prolongado que podendo durar dias, meses ou anos, pelo qual a informação é gradualmente reorganizada em diferentes estruturas encefálicas (Squire, 2004). Acerca do processo de consolidação, vários estudos mostram que novas memórias estão associadas, principalmente, a um aumento transitório na expressão gênica e na densidade e morfologia dos espinhos dendríticos no hipocampo, enquanto memórias remotas estão significativamente associadas às mesmas alterações no córtex cerebral (Maviel et al., 2004, Restivo et al., 2009).

Depois que uma memória é consolidada, essa pode ser evocada. Quando reativada, a memória original pode retornar a um estado instável e passível de sofrer interferências (Lee, 2009, Nader and Einarsson, 2010), e então dois processos bem conhecidos podem ocorrer: reconsolidação e/ou extinção.

O processo de reconsolidação mostra-se também dependente da atividade do hipocampo, bem como de outras áreas encefálicas, como a amígdala (Nader et al., 2000, De Oliveira Alvares et al., 2013). A reativação/evocação de uma memória previamente

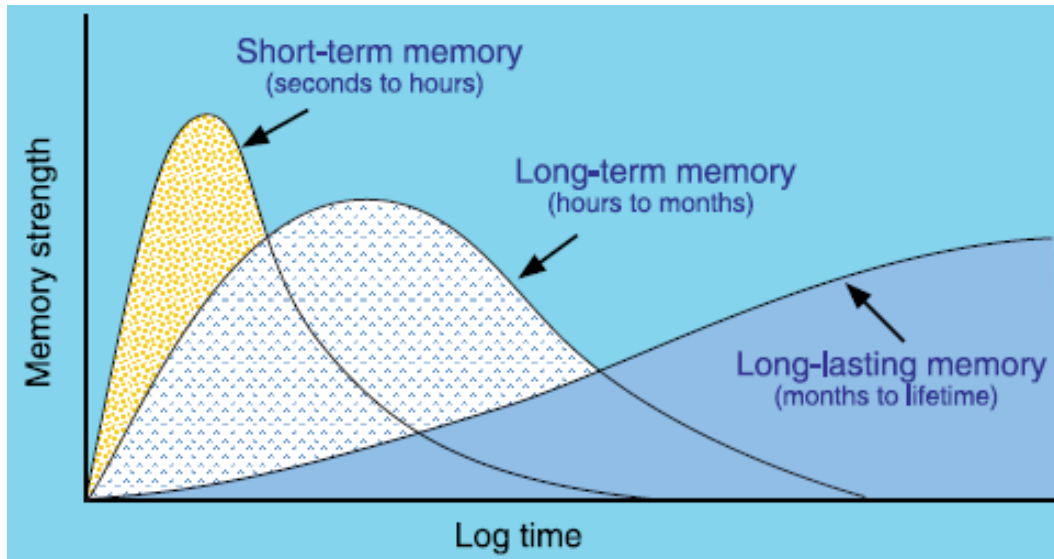
consolidada pode torná-la lábil e vulnerável a interferências (Nader et al., 2000), acarretando na atualização no traço original da memória, ou seja, novas informações podem ser acrescentadas ou mesmo retiradas da memória original (Lee, 2008, 2009).

A outra consequência que a evocação da memória pode desencadear é a formação de uma memória de extinção. A extinção da memória é caracterizada pela formação de uma nova memória, ou seja, um processo de aprendizagem ativo que inibe o traço original da memória, sem apaga-lo (Abel and Lattal, 2001). Outra fase da memória que recentemente vem sendo estudada é o esquecimento, entretanto pouco se sabe sobre os possíveis mecanismos neurobiológicos subjacentes ao decaimento da memória de longa duração. Sugere-se que a regulação do tráfego de receptores de AMPA (ácido-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propiónico – AMPA) constitui um processo central de armazenamento e manutenção da memória (Migues et al., 2010, Migues et al., 2016). Logo o esquecimento pode, assim, envolver a remoção gradual desses receptores dos espinhos dendríticos, bem como dos mesmos.

## 1.2 DURAÇÃO DA MEMÓRIA

As memórias não são imediatamente estabelecidas como memórias de longo prazo (do inglês *Long Term Memory* - LTM). Classicamente a LTM pode levar até seis horas, sendo comumente considerado de três a seis horas e envolve uma sequência de processos moleculares específicos, principalmente na área CA1 do hipocampo e suas conexões (Medina et al., 1999, McGaugh, 2015). Entretanto as memórias de curta duração (do inglês *Short Term Memory* - STM) decaem até seis horas, sendo consideradas que duram de uma a seis horas (Figura 1) (McGaugh, 2015).

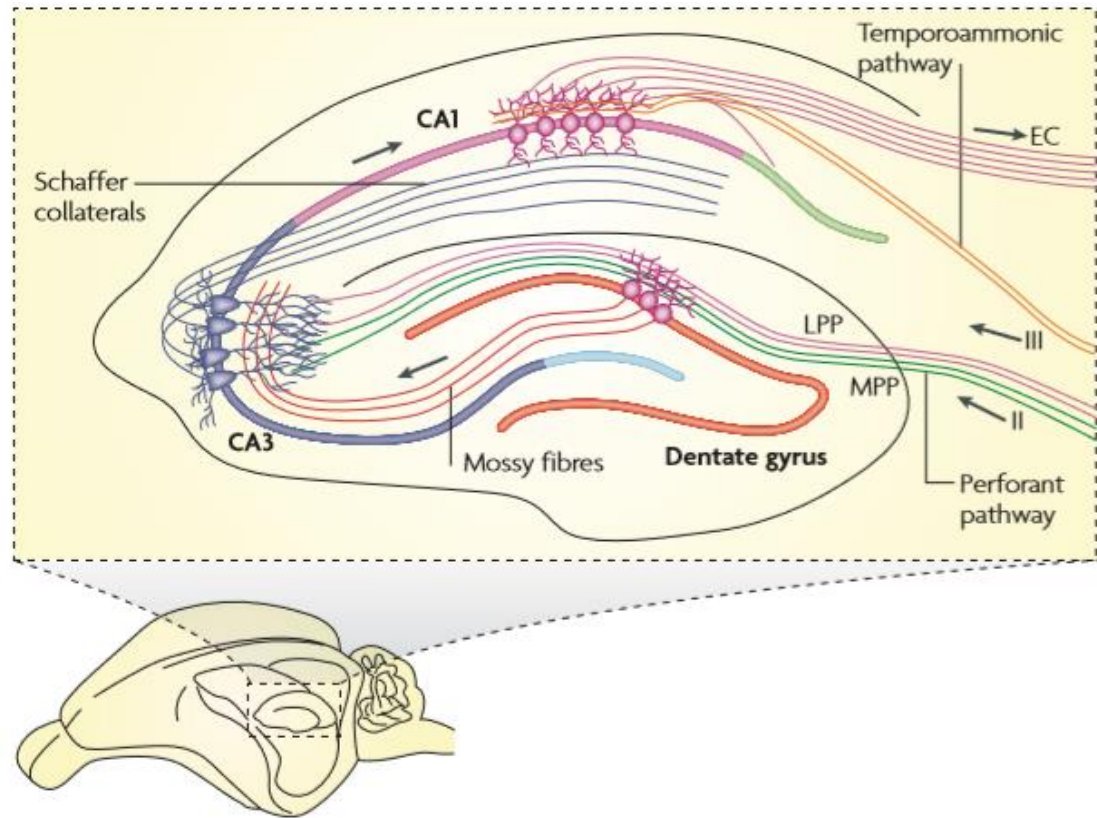
Algumas diferenças marcantes entre elas, consiste que a LTM requer síntese proteica e tende a aumentar o número de conexões sinápticas, a densidade dos espinhos dendríticos, bem como AMPA *trafficking* (McGaugh, 2000). Já a STM não envolve grandes alterações tanto nas conexões sinápticas como nos espinhos dendríticos, e não é dependente de síntese proteica. Evidências utilizando drogas podem bloquear seletivamente a STM ou LTM sugere que são processos independentes que atuam em paralelo (McGaugh, 2000). Todavia, não se exclui completamente que a STM e a LTM podem ser processos complementares, ou seja, a STM é apenas um passo em direção a LTM (Izquierdo et al., 1999).



**Figura 1.** Desenho esquemático das fases da consolidação da memória (McGaugh, 2000).

### 1.3 ESTRUTURA ENCEFÁLICA

O hipocampo é caracterizado por ser uma das principais estruturas encefálicas relacionadas com a memória, exercendo um papel essencial na aquisição, consolidação e nas fases subsequentes à evocação do traço de memória. Essa estrutura localiza-se na porção medial do lobo temporal e faz parte do sistema límbico (O'Keefe and Dostrovsky, 1971). É formado por duas regiões interligadas chamadas de giro denteado e Corno de Amon (CA), sendo esse último subdividido em outras três partes: CA1, CA2 e CA3 (Figura 2) (Taube et al., 1990). A principal aferência para o hipocampo origina-se no córtex entorrinal e segue até os neurônios granulares da camada molecular do giro denteado, a chamada via perfurante. Os axônios desses neurônios granulares constituem as fibras musgosas que se projetam para os neurônios piramidais da região de CA3 (O'Keefe and Dostrovsky, 1971). Por sua vez, os axônios de CA3 conectam-se também com neurônios piramidais de CA1 e CA2, a chamada via colateral de Schaffer. Em razão da reduzida área de CA2, esta é descrita em associação com CA1. Os axônios de CA1 projetam-se para o complexo subicular e então para as camadas profundas do córtex entorrinal (Witter et al., 2000a, Witter et al., 2000b). O circuito córtex entorrinal – giro denteado – CA3 – CA1 é tradicionalmente denominado “via tri-sináptica” e utiliza o glutamato como principal neurotransmissor (Witter et al., 2014).



**Figura 2.** Desenho esquemático do hipocampo de ratos *Wistar* em corte coronal. Representação da formação hipocampal (giro dentado e Corno de Amon - CA, subdividido nas regiões CA1, CA2 e CA3 e das suas principais conexões. Representando a via trissináptica do hipocampo (Deng et al., 2010).

### 1.3.1 Tarefa comportamental

Levando em consideração o papel central do hipocampo no traço de memória, uma das principais tarefas comportamentais é o condicionamento do medo pavloviano, conhecido como condicionamento aversivo contextual – CAC e, tornou-se um aparato comportamental essencial nos estudos de neurociências, com ênfase na memória. Possibilitando assim, investigar fenômenos comportamentais e cognitivos após manipulações farmacológicas, genéticas, bem como através de outras manipulações experimentais.

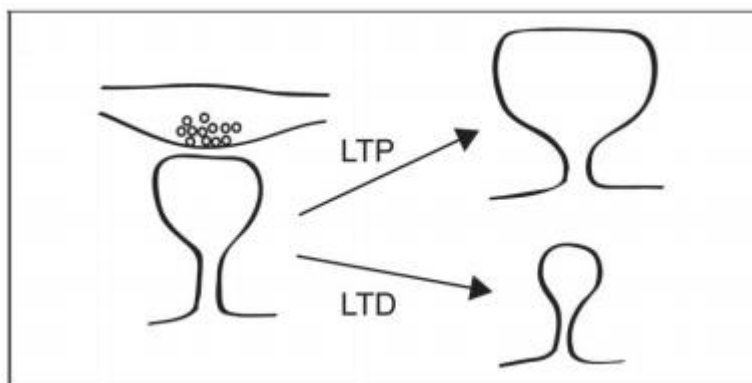
A aquisição da memória de medo no CAC depende da plasticidade sináptica do hipocampo, bem como de outros substratos neurais adicionais, como a amígdala. O hipocampo é responsável por mediar a integração de pistas multimodais para a representação contextual, logo nessa tarefa comportamental é feito o pareamento do estímulo neutro (do inglês *conditioned stimulus* – CS) com um estímulo aversivo (do inglês *unconditioned*

*stimulus* – US). Sendo o estímulo neutro representado pelo contexto e o estímulo aversivo pelo choque nas patas do animal. Resultando assim na aquisição da memória aversiva (Kim and McGaugh, 1992, Kim and Jung, 2006).

#### 1.4 POTENCIAÇÃO E DEPRESSÃO DE LONGA DURAÇÃO

O aprendizado e a memória são amplamente considerados como resultado de mudanças na conectividade dentro dos circuitos neuronais. Em particular, foi bem descrita no hipocampo duas formas de plasticidade sináptica, a potenciação de longa duração (do inglês *Long Term Potentiation* – LTP) e a depressão de longa duração (do inglês *Long Term Depression* – LTD), ambas as formas de transmissão sináptica estão intimamente relacionadas com a formação, persistência e manutenção da memória (Stevens, 1998, LeDoux, 2000, Nabavi et al., 2014). Vários estudos evidenciam que a LTP está envolvida na consolidação da memória de medo no CAC, enquanto a LTD está mais associada com a extinção da memória de medo (Maren and Quirk, 2004, Fanselow and Poulos, 2005, Nabavi et al., 2014).

A indução da LTP desencadeia várias cascatas celulares e moleculares que acarretam no aumento da densidade e volume dos espinhos dendríticos e no número de receptores AMPA (Matsuzaki et al., 2004, Kasai et al., 2010, Levy et al., 2014). Entretanto, a LTD resulta basicamente na diminuição do número de receptores de AMPA e, possivelmente, uma redução dos espinhos dendríticos (Mulkey and Malenka, 1992).

