

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

Kamilla Irigaray Torquato

**O PAPEL DOS RECEPTORES DE AMPA PERMEÁVEIS A CÁLCIO NOS
PROCESSOS DE CONSOLIDAÇÃO, EVOCAÇÃO E ATUALIZAÇÃO DA
MEMÓRIA**

Porto Alegre

2018

Kamilla Irigaray Torquato

**O PAPEL DOS RECEPTORES DE AMPA PERMEÁVEIS A CÁLCIO NOS
PROCESSOS DE CONSOLIDAÇÃO, EVOCAÇÃO E ATUALIZAÇÃO DA
MEMÓRIA**

Trabalho de dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências - Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Lucas de Oliveira Alvares

Porto Alegre

2018

SUMÁRIO

Resumo.....	2
Abstract	3
LISTA DE ABREVIATURAS.....	4
1 INTRODUÇÃO	5
1.1 Memória.....	5
1.1.1 Memórias neutras e espaciais.....	6
1.1.2 Memórias aversivas.....	7
1.1.3 Estruturas envolvidas	8
1.1.3.1 Amígdala.....	8
1.1.3.2 Hipocampo	9
1.2 Receptores AMPA	10
1.3 CP-AMPA e plasticidade	12
1.4 CP-AMPA e memória.....	15
2 JUSTIFICATIVA	17
3 OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo geral	18
3.2 Objetivos específicos.....	18
4 ARTIGO CIENTÍFICO	19
5 DISCUSSÃO GERAL.....	48
6 CONCLUSÕES.....	53
REFERÊNCIAS.....	54

RESUMO

Aprender e memorizar é de grande importância, pois permite a manutenção de comportamentos adaptativos e promove a capacidade de modificar comportamentos. No sistema nervoso de vertebrados, as sinapses são extremamente plásticas, permitindo alterações de curto e longo prazo durante o desenvolvimento, aprendizado e processos mnemônicos. O receptor AMPA permeável ao cálcio (CP-AMPA) tem um papel crítico na plasticidade. Estudos apontam sua importância na manutenção de circuitos em um estado menos estável, permitindo a ocorrência da plasticidade através da labilização destes. Investigamos a contribuição do CP-AMPA na amígdala basolateral (BLA) e no hipocampo (HPC) para a consolidação de diferentes tipos de memória, evocação e atualização. Mostramos que o bloqueio de CP-AMPA por NASPM (1-Naphthylacetyl sperimine), um antagonista do CP-AMPA, na BLA e no HPC, prejudicou a consolidação da memória aversiva. A infusão de NASPM no HPC prejudicou a consolidação da memória espacial no labirinto aquático, porém a consolidação da memória de localização de objetos não foi afetada. Também encontramos evidências para o envolvimento do CP-AMPA na BLA e no HPC na evocação. Ainda, a atualização foi afetada pela infusão de NASPM no HPC em ambas as tarefas (aprendizado reverso; choque imediato). Desta forma, a atividade do CP-AMPA na BLA e no HPC é necessária para a consolidação da memória aversiva, entretanto, não é tão relevante para as memórias que não possuem ou possuem baixa valência emocional. Além disso, a inserção do receptor em sítios pós-sinápticos é necessária para a evocação da memória na BLA e no HPC. Essas descobertas apontam para um papel do CP-AMPA em estados de memória nos quais mudanças plásticas são presumivelmente maiores, como no início da consolidação da memória aversiva e na evocação dessa memória. Ademais, a valência emocional parece influenciar a função deste receptor. Acredita-se que o tráfego de CP-AMPA para as sinapses, que está associado à plasticidade sináptica, é o mecanismo subjacente aos efeitos comportamentais observados.

Palavras chave: Consolidação; Atualização da memória; Receptor AMPA permeável ao cálcio; Hipocampo; Amígdala.

ABSTRACT

The ability to learn and memorize is of great importance as it allows the maintenance of adaptive behaviors and promotes the ability to modify behaviors. In the vertebrate nervous system, the synapses are extremely plastic, allowing short- and long-term changes not only during development, but also during learning and mnemonic processes. Calcium permeable AMPA receptor (CP-AMPA) plays a critical role in experience-dependent plasticity and synaptic plasticity. Studies shows the importance of CP-AMPA in the maintenance of circuits in a less stable state, allowing the occurrence of plasticity through these circuits labilization. Here, we investigated the contribution of CP-AMPA expressed in the basolateral amygdala (BLA) and hippocampus (HPC) to consolidation of different types of memory, retrieval and update. We showed that CP-AMPA blockade by NASPM (1-Naphthylacetyl sperimine), a CP-AMPA receptor antagonist, into the BLA and HPC impaired fear memory consolidation. NASPM infusion in the HPC impaired spatial memory consolidation on the water maze, whereas consolidation of object location memory was not affected. We found evidence for CP-AMPA involvement in the BLA and in the HPC on memory retrieval. Furthermore, memory update was affected by NASPM infusion in the HPC in both tasks. The activity of CP-AMPA in the BLA and HPC is required for the consolidation of fear memory; on the other hand, it is not as relevant for memories that contain no or low emotional valence. Moreover, this receptor insertion in post-synaptic sites is required for memory retrieval in the BLA and in the HPC. These findings support a role of CP-AMPA in memory states in which plastic changes are presumably higher, such as the beginning of fear memory consolidation and in memory retrieval. Moreover, emotional valence seems to influence its function. CP-AMPA trafficking to the synapses, which is associated to synaptic plasticity, is believed to be the mechanism accounting for the observed behavioral effects.

Keywords: Consolidation; Retrieval-induced update; Calcium-permeable AMPA receptor; Hippocampus; Amygdala.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico

BL: núcleo basolateral da amígdala

BLA: amígdala basolateral ou complexo basolateral

CA1: *cornu ammonis* 1 do hipocampo

CAMKII: proteína cinase II dependente de Ca^{2+} /calmodulina

CeA: núcleo central da amígdala

CeL: núcleo central da amígdala

CeM: setor medial do núcleo central da amígdala

CREB: proteína ligadora ao elemento responsivo a AMP cíclico

CI-AMPA: receptor de AMPA impermeável a cálcio

CP-AMPA: receptor de AMPA permeável a cálcio

EC: estímulo condicionado

EI: estímulo incondicionado

HPC: hipocampo

ICMs: massas celulares intercaladas da amígdala

LTP: potenciação de longa duração

LTD: depressão de longa duração

LA: núcleo lateral da amígdala

NASPM: 1-Naphthylacetyl sperimine

NE: noradrenalina

NMDA: N-metil-D-aspartato (NMDA)

PKA: proteína cinase A

PKC: proteína cinase C

1 INTRODUÇÃO

1.1 Memória

A memória é um processo no qual informações adquiridas através da experiência são codificadas em circuitos neuronais formando a representação interna da experiência (DUDAI, 2004). Esse processo envolve diferentes etapas como aquisição, formação, manutenção e evocação de informações (DUDAI, 2004; LEDOUX, 2000).

A capacidade de aprender e memorizar é de grande importância, pois permite a manutenção de comportamentos adaptativos e promove a capacidade de modificar comportamentos. Essa flexibilidade comportamental proporciona respostas mais adequadas a mudanças no ambiente, permitindo uma interação com este progressivamente mais eficiente e mais segura, garantindo, assim, a sobrevivência do indivíduo e da espécie (PAUSE ET AL., 2013).

Convém ressaltar a existência de múltiplos sistemas de memória no cérebro, cada um responsável por diferentes tipos de informações. Tais sistemas possuem funcionamento e substratos neuroanatômicos distintos e especializados e podem funcionar independentemente uns dos outros (PAUSE ET AL., 2013; NADER, HARDT, 2009). As memórias declarativas, que são as memórias para fatos e eventos, envolvem a participação do lobo temporal medial e do diencéfalo. As memórias não-declarativas estão associadas a outras estruturas encefálicas. Por exemplo, a memória procedural (habilidades e hábitos) está relacionada ao estriado e o condicionamento clássico envolve o cerebelo e a amígdala (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2008).

Quando uma memória é formada ela é, inicialmente, lábil. Através da consolidação, processo dependente de síntese proteica, o traço dessa memória torna-se, progressivamente, mais estável e persistente (HONG ET AL, 2013; MONFILS, 2009). Ao ser evocada, a memória previamente consolidada pode passar por dois processos antagônicos, a reconsolidação e a extinção. Durante a reconsolidação, a memória evocada torna-se instável novamente, passando por um período transitório de labilidade, o qual requer nova síntese proteica para estabilização e persistência do traço de memória evocado. Este período lábil, chamado de janela de reconsolidação, persiste por várias horas após a evocação. Neste estado de labilização, o traço de memória fica suscetível a alterações podendo ser fortalecido, desestruturado ou ter novas informações acrescentadas a ele. A integração de novas informações presentes no momento da evocação tem a função adaptativa de formar uma memória atualizada (MONFILS, 2009).

Sendo assim, uma memória recém adquirida e uma memória evocada encontram-se em processos similares de instabilidade (NADER; SCHAFE; LEDOUX, 2000).

Por outro lado, a extinção da memória leva à redução na sua expressão, visto que a ela envolve a formação de uma nova memória com sentido oposto a memória original. A nova memória formada suprime a ativação do traço original, mas não de forma permanente. Como a extinção não interfere diretamente na memória original, seu efeito não é duradouro e depende de variáveis espaciais, sensoriais e temporais. Em termos de memórias aversivas (segundo o paradigma no qual um estímulo incondicionado é pareado a um condicionado) pode haver novamente a expressão da memória original sob três circunstâncias. Quando ocorre a apresentação do estímulo condicionado em um contexto diferente do qual a extinção foi realizada (*renewal*), quando o estímulo incondicionado original é apresentado de forma inesperada (*reinstatement*) ou após muito tempo transcorrido da formação da memória de extinção (recuperação espontânea) (MONFILS, 2009).

1.1.1 Memórias neutras e espaciais

Memórias neutras são aquelas que não possuem componente emocional envolvido, diferentemente das memórias aversivas. Uma memória espacial pode ser neutra ou envolver sistemas emocionais na sua constituição.

Explorar o ambiente de forma segura é fundamental para garantir a sobrevivência. Para uma exploração eficiente, é necessário aprender, ou seja, formar memória espacial referente a um determinado local, e ser capaz de lembrar posteriormente, isto é conseguir evocar a memória previamente consolidada (VORHEES; WILLIAMS, 2014).