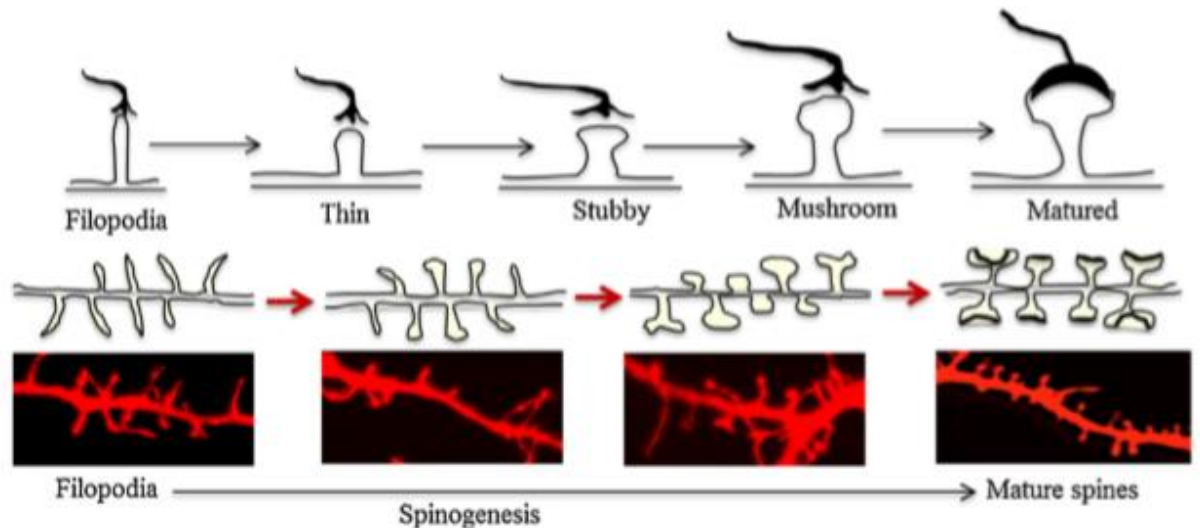


**Figura 3.** Desenho esquemático de um espinho dendrítico e as consequências da LTP e LTD no mesmo (adaptado de Levy, 2014).

#### 1.5 ESPINHOS DENDRÍTICOS



Os espinhos dendríticos são pequenas protrusões nos dendritos dos neurônios (Yuste and Majewska, 2001). Atualmente, os espinhos dendríticos são comumente classificados com base na sua estrutura morfológica, sendo do inglês, *filopodial*; *thin*; *stubby*; *fenestrated* e *mushroom*, entretanto podem assumir outras formas (Kasai et al., 2003).



**Figura 4.** Desenho esquemático das diferentes morfologias do espinho dendrítico, bem como uma fotomicrografia de cada morfologia (Maiti et al., 2015).

A dinâmica estrutural dos espinhos dendríticos estão intimamente relacionados com a plasticidade sináptica. Espinhos pequenos mudam mais rapidamente sua forma (Yuste and Majewska, 2001) e, podem desaparecer ou se transformar em espinhos grandes, sendo que podem ser formados ou eliminados durante o aprendizado e a indução de LTP (Kasai et al., 2003). Todavia, os espinhos dendríticos maiores (*mushroom*) são relativamente mais estáveis e perduram por meses ou até mesmo anos, sugerindo que a memória pode ser sustentada por essa forma estrutural (Newpher and Ehlers, 2009).

Os espinhos dendríticos compõem majoritariamente as sinapses excitatórias glutamatérgicas. Em razão disso, as relações estrutura-função estão fortemente relacionadas aos receptores AMPA, que medeiam o componente rápido da transmissão sináptica mediada por glutamato. Sabe-se que os espinhos com grandes densidades pós-sinápticas (PSDs) tendem a comportar mais receptores AMPA do que aquelas com PSDs menores, uma vez que o tamanho das PSD está correlacionado com o volume da cabeça dos espinhos dendríticos. Da mesma forma, a LTP é potencializada e mantida por mais tempo de acordo com o volume do espinho, como por exemplo, os espinhos classificados como *mushroom* são capazes de

sustentar de forma mais eficiente a LTP (Matus, 2000, Noguchi et al., 2005, Newpher and Ehlers, 2009, Hotulainen and Hoogenraad, 2010).

Uma forte relação entre a densidade e morfologia dos espinhos dendríticos no hipocampo e a memória tem sido demonstrada. Por exemplo, a aquisição de novas memórias está associada ao aumento da densidade de espinhos dendríticos nos neurônios piramidais de CA1 no hipocampo em ratos *Wistar*, tanto em memórias neutras (localização de objetos) como em memórias aversivas (condicionamento aversivo contextual) (Leuner et al., 2003, Jedlicka et al., 2008, Eilam-Stock et al., 2012), sugerindo que há um substrato morfológico para a memória. Da mesma forma, a densidade de espinhos dendríticos no hipocampo está relacionada com a LTP e com a LTD, ou seja, o aumento do número/tamanho do espinho está associado com LTP (Matsuzaki et al., 2004), enquanto a sua diminuição está associado com LTD (Jedlicka et al., 2008, Bosch and Hayashi, 2012, Eilam-Stock et al., 2012). Portanto, há uma forte interação entre LTP, LTD, densidade de espinhos dendríticos e memória no hipocampo.

A morfologia do espinho dendrítico é sustentada pelo citoesqueleto, constituído principalmente por filamentos de actina, que se estende da base do espinho até a densidade pós-sináptica (Bosch and Hayashi, 2012). Mais precisamente a actina fornece a base estrutural do citoesqueleto, principalmente através da associação com a proteína espectrina – principal constituinte do córtex celular (também conhecida como fodrina) (Rudy, 2015a). Esta proteína fornece uma interface entre o filamento de actina e a membrana plasmática por sua interação com proteínas na membrana plasmática. Dessa forma permite a estabilidade entre os elementos pré e pós-sinápticos, necessários para uma sinapse funcional. Portanto a reestruturação dos filamentos de actina durante a plasticidade sináptica permite a modulação do espinho dendríticos, tanto a nível morfológico como funcional.

## 1.6 RECEPTORES GLUTAMATERGICOS

O cálcio ( $Ca^{2+}$ ) é um íon fundamental a vida, e que está envolvido com a ativação de inúmeras cascatas celulares e moleculares no encéfalo. Sendo bem estabelecido sua participação nos processos sinápticos que parecem ser a base da memória (Cavazzini et al., 2005, Barad, 2006, Baker et al., 2013). Bem como na LTP e a LTD, os correlatos celulares da memória.

Uma das formas de entrada de cálcio nos neurônios excitatórios é através dos receptores glutamatérgicos. Destacando-se os receptores pós-sinápticos de N-metil-D-

aspartato (NMDA) e dos receptores AMPA. Os receptores de NMDA são uma subclasse da família de receptores de glutamato ionotrópicos e desempenham funções cruciais na plasticidade sináptica, na memória, no desenvolvimento neuronal e em muitas outras funções (Wyllie et al., 2013). Esses canais são altamente permeáveis ao cálcio e são geralmente compostos por dois tipos de subunidades: o receptor de NMDA 1 da subunidade de ligação à glicina (GluN1) e as subunidades de ligação ao glutamato GluN2A-D (Laube et al., 1997). Diferentes combinações dessas subunidades exibem propriedades distintas e expressão regional e de desenvolvimento característica *in vivo* (Lynch and Guttman, 2001). Os receptores AMPA são combinações diferentes de quatro subunidades designadas GluA1-GluA4 (Sobolevsky et al., 2009). A permeabilidade a  $\text{Ca}^{2+}$  dos receptores AMPA varia dependendo se a subunidade GluA2 está presente dentro do tetrâmero, chamada de CP-AMPA (do inglês *calcium permeable*). A capacidade da subunidade GluA2 para regular a permeabilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  dos receptores AMPA (Wright and Vissel, 2012).

## 1.7 CARACTERIZAÇÃO DAS CALPAÍNAS

Na década de 1960 surgiram os primeiros relatos sobre a calpaína, mais precisamente em 1964, sendo observada uma atividade proteolítica ativada por elevadas concentrações de cálcio. Essas observações vieram de dois grupos de pesquisadores diferentes, sendo primeiramente observado por Gordon Guroff no encéfalo de ratos (Guroff, 1964) e posteriormente tecido muscular esquelético (Huston and Krebs, 1968). Já na década de 1970, a enzima foi então purificada a partir do músculo esquelético (Dayton et al., 1976) e denominada CANP (do inglês, *calcium-activated neutral protease* – CANP). Entretanto, as funções dessa nova proteína permaneciam desconhecidas, pois a sua ativação requeria uma concentração extremamente elevada de cálcio (referida como uma concentração não fisiológica de cálcio) e assim o seu papel fisiológico permaneceu desconhecido (Ishiura, 1980). Em razão disso, apenas na década de 1980 por Murachi e colaboradores, que o termo e o uso da palavra calpaína foram amplamente utilizados (Murachi et al., 1980). Durante esse tempo, tornou-se claro que existiam diferentes isoformas, posteriormente chamadas  $\mu$ - e *m*-calpaína (também designadas por calpaína-1 e calpaína-2, respectivamente), que diferiam na sua sensibilidade ao cálcio para serem ativadas e atualmente são as únicas isoformas amplamente expressas no encéfalo (Mellgren, 1980). As designações  $\mu$ - e *m*- são as

abreviações de micromolar e milimolar cálcio necessário para a sua ativação, respectivamente.

A ativação da m-calpaína, mais especificamente, requer 0,4 a 0,8 mM (ou 400 a 800  $\mu\text{M}$ ) de cálcio para metade da atividade proteolítica máxima *in vitro*, enquanto que a  $\mu$ -calpaína requer 3 a 50  $\mu\text{M}$  de cálcio para sua atividade (Murachi et al., 1980). As duas isoformas têm características estruturais sobrepostas e curiosamente com substratos específicos semelhantes. Elas contêm subunidades catalíticas grandes de 80 kDa e uma pequena subunidade reguladora de 30 kDa. As subunidades grandes de  $\mu$ -calpaína e m-calpaína estão organizadas em quatro domínios (I, II, III e IV) e são codificadas pelos genes CAPN1 e CAPN2, respectivamente (Murachi et al., 1980). O domínio I é o domínio N-terminal da  $\alpha$ -hélice, que contém o local onde ocorre a clivagem autolítica. Essa região é importante para regular a atividade e dissociação das duas subunidades. O domínio II contém os resíduos essenciais de cisteína e histidina envolvidos na atividade catalítica e interage com o substrato e a região inibitória da calpastatina, um inibidor endógeno da calpaína (Mellgren, 1980, Ohno et al., 1984). A função do domínio III é desconhecida, mas pode estar envolvida na ligação de  $\text{Ca}^{2+}$  e fosfolípidos, bem como na regulação das interações eletrostáticas (Dear and Boehm, 2001). O domínio IV, na extremidade C-terminal da subunidade grande, é responsável pela de ligação ao  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta região é homóloga à calmodulina e está envolvida na formação de dímeros (Croall and Ersfeld, 2007).

A subunidade reguladora contém dois domínios. O domínio V, a região N-terminal da subunidade pequena, é um domínio hidrofóbico rico em glicina, e pode funcionar como uma âncora de membrana. O domínio VI, a extremidade C-terminal da subunidade pequena, é uma região de ligação  $\text{Ca}^{2+}$ , de forma semelhante ao domínio IV da subunidade grande (Dear and Boehm, 2001). Os domínios de ligação de  $\text{Ca}^{2+}$  das subunidades catalítica e reguladora se associam para formar calpaina heterodimérica. Em ratos knockout para calpaína, a ausência de atividade de  $\mu$ - e m-calpaína é letal (Sorimachi et al., 2011b), confirmando assim o seu papel essencial nas funções celulares para o desenvolvimento.

No sistema nervoso, essas duas formas são as principais isoformas de calpaínas que são amplamente expressas e são encontradas tanto no soma como nos terminais sinápticos dos neurônios. Os substratos de calpaína nos neurônios incluem proteínas sinápticas, tais como receptores de membrana, proteínas citoesqueléticas, proteínas de densidade pós-sináptica (PSD-95) e mediadores intracelulares que são críticos para a função sináptica (Kretsinger, 1997, Ravulapalli et al., 2009, Chan et al., 2010, Sorimachi et al., 2011b, a, Ono and Sorimachi, 2012). Abordagens farmacológicas baseadas na inibição farmacológica de todas as

calpaínas sugerem que as calpaínas participam de muitos processos neuronais, como excitabilidade, liberação de neurotransmissores, plasticidade sináptica, transdução de sinal, tráfego vesicular, estabilização estrutural e transcrição gênica (Bertipaglia and Carafoli, 2007, Cortesio et al., 2010).

## 1.8 PAPEL FISIOLÓGICO DA CALPAÍNA

As calpaínas atuam em inúmeras cascatas de sinalização intracelular mediadas por  $\text{Ca}^{2+}$ . Os principais substratos dessa protease são os receptores NMDA e AMPA, canais de cálcio voltagem dependente do tipo L e proteínas do citoesqueleto e do córtex celular. Os substratos da calpaína estão relacionados com a plasticidade sináptica e com a memória, fortalecendo assim a nossa hipótese que a calpaína tem um papel central nas memórias aversivas.

As calpaínas são ativadas principalmente pela entrada de cálcio através de receptores NMDA (Vanderklish et al., 1995) e, cada subunidade do receptor NMDA tem uma cauda C-terminal que interage com o citoplasma, como por exemplo, proteínas de ancoragem, elementos do citoesqueleto, fosfatases e cinases. Entretanto, os terminais-C de três subunidades de GluN2 (N2A, N2B e N2C), menos o GluN1, são alvo da proteólise, podendo reduzir a densidade de receptor de NMDA e atividade das sinapses (Niethammer et al., 1996, Bi et al., 2000, Wu et al., 2004). Contudo as clivagens nas subunidades GluN2 dá-se quase exclusivamente N2B (Simpkins et al., 2003), tanto *in vitro* como *in vivo* (Guttmann et al., 2002, Wu et al., 2005, Dong et al., 2015), já que a subunidade GluN2A está intimamente ligada à proteína de densidade pós-sináptica (PSD-95), essa liga-se à cauda C-terminal da N2A e impede a clivagem pela calpaína. Apenas quando diminui a interação da PSD-95 com a subunidade N2A ou a remoção do sítio de ligação PSD-95 que permite que N2A seja um substrato para calpaína (El-Husseini Ael et al., 2002).