A formação de memórias espaciais que proporcionam a localização própria e a localização de objetos no espaço envolve dois sistemas: a navegação aloentríca, na qual o animal utiliza pistas ambientais para se localizar, e a navegação egocêntrica, em que são utilizadas referências internas do animal. O hipocampo é de extrema importância para a formação de memórias espaciais através da navegação aloentríca.

Para avaliar a memória espacial em animais, muitas tarefas podem ser utilizadas, as principais são a localização de objetos e o labirinto aquático de Morris (VORHEES; WILLIAMS, 2014). A tarefa de localização de objetos baseia-se na característica intrínseca dos roedores de serem atraídos pela novidade. Desta forma, eles tendem a explorar mais o objeto que foi trocado de lugar do que o que permanece no mesmo local. Isto se a memória original para a localização dos objetos estiver preservada. Se a

preferência pelo novo não for observada, sugere prejuízo na memória de localização original dos objetos (MIGUES 2016; LYNCH, 2004).

O labirinto aquático de Morris explora a característica dos roedores de serem nadadores naturais, ainda que prefiram não estar na água. Desta forma, eles são motivados a buscar uma fuga e o fazem através da natação sem a necessidade de interferência do experimentador. Ao encontrar a plataforma submersa, o animal obtém o reforço para a fuga (VORHEES; WILLIAMS, 2014). Uma vez encontrada a plataforma, é necessário que o animal lembre de pistas espaciais para localizá-la novamente. O hipocampo desempenha papel fundamental na aprendizagem espacial exigida na tarefa (LYNCH, 2004).

1.1.2 Memórias aversivas

Memórias aversivas são aquelas que contêm valência emocional negativa. Elas são formadas durante experiências emocionais negativas e, visando a sobrevivência, devem ser fortes e duradouras no intuito de ser capaz de evitar novas situações de perigo diante de contingências ambientais, de risco de conhecimento prévio (RODRIGUES; SHAFE; LEDOUX, 2004).

O paradigma mais utilizado para estudar memórias aversivas é o condicionamento pavloviano. De acordo com este paradigma, um estímulo nocivo, que tipicamente desencadearia respostas inatas de medo (comportamentais, endócrinas, autonômicas e cognitivas), também chamado de estímulo incondicionado (EI; geralmente um choque leve nas patas do animal) é pareado a um estímulo neutro ou estímulo condicionado (EC; um tom ou um contexto) (DURVACI; PARE, 2014; LEDOUX, 2000).

Após o condicionamento, o EC é capaz suscitar respostas defensivas que normalmente ocorrem na presença de perigo. Essas respostas de medo condicionadas incluem alterações fisiológicas e comportamentais tais como comportamentos defensivos (como congelamento), respostas autonômicas (aumento da frequência cardíaca e da pressão sanguínea), endócrinas (liberação de hormônio), bem como alterações na sensibilidade à dor e expressão reflexa (DURVACI; PARE, 2014; LEDOUX, 2000). O congelamento é a medida comportamental mais utilizada para a avaliação de memórias aversivas em roedores. Neste estado, o animal permanece imóvel apresentando apenas movimentos respiratórios (BLANCHARD; BLANCHARD, 1969).

1.1.3 Estruturas envolvidas

Diversas estruturas encefálicas desempenham papéis centrais nos processos mnemônicos. De especial interesse para este trabalho destacam-se a amígdala e o hipocampo.

1.1.3.1 Amígdala

A amígdala é uma estrutura fundamental no circuito neural subjacente ao aprendizado do medo. É constituída por uma coleção heterogênea de núcleos, que regulam o medo condicionado: o complexo basolateral (BLA), que inclui o lateral (LA), o basolateral (BL) e núcleos basomediais (BM); o núcleo central (CeA), comumente dividido em setores laterais (CeL) e medial (CeM); e as massas celulares intercaladas (ICMs) (DURVACI; PARE, 2014).

De forma geral, LA é o principal ponto de entrada para estímulos sensoriais na amígdala, enquanto a CeM é a principal fonte de projeções de amígdala para estruturas efetoras de medo do tronco encefálico. LA recebe informações do tálamo e de regiões corticais envolvidas no processamento auditivo (EC) e somatossensorial (EI), por isso é considerado o principal local de plasticidade sináptica na aquisição do condicionamento aversivo (DURVACI; PARE, 2014).

Nem todas as entradas sensoriais provocam medo. A expressão do medo vai depender das contingências ambientais. Isso se deve ao fato de que os setores laterais do núcleo central (CeL) e as massas celulares intercaladas (ICMs) recebem entradas glutamatérgicas (excitatórias) do complexo BLA e enviam projeções GABAérgicas (inibitórias) para o setor medial do núcleo central (CeM). Desta forma, existe uma flexibilidade comportamental diante das diferentes características ambientais a que o indivíduo está exposto. Logo, as conexões entre o LA e o CeA são necessárias para a associação entre EI e EC que ocorre no condicionamento aversivo (DURVACI; PARE, 2014).

A convergência de informações sinápticas do EI e do EC no LA desencadeia a potenciação sináptica de circuitos que carregam a informação do EC até o LA. Essa potenciação é responsável pelo medo condicionado (aprendido), visto que o LA faz conexões com o CeA que, por sua vez, conecta-se com estruturas responsáveis pela expressão do medo (DURVACI; PARE, 2014).