O receptor AMPA é composto por quatro subunidade, designadas GluA1-4. As subunidades GluA1, GluA2 e GluA3 são provavelmente alvos de calpaína (Gellerman et al., 1997, Lu et al., 2000). A clivagem da subunidade GluA1 por calpaína também ocorre no domínio C-terminal. Em cultura de neurônios, a atividade da calpaína parece remover os receptores AMPA (GluA1-3) de densidades pós-sinápticas, corroborando com esse resultado, em roedores, evidencia que a calpaína pode não apenas degradar os receptores AMPA mas também pode expor regiões da proteína que não são geralmente acessíveis e favorecer a

endocitose. Lu e colaboradores mostraram em fatias de hipocampo de rato, que a ativação da calpaína pode promover a *turnover* dos receptores de AMPA nas sinapses (Lu et al., 2000).

Outra forma extremamente importante de entrada de cálcio nos neurônios dá-se pelos canais de cálcio voltagem dependente do tipo L, desempenhado um papel chave em várias funções neuronais, como excitabilidade da membrana, liberação de neurotransmissores, fosforilação proteica, expressão gênica e plasticidade sináptica. Os canais  $Ca^{2+}$  de tipo L são compostos basicamente por três subunidades diferentes, incluindo subunidades  $\alpha 1$  como sua subunidade formadora de poros. Em cultura de neurônios hipocampais, a atividade da calpaína é capaz de clivar as subunidades  $\alpha 1C$  (Hell et al., 1996), podendo alterar as propriedades eletrofisiológicas desses canais (Klockner et al., 1995).

A atividade da calpaína também modula a arquitetura sináptica, pois a espectrina isoforma  $\alpha II$  (chamada também de  $\alpha$ -fodrina) é um dos principais componentes estruturais do citoesqueleto da membrana neuronal, ou seja, responsável pela morfologia do contato sináptico (Goodman et al., 1995). Uma vez que, a  $\alpha II$ -espectrina é ancorada à membrana plasmática e se liga à actina, calmodulina e aos microtúbulos, a sua clivagem pela calpaína acarreta em alterações funcionais da membrana plasmática (Vanderklish et al., 1995). Sabe-se que a  $\alpha II$ -espectrina é um substrato da calpaína no hipocampo e cerebelo, entretanto muitas outras estruturas encefálicas devem apresentar os mesmos substratos da calpaína (Siman et al., 1984).

A calpaína possui vários outros substratos, inclusive várias outras proteínas sinápticas, como a SAP-97 e GRIP1, responsáveis por ancorar e estabilizar os receptores AMPA na sinapse (Iwakura et al., 2001, Jourdi et al., 2003). Em certas condições (principalmente citotóxicas) a proteína associada aos microtúbulos (MAP-2) pode ser clivada pela calpaína (Siman and Noszek, 1988). Da mesma forma, a em algumas condições a PSD-95 também é alvo da atividade dessa protease (Ehlers, 2003).

## **2 HIPÓTESE**

Levando em consideração a íntima associação entre plasticidade sináptica, remodelação dos espinhos dendríticos e memória aversiva, levantamos a hipótese que a atividade das calpaínas são cruciais para as memórias aversivas, assim a sua inibição levaria ao prejuízo da memória. Uma vez que, essas proteases apresentam um papel decisivo na plasticidade sináptica e que permite a remodelação dos espinhos dendríticos.

### 3 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar se a inibição farmacológica das calpaínas prejudica os diferentes processos da memória aversiva em ratos *Wistar* submetidos na tarefa de condicionamento aversivo contextual (CAC).

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar uma curva dose resposta do antagonista de calpaína (PD150606) na consolidação de memórias aversivas no CAC em ratos *Wistar*;
2. Após verificar a dose mais efetiva, avaliar a janela temporal da atividade da calpaína o processo consolidação de memórias aversivas no CAC em ratos *Wistar*;
3. Testar se a administração de PD150606 tem efeitos na memória de curta duração no CAC em ratos *Wistar*
4. Testar se a administração de PD150606 prejudica a evocação da memória aversiva no CAC em ratos *Wistar*;
5. Testar se a administração de PD150606 prejudica a reconsolidação da memória aversiva no CAC em ratos *Wistar*.

### 4 RESULTADOS

#### 4.1 ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados dessa dissertação culminaram no artigo científico apresentado na sequência, submetido à *Neurobiology of Learning and Memory*. O referido artigo intitula-se “Calpain modulates fear memory consolidation, retrieval and reconsolidation in the hippocampus.”

## TITLE PAGE

Calpain modulates fear memory consolidation, retrieval and reconsolidation in the hippocampus

**Authors' names:** Bruno Popik<sup>1,3</sup>, Ana Paula Crestani<sup>2,3</sup>, Mateus Oliveira Silva<sup>1,3</sup>, Jorge Alberto Quillfeldt<sup>2,3</sup>, and Lucas de Oliveira Alvares<sup>1,3</sup>

**Authors' affiliations:** <sup>1</sup>Laboratório de Neurobiologia da Memória, <sup>2</sup>Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação, Biophysics Department, Biosciences Institute, 91.501-970, and <sup>3</sup>Graduate Program in Neuroscience, Institute of Health Sciences, 90.046-900, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

**Corresponding author:** Lucas de Oliveira Alvares, Laboratório de Neurobiologia da Memória, Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43422, Sala 216, CEP 91.501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mail: [lucas.alvares@ufrgs.br](mailto:lucas.alvares@ufrgs.br)



**Abstract**

It has been proposed that long-lasting changes in dendritic spines provide a physical correlate for memory formation and maintenance. Spine size and shape are highly plastic, controlled by actin polymerization/depolymerization cycles. This actin dynamics is regulated by proteins such as calpain, a calcium-dependent cysteine protease that cleaves the structural cytoskeleton proteins and other targets involved in synaptic plasticity. Here, we tested whether the pharmacological inhibition of calpain in the dorsal hippocampus affects memory consolidation, retrieval, and reconsolidation in rats trained in contextual fear conditioning. We first found that post-training infusion of the calpain inhibitor PD150606 impaired long-term memory consolidation, but not short-term memory. Next, we showed that pre-test infusion of the calpain inhibitor hindered memory retrieval. Finally, blocking calpain activity after memory reactivation disrupted reconsolidation. Taken together, our results have shown that calpain plays an essential role in the hippocampus by enabling memory formation, expression, and reconsolidation.

**Keywords:** protease; synaptic plasticity; PD150606; rats; fear conditioning.

## 1. Introduction

The process by which information is retained as long-lasting memory does not occur instantaneously. Initially, new memories are plastic and sensitive to modulation, and gradually, they are transformed into a more stable form. This time-dependent stabilization process is called consolidation (McGaugh, 2000, Frankfurt and Luine, 2015). In the last decade, significant evidence has shown that a well-consolidated memory may undergo a new labile state induced by retrieval, allowing memory to be modified before being reconsolidated (Nader et al., 2000, De Oliveira Alvares et al., 2013). Following long-term potentiation (LTP), memory formation, and memory retrieval, glutamate is released from presynaptic terminals in the hippocampus, acting on NMDARs. This process leads to  $\text{Ca}^{++}$  influx, which activates several enzymes in dendritic spines, including calpain (Vanderklish et al., 1996).

Calpain is a calcium-dependent cysteine protease widely distributed in mammalian tissues (Briz and Baudry, 2016). In the brain, there are only two calpain isoforms: calpain-1 (aka  $\mu$ -calpain) and calpain-2 (aka m-calpain). Both are highly expressed in dendritic spines and postsynaptic density (PSD) (Baudry and Bi, 2013, Dong et al., 2015).

It has been shown that calpain regulates a varied set of biological processes (Goll et al., 2003), including synaptic plasticity (Briz and Baudry, 2016). More specifically, studies have demonstrated that calpains have several pertinent functions on synaptic restructuring (Zadran et al., 2010) and LTP induction (Lynch and Baudry, 1984). It has been proposed that, during LTP, the  $\text{Ca}^{++}$  influx activates the enzyme calpain, which degrades the cytoskeletal protein spectrin, promoting an increase in AMPAR levels in the postsynaptic density (PSD) by degrading the F-actin network (Lynch and Gleichman, 2007, Gu et al., 2010, Donkor, 2015). Indeed, either the pharmacological (Oliver et al., 1989) or genetic (Amini et al., 2013) inhibition of calpain is able to prevent LTP induction. Memory studies in animals have shown that calpain-1 knockout mice exhibit impaired memory in both object recognition and fear

memory (Zhu et al., 2015). Moreover, Liang et al. (2017) have reported that the calpain inhibition in the *nucleus accumbens* impairs drug reward memory reconsolidation in conditioned place preference (CPP) and self-administration (Liang et al., 2017). In the same study, they also showed that drug-related memory retrieval increases the calpain activity (Liang et al., 2017). Altogether, this evidence suggests an important role played by calpain on synaptic plasticity and memory.

The actin network disassembling through spectrin degradation by calpain has been proposed as an initial step to induce a plastic state such as memory consolidation or LTP induction (Lynch and Gleichman, 2007). This process undergoes an unstable state in the dendritic spines, which allows it to be modified before being rebuilt by actin network reorganization in a larger and more stable form (Rudy, 2015a, b). The objective of the present study was to evaluate the effects of hippocampal inhibition of calpain on memory consolidation, retrieval, and reconsolidation in the contextual fear conditioning in rats.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Animals**

Male *Wistar* rats (2-3 months old, weighing approximately 350g) from Biophysics Department at the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS) were used for all the experiments. They were housed in Plexiglas boxes, 4-5 animals *per* cage. Animals were kept on 12:12 light/dark cycle under controlled temperature (21°C  $\pm$ 2), with food and water available *ad libitum*. All the procedures followed the Brazilian ethical guidelines for animal research (protocol n° 33025).

### **2.2. Stereotaxic Surgery and Cannulae implantation**

The rats were anesthetized by intraperitoneal injection with ketamine (75mg/kg) and xylazine (10mg/kg) and secure in a Kopf stereotaxic apparatus. Bilateral guide cannulae were targeted for placement directly above the CA1 region of the dorsal hippocampus (AP -4.0mm (from bregma), LL  $\pm$ 3.0mm, DV -1.6mm, 1.0mm) (Supplementary Figure). We used Meloxicam (analgesic and nonsteroidal anti-inflammatory; 1mg/Kg; via subcutaneous) 20 minutes before surgery, and then once a day in the following two days. Animals were allowed 5-7 days to recover before experimentation. Following the appropriate behavioral task, animals were euthanized and their brains were collected to ensure accurate cannula placement. Animals with inaccurate cannula position were excluded from the statistical analysis.

### ***2.3. Drugs and Microinfusion***

PD150606 (Sigma-Aldrich), a calpain-specific inhibitor (0.01; 0.1; 1; 10 and 100  $\mu$ M; dissolved in 1% DMSO) or its vehicle (DMSO 1%) was infused bilaterally into CA1 region of the dorsal hippocampus. At the time of infusion, a 27-gauge needle was fit into the 22-gauge guide cannula, with its tip protruding 1.0 mm beyond the guide cannula. All the infusions were delivered at a rate of 0.5  $\mu$ L/side (PD150606 or DMSO 1%) over the 60s, and 30 additional seconds were waited before removing the infusion needle. A total volume of 1 $\mu$ L of PD150606 or vehicle was injected into the hippocampus. The effective 1  $\mu$ M dose represents the concentration of 0.306 ng/ $\mu$ L.

### ***2.4. Contextual Fear Conditioning***

The conditioning chamber consisted of an illuminated Plexiglas box (25  $\times$  25cm grid of parallel 0.1-cm caliber stainless steel bars spaced 1cm apart). In the training session, rats were placed in the conditioning chamber for 3min before receiving two 2-s, 0.7-mA foot

shocks separated by a 30-s interval; they were kept in the conditioning context for an additional 30-s before returning to their home cage.

Animals were re-exposed to the same conditioning chamber (without foot-shock) for 5 min in Experiment 4 (reconsolidation). A 4min re-exposition was performed in all the test sessions.

### ***2.5. Behavioral Measurement***

Freezing behavior was used as a memory index, being registered with a stopwatch in real time by an experienced observer that was unaware of the experimental conditions. Freezing was defined as total cessation of all movements except those required for respiration (Blanchard and Blanchard, 1969), and it was scored in blocks of 1 minute in the test and reactivation session.

### ***2.6. Open Field***

Locomotor activity and anxiety-like behavior were assessed in the Open Field test. The apparatus consisted of a circular arena (180 cm diameter) with walls 50cm high. The floor was subdivided into 12 quadrants and 3 concentric zones (periphery, intermediary, and center). The animals were exposed to the apparatus for 5 minutes, during which the time spent on the periphery zone (thigmotaxis behavior), the number of crossings between the quadrants were measured.

### ***2.7. Statistical Analysis***

The data were expressed as mean  $\pm$  SEM. The statistical analyses were performed using Student's unpaired *t*-test (Two-tailed), one-way or two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's post hoc test, when necessary. All data used the confidence level of 95% and the values of  $P < 0.05$  were considered statistically significant.

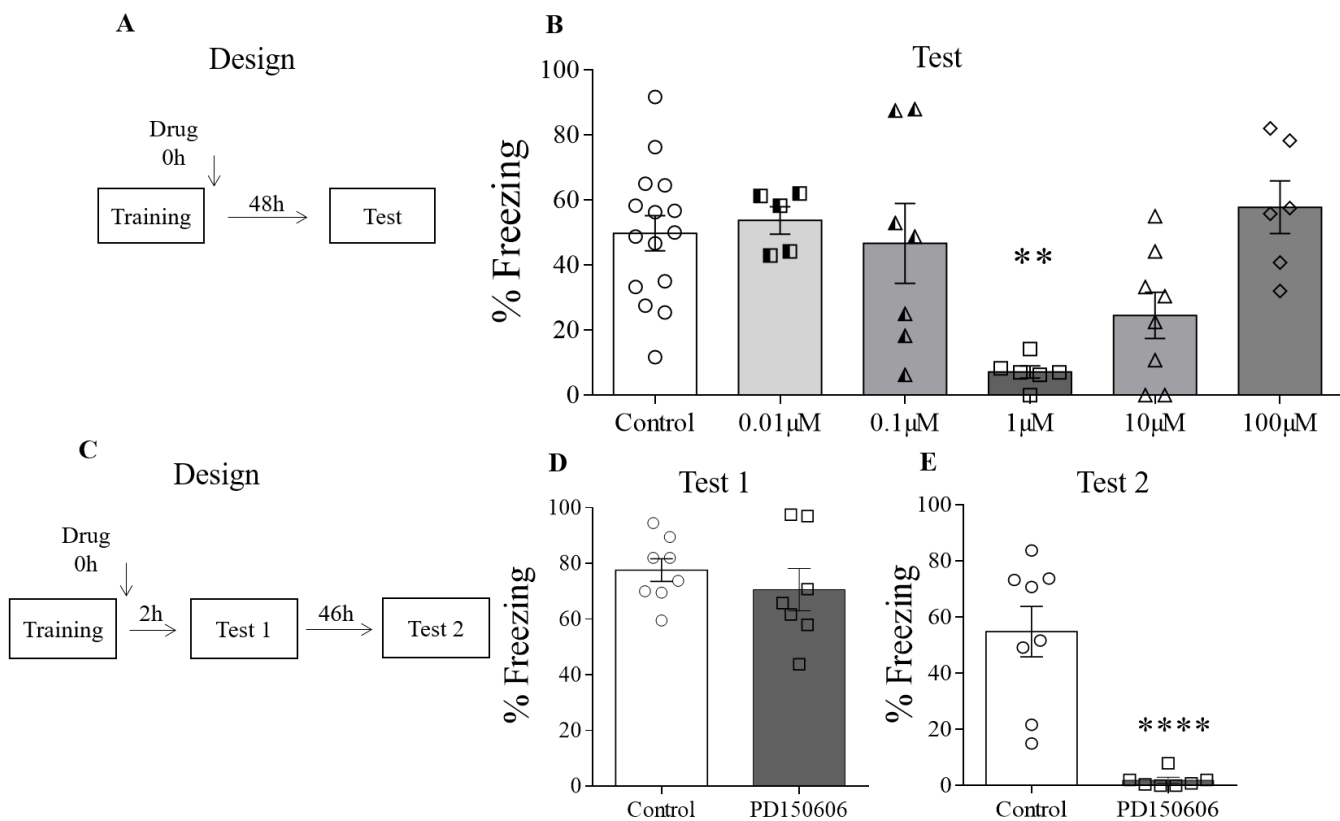
## **3. Results**

### ***3.1. Memory consolidation requires calpain activity***

It is assumed that memory formation relies on morphological and density changes of dendritic spines that follow learning. Calpains modulate the morphology of dendritic spines by reorganizing their cytoskeleton structure (Baudry and Bi, 2013, 2016). Thus, we hypothesized that inhibiting calpain activity would impair fear memory consolidation.

In order to address this question, we first performed a dose-response curve for the calpain antagonist – PD150606 (Fig. 1B). We used five different concentrations of the drug: 0.01, 0.1, 1, 10, and 100  $\mu\text{M}$ . Our results showed that calpain inhibition impairs memory consolidation (One-way ANOVA;  $F_{5,41} = 6.001$ ;  $P = 0.0003$ ). The 1  $\mu\text{M}$  concentration of the drug showed the largest impairment effect in freezing behavior, displaying approximately 85% less freezing compared to the control group (Tukey post-hoc;  $P = 0.001$ ). The other concentrations showed no significant difference between the drug and control group (control vs 0.01  $\mu\text{M}$ ,  $P = 0.99$ ; Control vs 0.1 $\mu\text{M}$ ,  $P = 0.99$ ; Control vs 10  $\mu\text{M}$ ,  $P = 0.08$ ; Control vs 100  $\mu\text{M}$ ,  $P = 0.97$ ). Thus, we kept using the 1 $\mu\text{M}$  dose in the following experiments.

It has been shown that cellular and molecular dynamics of a dendritic spine are not critical for short-term memory (STM) (Sala and Segal, 2014, Maiti et al., 2015). Next, we further assessed whether calpain would be involved in STM. Our results showed that calpain inhibition does not impair memory when the test is performed 2 hours after training, suggesting that STM does not require calpain activity as shown in Figure 1D ( $T_{13} = 0.844$ ;  $P = 0.41$ ). However, the PD150606 treated group expressed lower freezing levels in the re-test performed 46 h later ( $T_{13} = 0.55$ ;  $P = 0.0001$ ). In order to examine whether calpain inhibition also affects memory consolidation outside the hippocampus, we infused PD150606 in the striatum or in the retrosplenial cortex. No difference was found in the test performed 48 h later (data not shown).

**Figure 1**

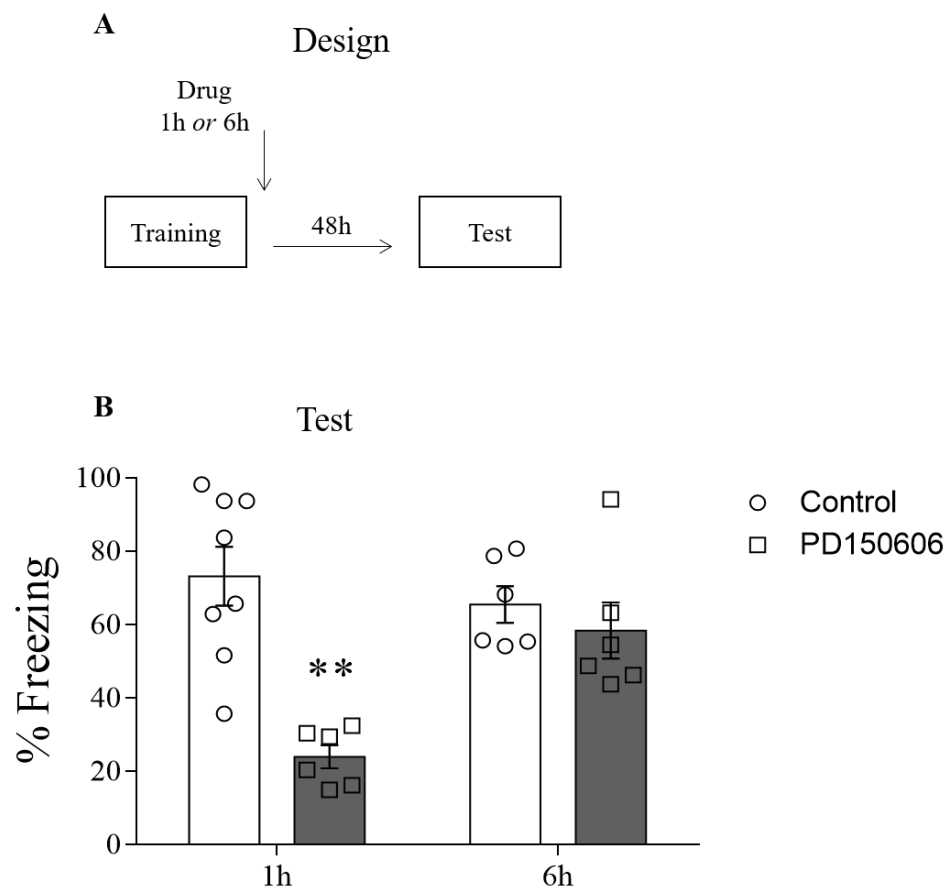
**Figure 1. Memory consolidation requires calpain activity** (A) Experimental design for LTM. (B) During the test session, freezing levels were reduced by calpain inhibitor when compared to the control group. (C) Experimental design for STM and LTM. (D) Calpain activity is not required for short-term memory (STM) ( $P = 0.41$ ) (control group,  $n = 8$ ; drug group,  $n = 7$ ). (E) Calpain activity is required for long-term memory (LTM) ( $P = 0.0001$ ) (control group,  $n = 8$ ; drug group,  $n = 7$ ). Data are shown in mean  $\pm$  SEM. \*\* Represents  $P < 0.005$ ; \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .

### 3.2. Calpain inhibition after training is time-dependent

A large body of evidence indicates that memory consolidation may be modulated up to 6 hours after learning (Mcgaugh, 2015). In our next experiments, we infused the calpain inhibitor at different time-points after training in order to verify the interval by which calpain

activity would affect memory consolidation. To address this question, we infused the calpain antagonist 1 or 6 h after the conditioning session (Fig. 2A). Two-way ANOVA revealed significant difference in time vs treatment interaction  $F_{1,22} = 9.723$ ;  $P = 0.005$ . Tukey's post hoc analysis has shown that PD150606 administration 1h after the conditioning session reduced freezing levels compared to the vehicle groups ( $P = 0.006$ ). However, when the drug was infused 6 h later, there was no difference between the drug and control groups ( $P = 0.94$ ), as shown in Figure 2B. These results show that the calpain activity is time-dependent following fear conditioning.

**Figure 2**



**Figure 2. Calpain inhibition after training is time-dependent** (A) Experimental design. (B) Animals infused with PD150606 1 hour after conditioning session ( $n = 6$ ) expressed lower freezing levels when compared to the control group ( $n = 8$ ). Nevertheless,



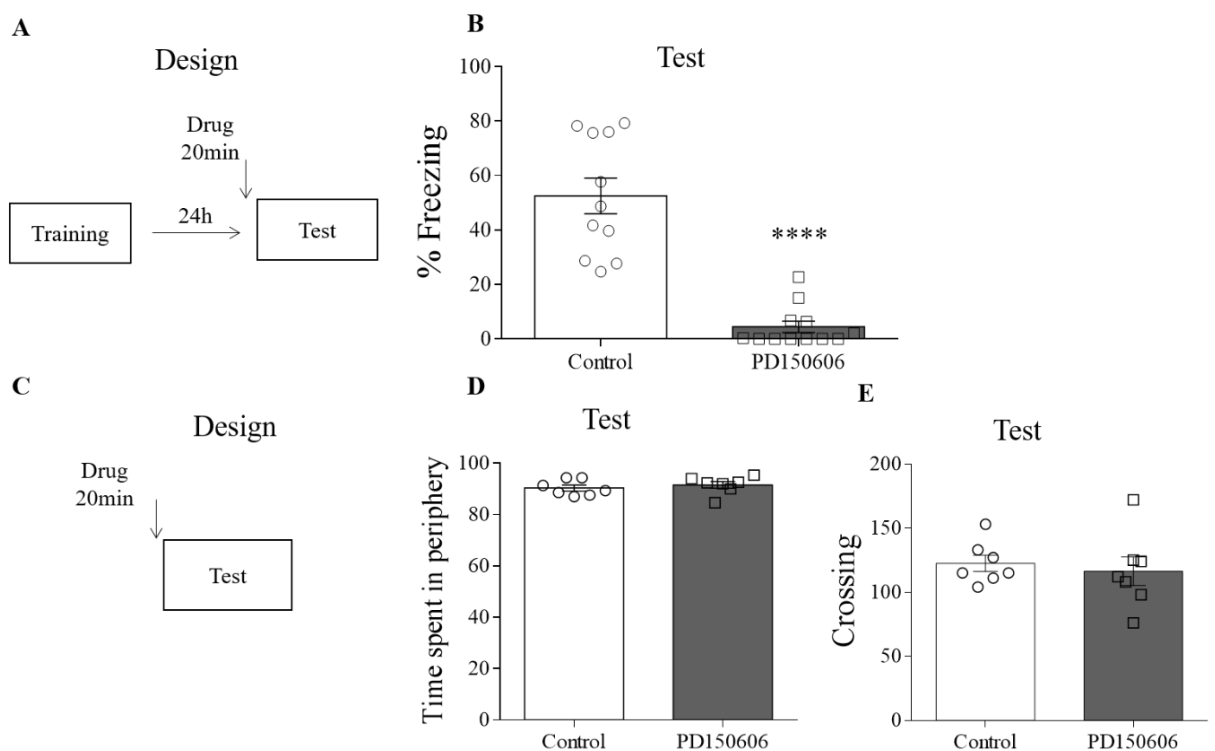
there was no difference between the drug (n = 6) and control (n = 6) groups when the PD150606 was infused 6h later. Data are shown in mean  $\pm$  SEM. \*\* Represents  $P < 0.005$ .

### ***3.3. Calpain controls fear memory retrieval***

It has been proposed that memory retrieval is an active process that requires protein synthesis and AMPA trafficking (Lopez et al., 2015). Moreover, we have recently shown that the inhibition of LIMK (an important actin dynamics regulator that controls cofilin) in the hippocampus impairs memory retrieval, suggesting that retrieval requires an ongoing balance between actin polymerization and depolymerization in order to retrieve memory (Lunardi et al., 2017). Since calpain is also closely related to actin dynamics, we hypothesized that it could be involved in memory retrieval.

In order to address this possibility, animals have been fear conditioned as described above and tested 48h later. Twenty minutes before the test session, the PD150606 was infused into the hippocampus. Animals treated with the calpain inhibitor expressed lower freezing levels compared with the control ( $T_{20} = 7.393$ ;  $P < 0.0001$ ; Fig 3B). This result indicates that calpain plays an important role in memory retrieval.