Dadas as aferências sensoriais que a amígdala recebe, o estudo do seu papel na formação de memórias de medo é frequentemente realizado utilizando o condicionamento

aversivo ao tom (LEDOUX, 2000). Cabe ressaltar que, como a amígdala e o hipocampo ventral estabelecem conexões recíprocas, o processamento de informações aversivas que ocorre na amígdala também é implicado no condicionamento aversivo ao contexto (DURVACI; PARE, 2014).

A aquisição de memórias aversivas através do condicionamento pavloviano se dá a partir da potenciação de sinapses glutamatérgicas no LA que se projetam para o CeA que, por sua vez, através de suas projeções distribui informação para outras estruturas envolvidas como a substância cinzenta periaquedutal, o hipotálamo, o hipocampo e o córtex pré-frontal (DURVACI; PARE, 2014; LEDOUX, 2000).

1.1.3.2 Hipocampo

O hipocampo desempenha um papel fundamental na formação de memórias declarativas, em especial nas memórias espaciais (LYNCH, 2004). Ou seja, ele participa da formação da memória de eventos, no contexto correspondente (PRESTON; EICHENBAUM; 2013).

Embora a maior ênfase ao hipocampo seja referente a memórias espaciais, ele também está envolvido em tarefas de memórias não-espaciais, como no condicionamento aversivo (LYNCH, 2004). Ele exerce um papel importante na modulação das memórias aversivas. Como o hipocampo é uma estrutura grande (dividida em quatro regiões, giro denteado, CA1 (*cornu ammonis*), CA2 e CA3) os padrões de conexão das diferentes regiões é bastante complexo. Enquanto o hipocampo dorsal faz conexões com o neocórtex, a porção ventral projeta-se para estruturas subcorticais, como a amígdala. Conseqüentemente, uma lesão no hipocampo ventral ou sua inibição provocam a redução na expressão do medo e a diminuição de comportamentos aversivos (GOOSENS, 2011).

Informações para "o que" lembramos e para "onde" os eventos ocorrem percorrem vias distintas até o lobo temporal médio (LTM), região com papel fundamental para memórias episódicas. Particularmente o córtex perirrinal e a área entorrinal lateral são responsáveis pela informação de objetos específicos e pela sinalização da familiaridade dos mesmos. Já o córtex parahipocampal e a área entorrinal medial processam informações relativas ao contexto de acontecimento dos eventos. Essas informações "do que" e de "onde" convergem no LTM para o hipocampo, que integra tais informações. Projeções hipocampais formam vias de feedback retornando às áreas corticais, o que promove suporte ao hipocampo para a recuperação da memória formada baseada em

informações de um ou outro componente dessa memória, ou seja, com base nos componentes “o que” ou “onde” (PRESTON; EICHENBAUM; 2013).

1.2 Receptores AMPA

Receptores AMPA (AMPA) são um subtipo de receptores glutamatérgicos pós-sinápticos envolvidos na transmissão excitatória no sistema nervoso central (SNC) (LEE, 2012; HENLEY; WILKINSON, 2016; VERDOORN et al., 1991; DINGLELINE et al., 1999). Quatro tipos de subunidades (GluA1-4) se combinam formando um receptor ionotrópico tetramérico funcional ativado por ligante. A combinação da subunidades é feita de um dímero de dímeros. A combinação predominante na maioria das regiões encefálicas é dímero GluA1 e dímero GluA2 (ie, heterômeros GluA1 / GluA2) (LEE, 2012).

No SNC de mamíferos, a maior parte dos AMPARs contém a subunidade GluA2, editada a nível de RNA. Neste processo, uma glutamina (resíduo 607) na região do poro é trocada por uma arginina. Esses receptores são permeáveis ao sódio (Na^+) e potássio (K^+), e impermeáveis ao Ca^{2+} (CI-AMPARs), possuem uma relação linear de corrente-tensão (I-V) e são insensíveis às poliaminas, propriedades conferidas pela arginina, que possui carga positiva sob o pH fisiológico e a cadeia lateral mais volumosa. Já os AMPARs que não possuem a subunidade GluA2 ou que possuem a subunidade não editada exibem a permeabilidade ao Ca^{2+} (CP-AMPARs) (resultando em maior condutância), a sensibilidade às poliaminas e a retificação interna da corrente. Poliaminas são carregadas positivamente e interagem com a cadeia lateral da glutamina 607 na região do poro. É essa interação que garante ao CP-AMPA a sensibilidade às poliaminas e a retificação interna da corrente. Geralmente a ligação de poliaminas ocorre quando a membrana neuronal está despolarizada e evita a saída de corrente através dos CP-AMPARs (SOMMER et al., 1991). Ou seja, a composição do AMPAR determina suas propriedades biofísicas, seu tráfego para as sinapses e assim, suas funções biológicas (DINGLELINE et al., 1999; SOMMER et al., 1991).

O CP-AMPA foi primeiramente identificado em um subconjunto de interneurônios. Recentemente, a presença deste receptor tem sido indicada em sinapses piramidais sob condições específicas (LEE, 2012). Estudos também identificaram CP-AMPA em animais jovens (SHEPHERD, 2012).