In order to rule out the possibility that the above results could induce non-mnemonic effects, animals received an intra-hippocampal infusion of PD150606 or vehicle and, 20 min later, they were tested in the open-field task. No difference was found between the groups either in the crossings ( $T_{12} = 0.478$ ;  $P = 0.64$ ) or in the time spent in the central arena ( $T_{12} = 0.684$ ;  $P = 0.51$ ).

**Figure 3**

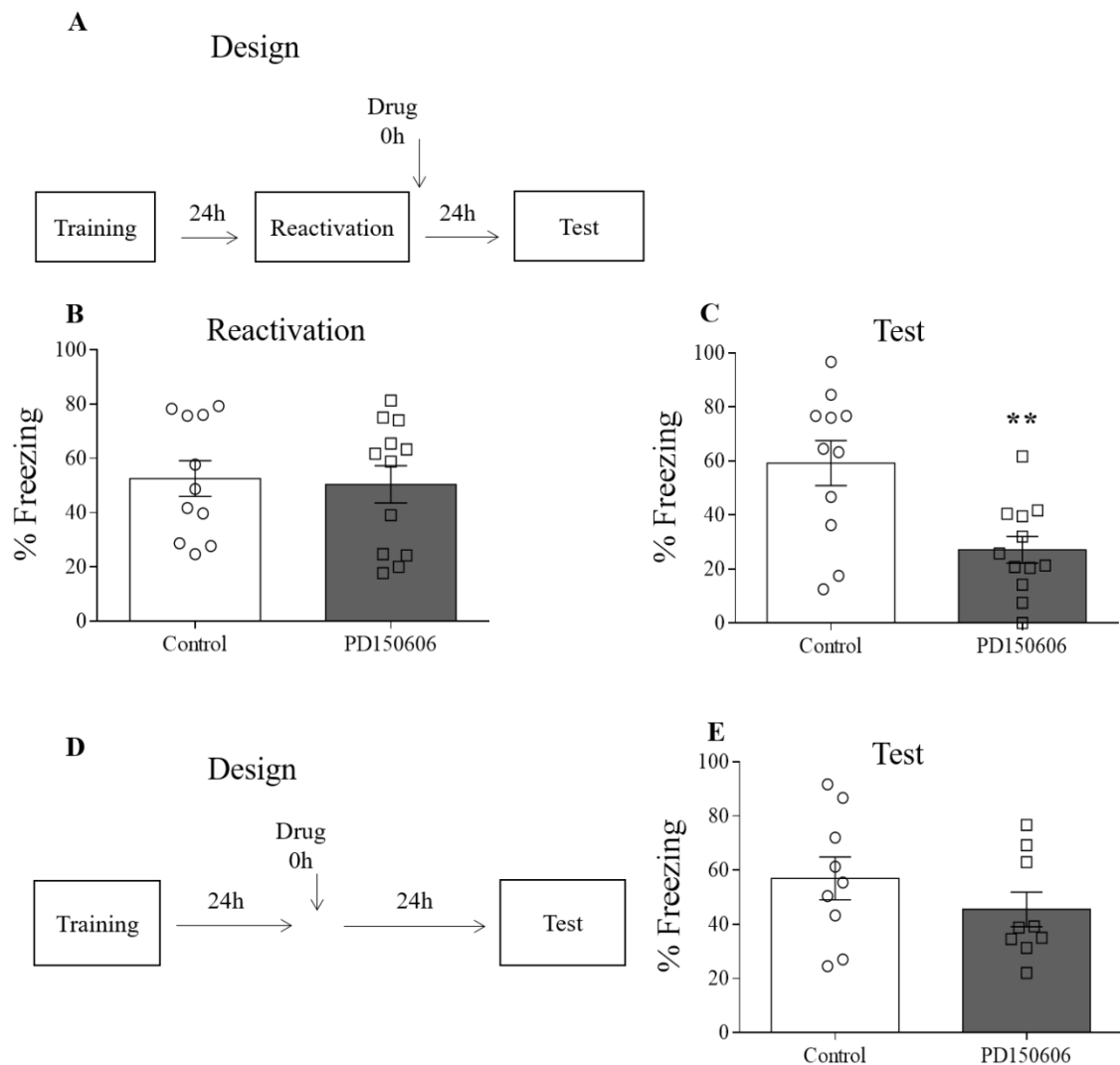
**Figure 3. Calpain controls fear memory retrieval** (A) Experimental design. (B) Animals infused with PD150606 pre-test ( $n = 11$ ) expressed lower freezing levels compared to the control group ( $n = 12$ ). (C) Experimental design of the open field task. (D) Drug ( $n = 7$ ) or vehicle ( $n = 7$ ) administration 20 minutes before the test did not influence the number of crossings ( $P = 0.64$ ), or (E) the time spent in the central arena ( $P = 0.51$ ). Data are shown in mean  $\pm$  SEM. \*\*\*\* Represents  $p < 0.0001$ .

### 3.4. Calpain inhibition impairs memory reconsolidation

Memory is a dynamic process and can be modified when reactivated. Retrieval may lead memory into a transient labile state followed by a new stabilization process called reconsolidation. The experiments shown above suggest that calpain is involved in active processes such as memory consolidation and retrieval. Hence, we hypothesized that calpain activity would also be required in memory reconsolidation. In order to assess this issue,

calpain inhibitor was administered immediately after reactivation, and the animals were tested 24h later (Fig. 4A). As expected, in the reactivation session, there was no difference in the freezing levels between the groups ( $T_{21} = 0.224$ ;  $P = 0.83$ ). However, inhibiting calpain after the reactivation session impaired memory reconsolidation ( $T_{21} = 3.397$ ;  $P = 0.003$ ). Additionally, we performed another experiment without reactivation in order to rule out any possible effect of PD150606 *per se*. No difference was found between the groups ( $T_{16} = 1.127$ ;  $P = 0.28$ ). Taken together, these results indicate that memory reactivation induces a plastic state that requires calpain activity to be reconsolidated.

**Figure 4**



**Figure 4. Calpain inhibition impairs memory reconsolidation** (A) Experimental design. (B) Control (n = 11) and PD150606 group (n = 12) did not differ during the reactivation session. (C) Calpain antagonist given immediately after reactivation impaired memory reconsolidation ( $P = 0.003$ ). (D) Experimental design (E) PD150606 has no effect when infused in animals in the absence of reactivation ( $P = 0.28$ ). Data are shown in mean  $\pm$  SEM. \*\* Represents  $P < 0.005$ .

#### 4. Discussion

The current study investigated the hippocampal role played by calpain on memory consolidation, retrieval, and reconsolidation in the contextual fear conditioning task in rats. We used the selective, potent, and cell-permeable non-peptide calpain inhibitor PD150606 ( $K_i = 0.21$  and  $0.37 \mu\text{M}$  for calpain 1 and 2, respectively), which binds to the  $\text{Ca}^{2+}$ -binding domain of calpain with high affinity only when the substrate is bound to the protease. It presents high specificity for calpains compared with other proteases. (Wang et al., 1996). We have first shown that the bilateral infusion of the calpain inhibitor PD150606 in the hippocampus immediately after training disrupted memory consolidation. This result agrees with previous findings showing that pharmacological (Zhu et al., 2015) or genetic (Briz et al., 2013) calpain interference disrupts LTP induction and memory (Baudry et al., 2015). Following learning, memory is unstable and vulnerable to interference. The process of stabilization takes some hours to occur until consolidated in a more stable form. We have shown that calpain activity is still required to modulate memory consolidation one hour, but not 6h after training.

Retrieval has long been thought to be a simple reactivation of the previously acquired engram. However, very recent studies have suggested that retrieval is not a simple passive readout of stored information. For instance, Lopez et al., (2015) have demonstrated that

ongoing protein synthesis is required to retrieve fear memories by controlling AMPAR expression in the PSD that takes place during memory expression. Moreover, we have described that the LIMK-Cofilin pathway, an important biochemical cascade that regulates actin dynamics, controls memory retrieval (Lunardi et al., 2017). These studies go in the same direction of the ones reported here, showing that calpain inhibition impairs retrieval. We suggest that there is an ongoing cytoskeleton remodeling process which is extremely well regulated and maintains the dendritic spine stability. Thus, if an important player involved in this process such as calpain is affected, then this finely-tuned balance is temporally disrupted. Considering that calpain inhibitor was infused 20 min before the test session, retrieval was affected by the treatment, impairing fear memory expression.

Memory is an extremely dynamic process and, even after consolidation, it can be modified when reactivated. Then, retrieval may lead memory into a transient labile state followed by a reconsolidation process. By affecting reconsolidation, it is possible to enhance, impair, or update memory with new information (Nader et al., 2000, Lee, 2008, 2009, De Oliveira Alvares et al., 2013). In order to be reconsolidated, memory must undergo a labile state, which will allow it to be modified. Then, it must be reconsolidated in order to persist. If the reconsolidation process is disrupted, the memory may be permanently impaired (Nader et al., 2000). We have shown that calpain plays an important role in memory reconsolidation since the hippocampal infusion of PD150606 immediately after reactivation disrupted memory. This result agrees with a recent study showing that memory reactivation increases calpain activity in the *nucleus accumbens* and is required to reconsolidate drug reward memory (Liang et al., 2017). This result suggests that reconsolidation induces a dendritic spine reorganization that must be rebuilt in order to maintain and/or update memory. Then, we propose that when memory is strengthened, weakened, or updated with new information,

the dendritic spines undergo a labile state before being rebuilt in a new morphology/size. This rebuilding process is controlled by actin dynamics regulators such as calpain.

Actin filaments (F-actin) are highly enriched in spines of glutamatergic neurons and provide the structural foundation for distinct dendritic spine shape; size and changes are associated with synaptic modification (Matus, 2000, Matus et al., 2000). It has been suggested that F-actin assembly is associated with dendritic spine enlargement, and disassembly with spine shrinkage (Bosch and Hayashi, 2012, Fortin et al., 2012). Assembly and disassembly of F-actin are primarily controlled by actin-binding proteins, such as cofilin1, LIMK, and calpain. The first well described neuronal target of calpain was spectrin (Riederer et al., 1987). Brain spectrin is the major cytoskeleton component of the neuronal membrane (Czogalla and Sikorski, 2005). Spectrin and polymerized actin are crosslinked in the dendritic spines, creating a resistance against depolymerization. The calcium entrance activates calpain, which degrades spectrin and promotes actin disassembling (Czogalla and Sikorski, 2005, Lynch and Gleichman, 2007).

It has been proposed that memory formation or LTP induction involves firstly the cytoskeleton degradation (Lynch and Baudry, 1984, Rudy, 2015a). In fact, actin dynamics regulate the AMPA receptor trafficking to be inserted in the PSD during LTP induction (Gu et al., 2010), indicating the central role played by the actin remodeling on synaptic plasticity. Then, in a few minutes followed by LTP induction, the dendritic spine is remodeled into a wider larger form (Honkura et al., 2008, Bosch and Hayashi, 2012).

Based on the important calpain function in the actin dynamics, it is not surprising that inhibiting calpain activity affects memory consolidation, retrieval, and reconsolidation. It is important to note that, although calpain has been historically implicated in the actin dynamics, recent findings have reported several other important roles played by calpain 1 and 2, such as controlling protein synthesis (Briz and Baudry, 2016). In accordance with a model proposed

by Baudry & Bi, 2016, the  $\text{Ca}^{2+}$  influx through NMDA receptor stimulation during LTP induction or learning activates rapidly calpain-1, which cleaves a number of regulatory and cytoskeletal proteins such as spectrin, SCOP (an ERK inhibitor), talin, drebrin, and MARCKS, leading to the ERK pathway activation and the reorganization of actin filaments. On the other hand, calpain-2 is activated after a few minutes, inducing protein synthesis involved in plasticity such as CAMKII, Arc, and RhoA, by activating mTOR through the PTEN cleavage. Interestingly, one of these proteins is SCOP, which inhibits ERK, therefore limiting its action during consolidation. Thus, calpain 1 and 2 may play opposite roles in memory processes (Liu et al., 2016; Briz & Baudry, 2016). Based on such model, it is possible to suggest that the lower 1 $\mu$ M dose, as presented in this study, affects primarily calpain 1, whereas the higher doses affect both isoforms, leading to a distinct outcome. Indeed, a recent study has shown that a calpain-2 inhibitor enhances memory and rescues the memory deficit expressed in calpain 1 knockout animals (Liu et al., 2016). These recent findings bring up a far more complex view of the role played by calpains in the regulation of memory and open a new and interesting avenue of investigation.

In conclusion, we propose that the calcium influx from NMDA receptors activates calpain in order to degrade its substrates and promote contextual fear memory consolidation, retrieval, and reconsolidation.

### **Acknowledgements**

This work was supported by the Brazilian government agencies CAPES and MCTI/CNPQ/Universal 14/2014 (Grant: CNPQ/Universal 14/2014 - process number 440413/2014-1). The authors acknowledge Zelma Regina V. de Almeida for her kind technical assistance.

## References

- Amini, M., Ma, C. L., Farazifard, R., Zhu, G., Zhang, Y., Vanderluit, J., . . . Park, D. S. (2013). Conditional disruption of calpain in the CNS alters dendrite morphology, impairs LTP, and promotes neuronal survival following injury. *J Neurosci*, *33*(13), 5773-5784. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4247-12.2013
- Baudry, M., & Bi, X. (2013). Learning and memory: an emergent property of cell motility. *Neurobiol Learn Mem*, *104*, 64-72. doi: 10.1016/j.nlm.2013.04.012
- Baudry, M., & Bi, X. (2016). Calpain-1 and Calpain-2: The Yin and Yang of Synaptic Plasticity and Neurodegeneration. *Trends Neurosci*, *39*(4), 235-245. doi: 10.1016/j.tins.2016.01.007
- Baudry, M., Zhu, G., Liu, Y., Wang, Y., Briz, V., & Bi, X. (2015). Multiple cellular cascades participate in long-term potentiation and in hippocampus-dependent learning. *Brain Res*, *1621*, 73-81. doi: 10.1016/j.brainres.2014.11.033
- Blanchard, R. J., & Blanchard, D. C. (1969). Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli. *J Comp Physiol Psychol*, *68*(1), 129-135.
- Bosch, M., & Hayashi, Y. (2012). Structural plasticity of dendritic spines. *Curr Opin Neurobiol*, *22*(3), 383-388. doi: S0959-4388(11)00146-2 [pii]  
10.1016/j.conb.2011.09.002
- Briz, V., & Baudry, M. (2016). Calpains: Master Regulators of Synaptic Plasticity. *Neuroscientist*. doi: 1073858416649178 [pii]  
10.1177/1073858416649178
- Briz, V., Hsu, Y. T., Li, Y., Lee, E., Bi, X., & Baudry, M. (2013). Calpain-2-mediated PTEN degradation contributes to BDNF-induced stimulation of dendritic protein synthesis. *J Neurosci*, *33*(10), 4317-4328. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4907-12.2013
- Czogalla, A., & Sikorski, A. F. (2005). Spectrin and calpain: a 'target' and a 'sniper' in the pathology of neuronal cells. *Cell Mol Life Sci*, *62*(17), 1913-1924. doi: 10.1007/s00018-005-5097-0
- De Oliveira Alvares, L., Crestani, A. P., Cassini, L. F., Haubrich, J., Santana, F., & Quillfeldt, J. A. (2013). Reactivation enables memory updating, precision-keeping and



strengthening: exploring the possible biological roles of reconsolidation.  
*Neuroscience*, 244, 42-48. doi: S0306-4522(13)00323-0 [pii]

10.1016/j.neuroscience.2013.04.005

Dong, Z., Han, H., Li, H., Bai, Y., Wang, W., Tu, M., . . . Wang, Y. T. (2015). Long-term potentiation decay and memory loss are mediated by AMPAR endocytosis. *J Clin Invest*, 125(1), 234-247. doi: 77888 [pii]

10.1172/JCI77888

Donkor, I. O. (2015). An updated patent review of calpain inhibitors (2012 - 2014). *Expert Opin Ther Pat*, 25(1), 17-31. doi: 10.1517/13543776.2014.982534

Fortin, D. A., Srivastava, T., & Soderling, T. R. (2012). Structural modulation of dendritic spines during synaptic plasticity. *Neuroscientist*, 18(4), 326-341. doi: 1073858411407206 [pii]

10.1177/1073858411407206

Frankfurt, M., & Luine, V. (2015). The evolving role of dendritic spines and memory: Interaction(s) with estradiol. *Horm Behav*, 74, 28-36. doi: S0018-506X(15)00085-9 [pii]

10.1016/j.yhbeh.2015.05.004

Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W., & Cong, J. (2003). The calpain system. *Physiol Rev*, 83(3), 731-801. doi: 10.1152/physrev.00029.2002

Gu, J., Lee, C. W., Fan, Y., Komlos, D., Tang, X., Sun, C., . . . Zheng, J. Q. (2010). ADF/cofilin-mediated actin dynamics regulate AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Nat Neurosci*, 13(10), 1208-1215. doi: nn.2634 [pii]

10.1038/nn.2634

Honkura, N., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Ellis-Davies, G. C., & Kasai, H. (2008). The subspine organization of actin fibers regulates the structure and plasticity of dendritic spines. *Neuron*, 57(5), 719-729. doi: 10.1016/j.neuron.2008.01.013

Lee, J. L. (2008). Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nat Neurosci*, 11(11), 1264-1266. doi: nn.2205 [pii]

10.1038/nn.2205

- Lee, J. L. (2009). Reconsolidation: maintaining memory relevance. *Trends Neurosci*, 32(8), 413-420. doi: 10.1016/j.tins.2009.05.002
- Liang, J., Li, J. L., Han, Y., Luo, Y. X., Xue, Y. X., Zhang, Y., . . . Shi, J. (2017). Calpain-GRIP Signaling in Nucleus Accumbens Core Mediates the Reconsolidation of Drug Reward Memory. *J Neurosci*, 37(37), 8938-8951. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0703-17.2017
- Lopez, J., Gamache, K., Schneider, R., & Nader, K. (2015). Memory retrieval requires ongoing protein synthesis and NMDA receptor activity-mediated AMPA receptor trafficking. *J Neurosci*, 35(6), 2465-2475. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0735-14.2015
- Lunardi, P., Sachser, R. M., Sierra, R. O., Pedraza, L. K., Medina, C., de la Fuente, V., . . . de Oliveira Alvares, L. (2017). Effects of Hippocampal LIMK Inhibition on Memory Acquisition, Consolidation, Retrieval, Reconsolidation, and Extinction. *Mol Neurobiol*. doi: 10.1007/s12035-016-0361-x
- 10.1007/s12035-016-0361-x [pii]
- Lynch, D. R., & Gleichman, A. J. (2007). Picking up the pieces: the roles of functional remnants of calpain-mediated proteolysis. *Neuron*, 53(3), 317-319. doi: 10.1016/j.neuron.2007.01.014
- Lynch, G., & Baudry, M. (1984). The biochemistry of memory: a new and specific hypothesis. *Science*, 224(4653), 1057-1063.
- Maiti, P., Manna, J., Ilavazhagan, G., Rossignol, J., & Dunbar, G. L. (2015). Molecular regulation of dendritic spine dynamics and their potential impact on synaptic plasticity and neurological diseases. *Neurosci Biobehav Rev*, 59, 208-237. doi: 10.1016/j.neubiorev.2015.09.020
- Matus, A. (2000). Actin-based plasticity in dendritic spines. *Science*, 290(5492), 754-758. doi: 10.1126/science.1071000 [pii]
- Matus, A., Brinkhaus, H., & Wagner, U. (2000). Actin dynamics in dendritic spines: a form of regulated plasticity at excitatory synapses. *Hippocampus*, 10(5), 555-560. doi: 10.1002/1098-1063(200010)10:5<555::AID-HIPO5>3.0.CO;2-Z
- McGaugh, J. L. (2000). Memory--a century of consolidation. *Science*, 287(5451), 248-251.
- Nader, K., Schafe, G. E., & Le Douarin, J. E. (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, 406(6797), 722-726. doi: 10.1038/35021052

- Oliver, M. W., Baudry, M., & Lynch, G. (1989). The protease inhibitor leupeptin interferes with the development of LTP in hippocampal slices. *Brain Res*, *505*(2), 233-238.
- Riederer, B. M., Zagon, I. S., & Goodman, S. R. (1987). Brain spectrin(240/235) and brain spectrin(240/235E): differential expression during mouse brain development. *J Neurosci*, *7*(3), 864-874.
- Rudy, J. W. (2015a). Actin dynamics and the evolution of the memory trace. *Brain Res*, *1621*, 17-28. doi: 10.1016/j.brainres.2014.12.007
- Rudy, J. W. (2015b). Variation in the persistence of memory: An interplay between actin dynamics and AMPA receptors. *Brain Res*, *1621*, 29-37. doi: 10.1016/j.brainres.2014.12.009
- Sala, C., & Segal, M. (2014). Dendritic spines: the locus of structural and functional plasticity. *Physiol Rev*, *94*(1), 141-188. doi: 10.1152/physrev.00012.2013
- Vanderklish, P., Bednarski, E., & Lynch, G. (1996). Translational suppression of calpain blocks long-term potentiation. *Learn Mem*, *3*(2-3), 209-217.
- Wang, K. K., Posner, A., Raser, K. J., Buroker-Kilgore, M., Nath, R., Hajimohammadreza, I., . . . Yuen, P. W. (1996). Alpha-mercaptoacrylic acid derivatives as novel selective calpain inhibitors. *Adv Exp Med Biol*, *389*, 95-101.
- Zadran, S., Jourdi, H., Rostamiani, K., Qin, Q., Bi, X., & Baudry, M. (2010). Brain-derived neurotrophic factor and epidermal growth factor activate neuronal m-calpain via mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation. *J Neurosci*, *30*(3), 1086-1095. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5120-09.2010
- Zhu, G., Liu, Y., Wang, Y., Bi, X., & Baudry, M. (2015). Different patterns of electrical activity lead to long-term potentiation by activating different intracellular pathways. *J Neurosci*, *35*(2), 621-633. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2193-14.2015

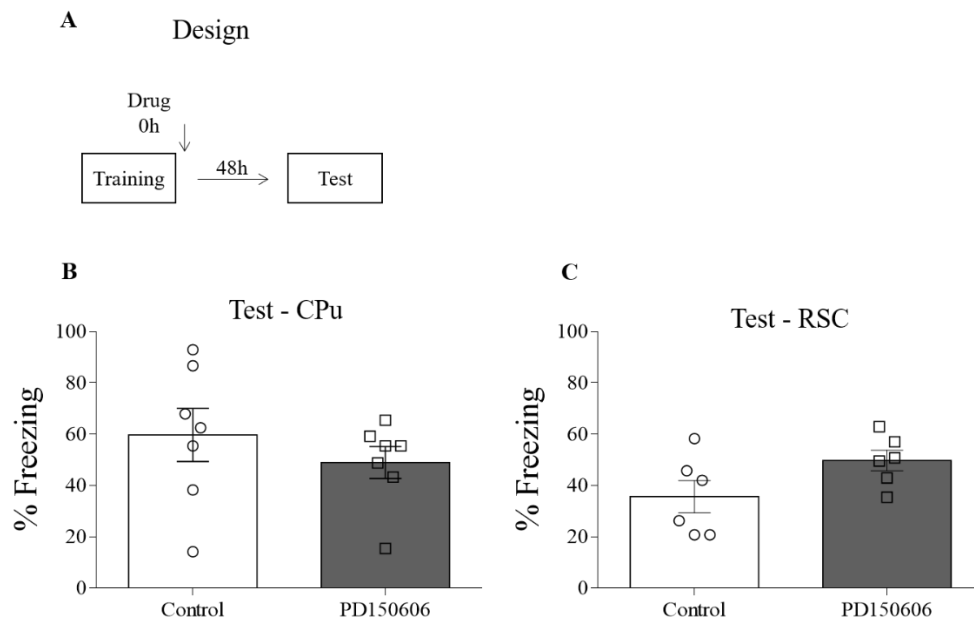
## 5 CONCLUSÃO

Nós podemos concluir que:

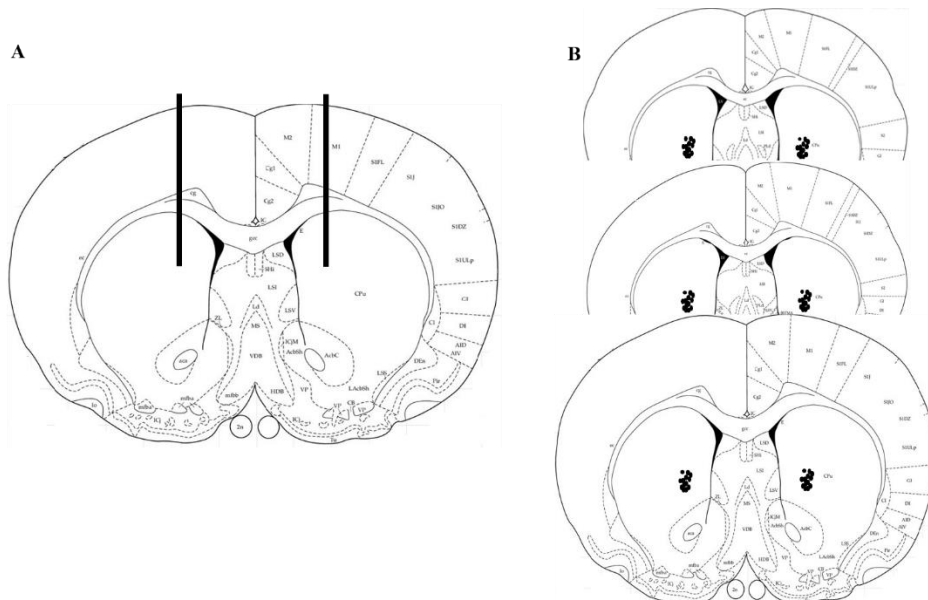
- A atividade de ambas as isoformas da calpaína são cruciais para a consolidação da memória aversiva em ratos *Wistar*, pois a sua inibição acarretou em prejuízo nesse processo;
- A concentração mais eficaz do antagonista foi de 1  $\mu\text{M}$ ;
- Os mecanismos subjacentes dessa protease não são requeridos para a memória de curta duração, apenas para a memória de longa duração, visto que as alterações estruturais e moleculares são apenas fundamentais para a LTM;
- A atividade dessa protease só é essencial no início do processo de consolidação, ou seja, apenas no período mais susceptível de interferência – na janela de consolidação, pois seis horas após o treino a infusão da PD150606 não tem mais efeitos significativos;
- A inibição da calpaína prejudicou severamente a evocação da memória aversiva, sendo assim, sugerimos que o processo de evocação seja caracterizado por ser dinâmico e que envolve uma certa plasticidade sináptica;
- Os mecanismos de reorganização sináptica que ocorrem durante a labilização do traço da memória são dependentes da atividade da calpaína, pois a sua inibição acarretou em prejuízos na reconsolidação da memória.

Em conjunto, concluímos que a atividade dessa protease está associada com períodos em que o traço da memória se torna lábil e passível de modulação, dessa forma a sua atividade se mostra essencial para a formação, expressão e reconsolidação da memória aversiva.