Experimentos realizados com animais demonstraram que cerca de 80% dos CI-AMPARs sinápticos em neurônios piramidais no hipocampo sejam do tipo heterômeros

GluA1/A2 e provavelmente os demais sejam heterômeros GluA2/A3 (LU et al., 2009). Na amígdala basolateral de ratos, receptores do tipo GluA2/A3 são abundantes em neurônios piramidais enquanto os do tipo GluA1 são encontrados principalmente em neurônios não-piramidais (MCDONALD, 1996). A subunidade GluA4 possui expressão mais abundante início do desenvolvimento e praticamente restrita à primeira semana pós-natal, enquanto os níveis de GluA1, GluA2 e GluA2/3 aumentam gradualmente durante o desenvolvimento e estabilizam-se na terceira semana pós natal em ratos (ZHU et al., 2000). Além disso, menos de 1% dos RNAs da substância cinzenta encefálica codifica a subunidade GluA2 não editada (WRIGHT; VISSEL, 2012).

Os dados acima demonstram que a presença de CP-AMPAR nas sinapses encontra-se sob intensa regulação e é dependente da atividade neuronal (LEE, 2012). O CI-AMPAR é mais estável nas sinapses e contribui para a neurotransmissão basal, enquanto o CP-AMPAR é transientemente recrutado e expresso durante a plasticidade sináptica, um fenômeno Ca^{2+} -dependente (HONG et al., 2013, PLANT et al., 2006).

O CP-AMPAR desempenha um papel importante na plasticidade sináptica devido à sua permeabilidade ao Ca^{2+} (CLAPHAN, 1995). Apesar da condutância do CP-AMPAR para Ca^{2+} ser menor do que a do NMDAR (DINGLELINE et al., 1999). O cálcio é um importante segundo mensageiro que desencadeia cascatas de sinalização intracelulares (CLAPHAN, 1995).

Alto influxo de Ca^{2+} promove a ativação de proteínas cinases como a proteína cinase II dependente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII) e a proteína cinase C (PKC), as quais fosforilam substratos como a subunidade GluA1 do AMPAR. GluA1 possui diversos sítios de fosforilação na porção C-terminal (intracelular), dentre eles, a serina 831 fosforilada pela CaMKII e pela PKC, e a serina 845 pela proteína cinase A (PKA). A entrada de Ca^{2+} em níveis baixos na célula ativa fostatases como a proteína fosfatase 1 (PP1) e a calcineurina, como consequência há a desfosforilação de GluA1 e a endocitose de AMPAR da membrana (LUSCHER; MALAKENA, 2012).

O influxo de cálcio na célula também regula a expressão gênica mediada pelo fator de transcrição CREB (proteína ligadora ao elemento responsivo a AMP cíclico) (LYNCH, 2004). A síntese proteica induzida por este processo promove alterações sinápticas envolvidas na estabilização de espinhos dendríticos através da reorganização do citoesqueleto de actina (LUSCHER; MALENKA, 2012; MALENKA; BEAR, 2004).

Desta forma o cálcio é responsável por regular uma ampla variedade de processos celulares (CLAPHAN, 1995; DINGLELINE et al., 1999). Entre os processos celulares

controlados pela sinalização de cálcio encontra-se a plasticidade sináptica envolvida no aprendizado e memória (ARUNDINE; TYMIANSKI, 2003).

1.3 CP-AMPAR e plasticidade

No sistema nervoso de vertebrados, as sinapses são extremamente plásticas, permitindo alterações de curto e de longo prazo não somente durante o desenvolvimento, mas também durante o aprendizado e processos mnemônicos. A plasticidade pode levar a modificações nos neurônios pré e pós-sinápticos. De especial interesse para este trabalho, a plasticidade ocorrida no neurônio pós-sináptico envolve alterações no número, nos tipos e nas propriedades dos receptores de neurotransmissores inseridos na membrana (GU et al., 2010).

Os receptores AMPA apresentam um rápido tráfego sináptico mediado pela troca cíclica de receptores intracelulares e receptores que estão inseridos na membrana. A inserção de AMPARs na sinapse, de maneira geral está relacionada a potenciação sináptica, enquanto sua remoção por endocitose relaciona-se à depressão sináptica (GU et al., 2010).

Estudos recentes demonstram que o CP-AMPAR tem um papel crítico tanto na plasticidade dependente de experiência quanto na plasticidade sináptica. Tais descobertas apontam para a importância do CP-AMPAR na manutenção de circuitos em um estado menos estável, permitindo a ocorrência da plasticidade através da labilização destes circuitos (SHEPHERD, 2012). Muitos desses trabalhos demonstram a participação do CP-AMPAR na plasticidade sináptica através de experimentos eletrofisiológicos, mas o papel crítico deste receptor também vem sendo implicado na plasticidade in vivo através de diversos paradigmas comportamentais, como em estudos envolvendo a sensibilidade somatossensorial, condicionamento aversivo e mecanismos de adicção (HENLEY; WILKINSON, 2016). O conjunto de evidências observadas in vitro e in vivo apontam para a indução de uma plasticidade transitória através da incorporação de CP-AMPAR que posteriormente são substituídos por CI-AMPAR (HENLEY; WILKINSON, 2016).