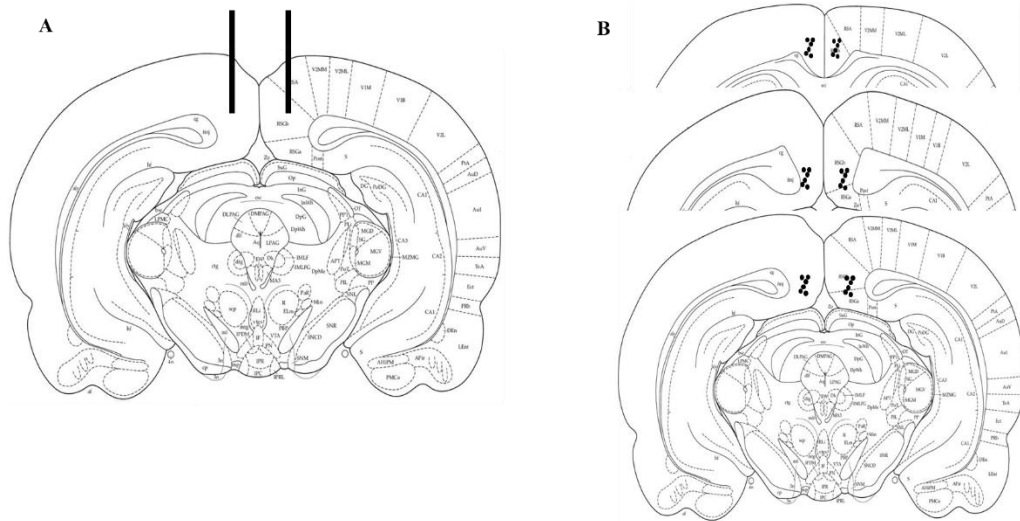
## 6 FIGURAS SUPLEMENTARES



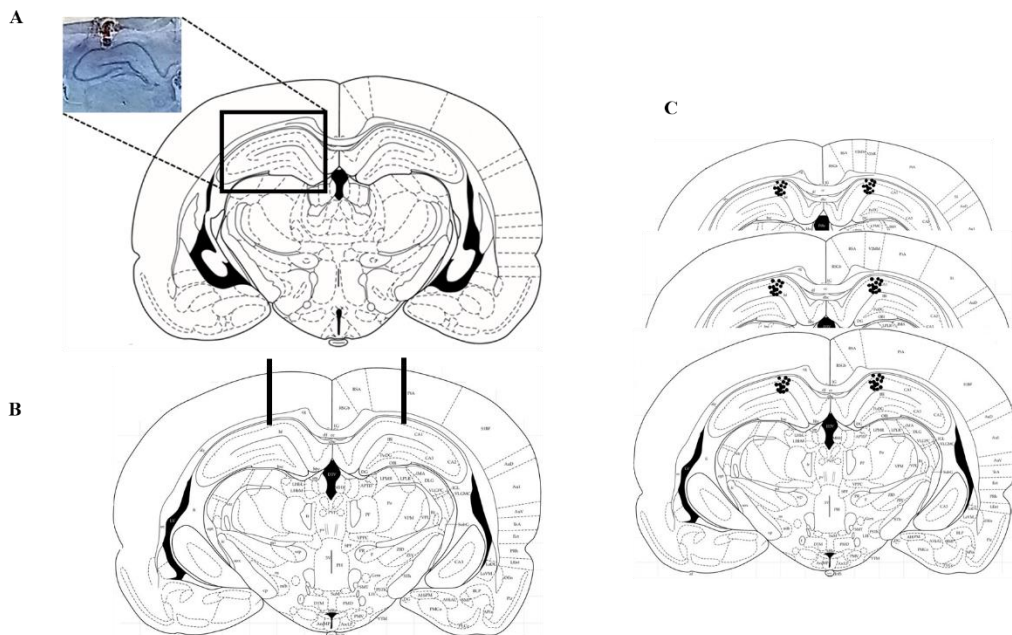
**Figura 1.** Infusões do antagonista das calpaínas fora do hipocampo dorsal. **(A)** Protocolo experimental. **(B)** Teste da consolidação com infusão no CPu (controles  $n = 7$  e droga  $n = 7$ ;  $T_{12} = 0.891$ ;  $p = 0.39$ ). **(C)** Teste da consolidação com infusão no RSC (controles  $n = 6$  e droga  $n = 6$ ;  $T_{10} = 1.891$ ;  $p = 0.09$ ). Os dados são expressos em média  $\pm$  SEM.



**Figura 2.** Representação histológica da localização das infusões do antagonista no *Striatum* – CPu. **(A)** Imagem representativa mostrando a localização das cânulas. **(B)** Cada ponto representa um animal.



**Figura 3.** Representação histológica da localização das infusões do antagonista no Córtex Retrosplenial – RSC. (A) Imagem representativa mostrando a localização das cânulas. (B) Cada ponto representa um animal.



**Figura 4.** Representação histológica da localização das infusões do antagonista no hipocampo dorsal. (A) Fotomicrografia mostrando a localização das cânulas – magnificação de 4X (técnica de Nissl). (B) Imagem representativa da localização das cânulas. (C) Cada ponto representa um animal escolhido de forma aleatória de todos os experimentos.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abel T, Lattal KM (2001) Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Curr Opin Neurobiol* 11:180-187.
- Amini M, Ma CL, Farazifard R, Zhu G, Zhang Y, Vanderluit J, Zoltewicz JS, Hage F, Savitt JM, Lagace DC, Slack RS, Beique JC, Baudry M, Greer PA, Bergeron R, Park DS (2013) Conditional disruption of calpain in the CNS alters dendrite morphology, impairs LTP, and promotes neuronal survival following injury. *J Neurosci* 33:5773-5784.
- Baker KD, Edwards TM, Rickard NS (2013) The role of intracellular calcium stores in synaptic plasticity and memory consolidation. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 37:1211-1239.
- Barad M (2006) Divide and conquer: an L-type voltage-gated calcium channel subtype finds a role in conditioned fear. *Learn Mem* 13:560-561.
- Baudry M, Bi X (2013) Learning and memory: an emergent property of cell motility. *Neurobiol Learn Mem* 104:64-72.
- Baudry M, Bi X (2016) Calpain-1 and Calpain-2: The Yin and Yang of Synaptic Plasticity and Neurodegeneration. *Trends Neurosci* 39:235-245.
- Baudry M, Zhu G, Liu Y, Wang Y, Briz V, Bi X (2015) Multiple cellular cascades participate in long-term potentiation and in hippocampus-dependent learning. *Brain research* 1621:73-81.
- Bertipaglia I, Carafoli E (2007) Calpains and human disease. *Sub-cellular biochemistry* 45:29-53.
- Bi R, Rong Y, Bernard A, Khrestchatisky M, Baudry M (2000) Src-mediated tyrosine phosphorylation of NR2 subunits of N-methyl-D-aspartate receptors protects from calpain-mediated truncation of their C-terminal domains. *The Journal of biological chemistry* 275:26477-26483.
- Blanchard RJ, Blanchard DC (1969) Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli. *J Comp Physiol Psychol* 68:129-135.
- Bosch M, Hayashi Y (2012) Structural plasticity of dendritic spines. *Curr Opin Neurobiol* 22:383-388.
- Briz V, Baudry M (2016) Calpains: Master Regulators of Synaptic Plasticity. *Neuroscientist*.
- Briz V, Hsu YT, Li Y, Lee E, Bi X, Baudry M (2013) Calpain-2-mediated PTEN degradation contributes to BDNF-induced stimulation of dendritic protein synthesis. *J Neurosci* 33:4317-4328.
- Cavazzini M, Bliss T, Emptage N (2005) Ca<sup>2+</sup> and synaptic plasticity. *Cell calcium* 38:355-367.
- Chan KT, Bennin DA, Huttenlocher A (2010) Regulation of adhesion dynamics by calpain-mediated proteolysis of focal adhesion kinase (FAK). *The Journal of biological chemistry* 285:11418-11426.
- Cortesio CL, Perrin BJ, Bennin DA, Huttenlocher A (2010) Actin-binding protein-1 interacts with WASp-interacting protein to regulate growth factor-induced dorsal ruffle formation. *Molecular biology of the cell* 21:186-197.
- Croall DE, Ersfeld K (2007) The calpains: modular designs and functional diversity. *Genome biology* 8:218.
- Czogalla A, Sikorski AF (2005) Spectrin and calpain: a 'target' and a 'sniper' in the pathology of neuronal cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 62:1913-1924.
- Dayton WR, Goll DE, Zece MG, Robson RM, Reville WJ (1976) A Ca<sup>2+</sup>-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Purification from porcine muscle. *Biochemistry* 15:2150-2158.

- De Oliveira Alvares L, Crestani AP, Cassini LF, Haubrich J, Santana F, Quillfeldt JA (2013) Reactivation enables memory updating, precision-keeping and strengthening: exploring the possible biological roles of reconsolidation. *Neuroscience* 244:42-48.
- Dear TN, Boehm T (2001) Identification and characterization of two novel calpain large subunit genes. *Gene* 274:245-252.
- Deng W, Aimone JB, Gage FH (2010) New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci* 11:339-350.
- Dong Z, Han H, Li H, Bai Y, Wang W, Tu M, Peng Y, Zhou L, He W, Wu X, Tan T, Liu M, Zhou W, Jin W, Zhang S, Sacktor TC, Li T, Song W, Wang YT (2015) Long-term potentiation decay and memory loss are mediated by AMPAR endocytosis. *J Clin Invest* 125:234-247.
- Donkor IO (2015) An updated patent review of calpain inhibitors (2012 - 2014). *Expert opinion on therapeutic patents* 25:17-31.
- Dudai Y (2012) The restless engram: consolidations never end. *Annu Rev Neurosci* 35:227-247.
- Dudai Y, Karni A, Born J (2015) The Consolidation and Transformation of Memory. *Neuron* 88:20-32.
- Ehlers MD (2003) Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system. *Nat Neurosci* 6:231-242.
- Eilam-Stock T, Serrano P, Frankfurt M, Luine V (2012) Bisphenol-A impairs memory and reduces dendritic spine density in adult male rats. *Behav Neurosci* 126:175-185.
- El-Husseini Ael D, Schnell E, Dakoji S, Sweeney N, Zhou Q, Prange O, Gauthier-Campbell C, Aguilera-Moreno A, Nicoll RA, Brecht DS (2002) Synaptic strength regulated by palmitate cycling on PSD-95. *Cell* 108:849-863.
- Fanselow MS, Poulos AM (2005) The neuroscience of mammalian associative learning. *Annual review of psychology* 56:207-234.
- Fortin DA, Srivastava T, Soderling TR (2012) Structural modulation of dendritic spines during synaptic plasticity. *Neuroscientist* 18:326-341.
- Frankfurt M, Luine V (2015) The evolving role of dendritic spines and memory: Interaction(s) with estradiol. *Horm Behav* 74:28-36.
- Gellerman DM, Bi X, Baudry M (1997) NMDA receptor-mediated regulation of AMPA receptor properties in organotypic hippocampal slice cultures. *J Neurochem* 69:131-136.
- Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J (2003) The calpain system. *Physiological reviews* 83:731-801.
- Goodman SR, Zimmer WE, Clark MB, Zagon IS, Barker JE, Bloom ML (1995) Brain spectrin: of mice and men. *Brain research bulletin* 36:593-606.
- Gu J, Lee CW, Fan Y, Komlos D, Tang X, Sun C, Yu K, Hartzell HC, Chen G, Bamburg JR, Zheng JQ (2010) ADF/cofilin-mediated actin dynamics regulate AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Nat Neurosci* 13:1208-1215.
- Guroff G (1964) A Neutral, Calcium-Activated Proteinase from the Soluble Fraction of Rat Brain. *The Journal of biological chemistry* 239:149-155.
- Guttmann RP, Sokol S, Baker DL, Simpkins KL, Dong Y, Lynch DR (2002) Proteolysis of the N-methyl-D-aspartate receptor by calpain in situ. *J Pharmacol Exp Ther* 302:1023-1030.
- Hell JW, Westenbroek RE, Breeze LJ, Wang KK, Chavkin C, Catterall WA (1996) N-methyl-D-aspartate receptor-induced proteolytic conversion of postsynaptic class C L-type calcium channels in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:3362-3367.