Muitos estudos sugerem que a expressão transiente de CP-AMPAR é necessária para a indução, mas não para a manutenção da LTP. Durante a indução de LTP, CP-AMPARs recrutados de regiões perisinápticas são incorporados à membrana pós-sináptica, contribuindo para um maior influxo de Ca^{2+} . Enquanto os CP-AMPARs permanecerem na sinapse, a LTP encontra-se lábil e instável, até que eles sejam substituídos por CI-AMPARs. Cabe ressaltar que a participação de CP-AMPARs na LTP

não é um consenso. Desta forma, como se dá a incorporação de CP-AMPARs e até que ponto eles participam da LTP permanecem questões a serem exploradas (HENLEY; WILKINSON, 2016).

Estudos também demonstraram o envolvimento de CP-AMPARs na LTD, mais especificamente a associação da sua remoção de sítios sinápticos como de sítios extrasinápticos com a LTD. Uma forma de LTD induzida por despolarização que só ocorre em sinapses neonatais foi relacionada à remoção de CP-AMPARs. E, em neurônios piramidais da região CA1 do hipocampo a remoção de CP-AMPAR extrasinápticos foi associada à LTD (HENLEY; WILKINSON, 2016).

Como os CP-AMPARs e os CI-AMPARs parecem estar presentes na membrana pós-sináptica em diferentes momentos durante diversas formas de plasticidade, infere-se que estes receptores interajam com diferentes proteínas que promovem a sua inserção ou remoção da membrana (HENLEY; WILKINSON, 2016). Com relação a interação com proteínas, a fosforilação de AMPARs por cinases vem sendo bastante estudada. Geralmente a fosforilação está relacionada com a LTP e a desfosforilação com a LTD. Sabe-se também, que o estado de fosforilação interfere na função destes receptores, no tráfego dos mesmos e na plasticidade. De maneira geral, a proteína cinase dependente do cálcio/calmodulina II (CaMKII), a proteína cinase A (PKA) e a proteína cinase C (PKC) desempenham papéis chave tanto na LTP como na LTD (HENLEY; WILKINSON, 2016).

As diferentes subunidades do AMPAR possuem domínios intracelulares diferentes, podendo apresentar a cauda C-terminal curta ou longa. Tais diferenças vão permitir a interação com conjuntos de proteínas distintos que irão interferir na biossíntese, no tráfego, no ancoramento à membrana pós sináptica, na estabilidade e no volume disponível destes receptores (HENLEY; WILKINSON, 2016).

As principais isoformas de GluA1 e de GluA4 possuem caudas longas, enquanto as de GluA2 e de GluA3 têm caudas curtas. As subunidades de cauda longa, quando fazem parte de heterômeros com outra subunidade de cauda curta controlam as propriedades do tráfego dos AMPARs. Visto que a subunidade GluA4 está presente principalmente durante a fase inicial do desenvolvimento, GluA1 é a subunidade de cauda longa que predomina nos neurônios maduros. Sendo ela, portanto, de extrema importância para a regulação do tráfego destes receptores (HENLEY; WILKINSON, 2016).

A CaMKII e a PKC fosforilam a subunidade GluA1 no resíduo de serina S831 da cauda C-terminal intracelular tanto em canais homoméricos (GluA1) como em canais heteroméricos (GluA1-GluA2). A PKA fosforila GluA1 em S845. A fosforilação aumenta a condutância dos canais e aumentam a probabilidade de abertura dos mesmos (HENLEY; WILKINSON, 2016).

Foi demonstrado, em experimentos com roedores transgênicos que a fosforilação de GluA1 pela CaMKII ou pela PKA é necessária para a expressão total da LTP hipocampal. (LEE, 2009; HENLEY; WILKINSON, 2016). Para a LTD é necessária a desfosforilação de GluA1 no sítio de ligação com a PKA (MAN, 2011; HENLEY; WILKINSON, 2016).

Tanto os CP-AMPARs como os CI-AMPARs apresentam tráfego mediado por fosforilação. Muitos estudos investigaram quais os mecanismos de fosforilação estariam envolvidos no tráfego de cada um dos dois tipos de receptores para tentar entender como a fosforilação é capaz de atuar no tráfego diferencial desses receptores em momentos diferentes da plasticidade sináptica (HENLEY; WILKINSON, 2016).

As evidências apontaram para a fosforilação mediada por PKA no resíduo S845 da subunidade GluA1 como um determinante para o tráfego de CP-AMPARs na LTP hipocampal, na LTD e na plasticidade homeostática. A desfosforilação de GluA1 no resíduo S845 é mediada pela fosfatase calcineurina dependente de cálcio (PP2B). Foi proposto também que, durante a LTP hipocampal, os CP-AMPARs seriam primeiro inseridos em sítios extrasinápticos e posteriormente incorporados às sinapses por difusão lateral (HENLEY; WILKINSON, 2016).

Outro estudo também sugere que a fosforilação de GluA1 no resíduo S845 mediada por PKA estabiliza os homômeros de GluA1 extrasinápticos disponibilizando os mesmos para posterior incorporação sináptica durante a LTP. Desta forma, o estado de fosforilação de GluA1 pode controlar o fornecimento destes receptores localizados em sítios extrasinápticos, deixando-os disponíveis para participação em mecanismos que envolvem a plasticidade sináptica ou não, mediando, assim a plasticidade bidirecional. Embora a LTP não tenha sido diretamente avaliada neste estudo, foi observado a relação entre desfosforilação de GluA1 no resíduo S845 e a LTD dependente de NMDAR, o que sugere que a remoção sináptica de CP-AMPARs está envolvida nesta forma de LTD (HENLEY; WILKINSON, 2016).

Tomados em conjunto, os achados acima descritos apontam para o papel crítico do estado de fosforilação de GluA1 no resíduo S845 para a disponibilidade sináptica de

CP-AMPARs (HENLEY; WILKINSON, 2016). Desta forma, a regulação dinâmica de AMPARs é considerada o principal mecanismo molecular subjacente à plasticidade sináptica. Ou seja, alterações nas subunidades que compõem os AMPARs desempenham um papel crítico em diferentes formas de plasticidade sináptica de longo prazo como a LTP, a LTD e a plasticidade homeostática (SHEPHERD, 2012).

Achados também indicam que a expressão anormal de CP-AMPAR nas sinapses está relacionada a distúrbios de memória entre outras patologias. Sugerindo, desta forma, o CP-AMPAR como um possível alvo terapêutico (SHEPHERD, 2012).

1.4 CP-AMPAR e memória

Grande parte do conhecimento acerca da dinâmica dos AMPARs dependente de atividade é oriundo de estudos sobre LTP e LTD. Ambas são processos plásticos tidos como a base para o amadurecimento de circuito neurais durante o desenvolvimento e para a formação da memória (LEE, 2012).

Tendo em vista os processos mnemônicos estudados neste trabalho (consolidação, evocação e atualização), serão apresentados alguns trabalhos que avaliaram a dinâmica de expressão de CP-AMPARs nos processos mnemônicos de interesse.

Estudos indicam que os CP-AMPARs tem um papel crítico na consolidação de memórias aversivas na amígdala. Evidências sugerem que durante um aprendizado aversivo ocorre a inserção de CP-AMPARs nas sinapses da amígdala lateral. Tal inserção foi demonstrada a partir da observação de um aumento de correntes excitatórias pós-sinápticas de AMPARs nas aferências do tálamo para a amígdala lateral acompanhado de uma maior expressão de CP-AMPARs após a tarefa de condicionamento aversivo ao tom (CLEM; HUGANIR, 2010; HONG et al., 2013; RUMPEL et al., 2005). Porém, os dados encontrados relativos à persistência do CP-AMPAR na sinapse variam. A maior expressão de CP-AMPAR foi observada de 2 a 24 horas após o condicionamento (CLEM; HUGANIR, 2010), enquanto um intervalo menor também foi observado, esse intervalo durou de 5 minutos a 12 horas (HONG et al., 2013). Apesar dessa diferença temporal, ambos os estudos indicam expressão transiente de CP-AMPARs na amígdala lateral, com posterior substituição por CI-AMPARs após o condicionamento, demonstrando, desta forma, a participação dos CP-AMPARs na consolidação de memórias aversivas.

Evidências também indicam a participação de CP-AMPARs na evocação de memórias aversivas na amígdala. Tendo em vista que após a evocação a memória passa por um período de labilização tornando-se menos estável, esse processo tem sido

relacionado ao tráfego de AMPARs (MONFILS, 2009). Hong et al. (2013) avaliaram as alterações sinápticas na amígdala lateral após reativação da memória aversiva e demonstraram que a reativação promove uma breve inserção de CP-AMPARs nessas sinapses. O aumento da expressão de CP-AMPARs foi observado em 5 minutos após a reativação e normalizado após 3 horas. Neste trabalho, também foi demonstrado essa inserção pós reativação é dependente da atividade de NMDARs e da endocitose de CI-AMPA (HONG et al., 2013).

Quanto ao papel de CP-AMPARs na reconsolidação de memórias aversivas na amígdala, Hong et al. demonstraram, a nível comportamental, que ela é prejudicada pelo bloqueio desse receptor na amígdala lateral após a reativação da memória aversiva. Este estudo confirma, desta forma, a participação de CP-AMPAR no processo de desestabilização de uma memória previamente consolidada através de sua inserção na membrana pós sináptica.

Um estudo utilizou um protocolo de reativação seguido de extinção (baseado em MONFILS et al., 2009). De acordo com esse protocolo, a sessão de extinção ocorre durante a janela com maior expressão de CP-AMPARs pós evocação da memória previamente consolidada, permitindo, a atenuação da expressão da memória aversiva visto que esta estaria em um estado mais lábil. A reativação da memória 24 horas após o condicionamento permitiu redução significativa do medo na sessão de extinção, que perdurou por 7 dias, sem recuperação espontânea nem *renewal* (CLEM; HUGANIR, 2010). Ou seja, o aumento de CP-AMPAR após a reativação permitiu uma modificação da resposta de medo, a qual foi atenuada pela extinção. Estes dados sugerem que a inserção de CP-AMPARs pode auxiliar também na atualização da memória.