- Honkura N, Matsuzaki M, Noguchi J, Ellis-Davies GC, Kasai H (2008) The subspine organization of actin fibers regulates the structure and plasticity of dendritic spines. *Neuron* 57:719-729.
- Hotulainen P, Hoogenraad CC (2010) Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *J Cell Biol* 189:619-629.
- Huston RB, Krebs EG (1968) Activation of skeletal muscle phosphorylase kinase by  $Ca^{2+}$ . II. Identification of the kinase activating factor as a proteolytic enzyme. *Biochemistry* 7:2116-2122.
- Iwakura Y, Nagano T, Kawamura M, Horikawa H, Ibaraki K, Takei N, Nawa H (2001) N-methyl-D-aspartate-induced alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor down-regulation involves interaction of the carboxyl terminus of GluR2/3 with Pick1. Ligand-binding studies using Sindbis vectors carrying AMPA receptor decoys. *The Journal of biological chemistry* 276:40025-40032.
- Izquierdo I, McGaugh JL (2000) Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. *Behavioural pharmacology* 11:517-534.
- Izquierdo I, Medina JH, Vianna MR, Izquierdo LA, Barros DM (1999) Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav Brain Res* 103:1-11.
- Jedlicka P, Vlachos A, Schwarzacher SW, Deller T (2008) A role for the spine apparatus in LTP and spatial learning. *Behav Brain Res* 192:12-19.
- Jourdi H, Iwakura Y, Narisawa-Saito M, Ibaraki K, Xiong H, Watanabe M, Hayashi Y, Takei N, Nawa H (2003) Brain-derived neurotrophic factor signal enhances and maintains the expression of AMPA receptor-associated PDZ proteins in developing cortical neurons. *Developmental biology* 263:216-230.
- Kandel ER (2001) The molecular biology of memory storage: a dialog between genes and synapses. *Bioscience reports* 21:565-611.
- Kandel ER, Dudai Y, Mayford MR (2014) The molecular and systems biology of memory. *Cell* 157:163-186.
- Kasai H, Fukuda M, Watanabe S, Hayashi-Takagi A, Noguchi J (2010) Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends Neurosci* 33:121-129.
- Kasai H, Matsuzaki M, Noguchi J, Yasumatsu N, Nakahara H (2003) Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends Neurosci* 26:360-368.
- Kim JJ, Jung MW (2006) Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: a critical review. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 30:188-202.
- Kim M, McGaugh JL (1992) Effects of intra-amygdala injections of NMDA receptor antagonists on acquisition and retention of inhibitory avoidance. *Brain research* 585:35-48.
- Klockner U, Mikala G, Varadi M, Varadi G, Schwartz A (1995) Involvement of the carboxyl-terminal region of the alpha 1 subunit in voltage-dependent inactivation of cardiac calcium channels. *The Journal of biological chemistry* 270:17306-17310.
- Kretsinger RH (1997) EF-hands embrace. *Nature structural biology* 4:514-516.
- Laube B, Hirai H, Sturgess M, Betz H, Kuhse J (1997) Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit. *Neuron* 18:493-503.
- LeDoux JE (2000) Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23:155-184.
- Lee JL (2008) Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nat Neurosci* 11:1264-1266.
- Lee JL (2009) Reconsolidation: maintaining memory relevance. *Trends Neurosci* 32:413-420.
- Leuner B, Falduo J, Shors TJ (2003) Associative memory formation increases the observation of dendritic spines in the hippocampus. *J Neurosci* 23:659-665.



- Levy AD, Omar MH, Koleske AJ (2014) Extracellular matrix control of dendritic spine and synapse structure and plasticity in adulthood. *Front Neuroanat* 8:116.
- Liang J, Li JL, Han Y, Luo YX, Xue YX, Zhang Y, Zhang Y, Zhang LB, Chen ML, Lu L, Shi J (2017) Calpain-GRIP Signaling in Nucleus Accumbens Core Mediates the Reconsolidation of Drug Reward Memory. *J Neurosci* 37:8938-8951.
- Lopez J, Gamache K, Schneider R, Nader K (2015) Memory retrieval requires ongoing protein synthesis and NMDA receptor activity-mediated AMPA receptor trafficking. *J Neurosci* 35:2465-2475.
- Lu X, Rong Y, Bi R, Baudry M (2000) Calpain-mediated truncation of rat brain AMPA receptors increases their Triton X-100 solubility. *Brain research* 863:143-150.
- Lunardi P, Sachser RM, Sierra RO, Pedraza LK, Medina C, de la Fuente V, Romano A, Quillfeldt JA, de Oliveira Alvares L (2017) Effects of Hippocampal LIMK Inhibition on Memory Acquisition, Consolidation, Retrieval, Reconsolidation, and Extinction. *Mol Neurobiol*.
- Lynch DR, Gleichman AJ (2007) Picking up the pieces: the roles of functional remnants of calpain-mediated proteolysis. *Neuron* 53:317-319.
- Lynch DR, Guttman RP (2001) NMDA receptor pharmacology: perspectives from molecular biology. *Current drug targets* 2:215-231.
- Lynch G, Baudry M (1984) The biochemistry of memory: a new and specific hypothesis. *Science* 224:1057-1063.
- Maiti P, Manna J, Ilavazhagan G, Rossignol J, Dunbar GL (2015) Molecular regulation of dendritic spine dynamics and their potential impact on synaptic plasticity and neurological diseases. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 59:208-237.
- Maren S, Quirk GJ (2004) Neuronal signalling of fear memory. *Nat Rev Neurosci* 5:844-852.
- Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GC, Kasai H (2004) Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429:761-766.
- Matus A (2000) Actin-based plasticity in dendritic spines. *Science* 290:754-758.
- Matus A, Brinkhaus H, Wagner U (2000) Actin dynamics in dendritic spines: a form of regulated plasticity at excitatory synapses. *Hippocampus* 10:555-560.
- Maviel T, Durkin TP, Menzaghi F, Bontempi B (2004) Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory. *Science* 305:96-99.
- McGaugh JL (2000) Memory--a century of consolidation. *Science* 287:248-251.
- McGaugh JL (2015) Consolidating memories. *Annual review of psychology* 66:1-24.
- Medina JH, Schroder N, Izquierdo I (1999) Two different properties of short- and long-term memory. *Behav Brain Res* 103:119-121.
- Mellgren SI (1980) [Alzheimer-type dementia. Possible relation to hypofunction of the cholinergic central nervous system]. *Tidsskrift for den Norske laegeforening : tidsskrift for praktisk medicin, ny raekke* 100:1355-1356.
- Migues PV, Hardt O, Wu DC, Gamache K, Sacktor TC, Wang YT, Nader K (2010) PKMzeta maintains memories by regulating GluR2-dependent AMPA receptor trafficking. *Nat Neurosci* 13:630-634.
- Migues PV, Liu L, Archbold GE, Einarsson EO, Wong J, Bonasia K, Ko SH, Wang YT, Hardt O (2016) Blocking Synaptic Removal of GluA2-Containing AMPA Receptors Prevents the Natural Forgetting of Long-Term Memories. *J Neurosci* 36:3481-3494.
- Mulkey RM, Malenka RC (1992) Mechanisms underlying induction of homosynaptic long-term depression in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* 9:967-975.
- Murachi T, Tanaka K, Hatanaka M, Murakami T (1980) Intracellular Ca<sup>2+</sup>-dependent protease (calpain) and its high-molecular-weight endogenous inhibitor (calpastatin). *Advances in enzyme regulation* 19:407-424.

- Nabavi S, Fox R, Proulx CD, Lin JY, Tsien RY, Malinow R (2014) Engineering a memory with LTD and LTP. *Nature* 511:348-352.
- Nader K, Einarsson EO (2010) Memory reconsolidation: an update. *Ann N Y Acad Sci* 1191:27-41.
- Nader K, Schafe GE, Le Doux JE (2000) Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* 406:722-726.
- Newpher TM, Ehlers MD (2009) Spine microdomains for postsynaptic signaling and plasticity. *Trends Cell Biol* 19:218-227.
- Niethammer M, Kim E, Sheng M (1996) Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases. *J Neurosci* 16:2157-2163.
- Noguchi J, Matsuzaki M, Ellis-Davies GC, Kasai H (2005) Spine-neck geometry determines NMDA receptor-dependent Ca<sup>2+</sup> signaling in dendrites. *Neuron* 46:609-622.
- O'Keefe J, Dostrovsky J (1971) The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain research* 34:171-175.
- Ohno S, Emori Y, Imajoh S, Kawasaki H, Kisaragi M, Suzuki K (1984) Evolutionary origin of a calcium-dependent protease by fusion of genes for a thiol protease and a calcium-binding protein? *Nature* 312:566-570.
- Oliver MW, Baudry M, Lynch G (1989) The protease inhibitor leupeptin interferes with the development of LTP in hippocampal slices. *Brain research* 505:233-238.
- Ono Y, Sorimachi H (2012) Calpains: an elaborate proteolytic system. *Biochimica et biophysica acta* 1824:224-236.
- Ravulapalli R, Campbell RL, Gauthier SY, Dhe-Paganon S, Davies PL (2009) Distinguishing between calpain heterodimerization and homodimerization. *The FEBS journal* 276:973-982.
- Restivo L, Vetere G, Bontempi B, Ammassari-Teule M (2009) The formation of recent and remote memory is associated with time-dependent formation of dendritic spines in the hippocampus and anterior cingulate cortex. *J Neurosci* 29:8206-8214.
- Riederer BM, Zagon IS, Goodman SR (1987) Brain spectrin(240/235) and brain spectrin(240/235E): differential expression during mouse brain development. *J Neurosci* 7:864-874.
- Rudy JW (2015a) Actin dynamics and the evolution of the memory trace. *Brain research* 1621:17-28.
- Rudy JW (2015b) Variation in the persistence of memory: An interplay between actin dynamics and AMPA receptors. *Brain research* 1621:29-37.
- Sala C, Segal M (2014) Dendritic spines: the locus of structural and functional plasticity. *Physiological reviews* 94:141-188.
- Siman R, Baudry M, Lynch G (1984) Brain fodrin: substrate for calpain I, an endogenous calcium-activated protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:3572-3576.
- Siman R, Noszek JC (1988) Excitatory amino acids activate calpain I and induce structural protein breakdown in vivo. *Neuron* 1:279-287.
- Simpkins KL, Guttman RP, Dong Y, Chen Z, Sokol S, Neumar RW, Lynch DR (2003) Selective activation induced cleavage of the NR2B subunit by calpain. *J Neurosci* 23:11322-11331.
- Sobolevsky AI, Rosconi MP, Gouaux E (2009) X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature* 462:745-756.
- Sorimachi H, Hata S, Ono Y (2011a) Calpain chronicle--an enzyme family under multidisciplinary characterization. *Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and biological sciences* 87:287-327.

- Sorimachi H, Hata S, Ono Y (2011b) Impact of genetic insights into calpain biology. *Journal of biochemistry* 150:23-37.
- Squire LR (2004) Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem* 82:171-177.
- Stevens CF (1998) A million dollar question: does LTP = memory? *Neuron* 20:1-2.
- Taube JS, Muller RU, Ranck JB, Jr. (1990) Head-direction cells recorded from the postsubiculum in freely moving rats. I. Description and quantitative analysis. *J Neurosci* 10:420-435.
- Vanderklish P, Bednarski E, Lynch G (1996) Translational suppression of calpain blocks long-term potentiation. *Learn Mem* 3:209-217.
- Vanderklish P, Saido TC, Gall C, Arai A, Lynch G (1995) Proteolysis of spectrin by calpain accompanies theta-burst stimulation in cultured hippocampal slices. *Brain research Molecular brain research* 32:25-35.
- Wang KK, Posner A, Raser KJ, Buroker-Kilgore M, Nath R, Hajimohammadreza I, Probert AW, Marcoux FW, Lunney EA, Hays SJ, Yuen PW (1996) Alpha-mercaptoacrylic acid derivatives as novel selective calpain inhibitors. *Advances in experimental medicine and biology* 389:95-101.
- Witter MP, Canto CB, Couey JJ, Koganezawa N, O'Reilly KC (2014) Architecture of spatial circuits in the hippocampal region. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369:20120515.
- Witter MP, Naber PA, van Haeften T, Machielsen WC, Rombouts SA, Barkhof F, Scheltens P, Lopes da Silva FH (2000a) Cortico-hippocampal communication by way of parallel parahippocampal-subicular pathways. *Hippocampus* 10:398-410.
- Witter MP, Wouterlood FG, Naber PA, Van Haeften T (2000b) Anatomical organization of the parahippocampal-hippocampal network. *Ann N Y Acad Sci* 911:1-24.
- Wright A, Vissel B (2012) The essential role of AMPA receptor GluR2 subunit RNA editing in the normal and diseased brain. *Frontiers in molecular neuroscience* 5:34.
- Wu HY, Tomizawa K, Oda Y, Wei FY, Lu YF, Matsushita M, Li ST, Moriwaki A, Matsui H (2004) Critical role of calpain-mediated cleavage of calcineurin in excitotoxic neurodegeneration. *The Journal of biological chemistry* 279:4929-4940.
- Wu HY, Yuen EY, Lu YF, Matsushita M, Matsui H, Yan Z, Tomizawa K (2005) Regulation of N-methyl-D-aspartate receptors by calpain in cortical neurons. *The Journal of biological chemistry* 280:21588-21593.
- Wyllie DJ, Livesey MR, Hardingham GE (2013) Influence of GluN2 subunit identity on NMDA receptor function. *Neuropharmacology* 74:4-17.
- Yuste R, Majewska A (2001) On the function of dendritic spines. *Neuroscientist* 7:387-395.
- Zadran S, Jourdi H, Rostamiani K, Qin Q, Bi X, Baudry M (2010) Brain-derived neurotrophic factor and epidermal growth factor activate neuronal m-calpain via mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation. *J Neurosci* 30:1086-1095.
- Zhu G, Liu Y, Wang Y, Bi X, Baudry M (2015) Different patterns of electrical activity lead to long-term potentiation by activating different intracellular pathways. *J Neurosci* 35:621-633.

## 8 ANEXO

## 8.1. Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

	<b>UFRGS</b> UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	<b>PRÓ-REITORIA DE PESQUISA</b> Comissão De Ética No Uso De Animais	
---	--	--	---

**CARTA DE APROVAÇÃO**

**Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:**


**Número:** 33025  
**Título:** EFEITOS DA MODULAÇÃO DOS ESPINHOS DENDRÍTICOS SOBRE DIFERENTES FASES DE PROCESSAMENTO DA MEMÓRIA

**Vigência:** 01/06/2017 à 03/03/2019

**Pesquisadores:**  
**Equipe UFRGS:**  
LUCAS DE OLIVEIRA ALVARES - coordenador desde 01/06/2017

*Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 22/05/2017 - SALA 330 DO ANEXO I DO PRÉDIO DA REITORIA - CAMPUS CENTRO, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 1002 ratos wistar, machos, de 60 dias e pesando entre 250 e 300g, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL); de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.*

Porto Alegre, Sexta-Feira, 2 de Junho de 2017

  
MARCELO MELLER ALIEVI  
Coordenador da comissão de ética