No hipocampo, a dinâmica de AMPARs foi caracterizada após a reativação. Como consequência da evocação da memória houve uma diminuição na expressão de GluA1 e GluA2 provocada por endocitose. Ao término da reconsolidação houve reinserção de CI-AMPARs, constatando-se, desta forma, um processo bifásico (BHATTACHARYA et al., 2017; RAO-RUIZ et al., 2011). Não foi observado aumento de CP-AMPARs em CA1 do hipocampo após a reativação, contrastando com os dados encontrados por Hong et al. (2013) na amígdala lateral. Deve-se levar em conta o tempo pós-reativação em que o perfil de receptores foi analisado - 1 hora em contraste com os 5 minutos de Hong et al. (2013).

2 JUSTIFICATIVA

Evidências sugerem que o CP-AMPA é importante em estados de menor estabilidade da memória. A relação entre uma maior expressão de CP-AMPA e a labilização de circuitos mnemônicos sugere que esse receptor tenha um efeito fisiológico importante. Podendo também ser um alvo terapêutico no tratamento de distúrbios de memória. Hipotetizamos que o CP-AMPA desempenhe um papel central em estados plásticos em que o traço da memória encontra-se menos estável e mais suscetível a alterações como no início da consolidação, na evocação e durante a reconsolidação (permitindo a atualização da memória). Supomos também que a valência da memória interfira na atuação desses receptores alterando sua dinâmica temporal. Dessa forma, a relevância deste trabalho é ampliar a compreensão do papel do CP-AMPA em determinados processos mnemônicos a nível comportamental.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o papel do CP-AMPA na amígdala basolateral e no hipocampo na consolidação de diferentes tipos de memória e comparar a participação deste receptor na consolidação da memória em diferentes tarefas. Avaliar o papel do CP-AMPA na evocação de memórias aversivas nessas mesmas estruturas. Avaliar também o papel do CP-AMPA no hipocampo em tarefas que envolvem a labilização do traço da memória.

3.2 Objetivos específicos

1. Verificar se o bloqueio de CP-AMPA na amígdala basolateral ou no hipocampo no início da consolidação sináptica de uma memória aversiva prejudica a consolidação da memória.

2. Verificar se o bloqueio de CP-AMPA no hipocampo no início da consolidação sináptica de uma memória neutra prejudica a consolidação da memória.

3. Verificar se o bloqueio de CP-AMPA no hipocampo no início da consolidação sináptica de memórias espaciais prejudica a consolidação da memória.

4. Verificar se o bloqueio de CP-AMPA na amígdala basolateral ou no hipocampo antes da evocação de uma memória aversiva prejudica a evocação da memória.

5. Verificar se o bloqueio de CP-AMPA no hipocampo em tarefas que envolvem a labilização do traço da memória prejudica a aquisição do aprendizado reverso ou a atualização da memória.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Esse trabalho foi escrito em formato de artigo científico, seguindo as normas para submissão da revista Hippocampus.

**The role of calcium-permeable AMPA receptors in memory consolidation,
retrieval and updating**

Kamilla Irigaray Torquatto^{1,2}, Ana Paula Menegolla¹, Bruno Popik^{1,2}, Mirelle Casagrande^{1,2}, Lucas de Oliveira Alvares^{1,2*}

¹ Laboratório de Neurobiologia da Memória, Biophysics Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

² Graduate Program in Neuroscience, Institute of Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

*Corresponding author: Lucas de Oliveira Alvares, Laboratório de Neurobiologia da Memória, Biophysics Department, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43422, sala 210, CEP 91.501-970, Porto Alegre, Brazil.
E-mail: lucas.alvares@ufrgs.br

Running title: CP-AMPA receptors in consolidation retrieval and updating

Number of text pages: 17

Number of figures: 6

Abstract

The role of the calcium-permeable AMPA receptor (CP-AMPA) in synaptic plasticity is well established. CP-AMPA is believed to be recruited to the synapse when the memory trace is in a plastic state; however, the direct implications of its expression for memory processes is less known. Here, we investigated the contribution of CP-AMPA expressed in the basolateral amygdala (BLA) and hippocampus (HPC) to consolidation of different types of memory, retrieval and update. We showed that CP-AMPA blockade by NASPM into the BLA and HPC impaired fear memory consolidation. NASPM infusion in the HPC impaired spatial memory consolidation on the water maze, whereas consolidation of object location memory was not affected. We found evidence for CP-AMPA involvement in the BLA and in the HPC on memory retrieval. Furthermore, memory update was affected by NASPM infusion in the HPC in both tasks. The activity of CP-AMPA in the BLA and HPC is required for the consolidation of fear memory; on the other hand, it is not as relevant for memories that contain no or low emotional valence. Moreover, this receptor insertion in post-synaptic sites is required for memory retrieval in the BLA and in the HPC. These findings support a role of CP-AMPARs in memory states in which plastic changes are presumably higher, such as the beginning of fear memory consolidation and in memory retrieval. Moreover, emotional valence seems to influence its function. CP-AMPA trafficking to the synapses, which is associated to synaptic plasticity, is believed to be the mechanism accounting for the observed behavioral effects.

Keywords

Consolidation; Retrieval-induced update; Calcium-permeable AMPA receptor; Hippocampus; Amygdala.

Introduction

Synaptic plasticity is considered the mechanism underpinning learning and memory (Dudai, 2004). The acquisition of information lasts from seconds to few minutes from exposure to an experience. The memory trace stays initially labile, susceptible to changes and disruption, and stabilization of the memory trace is achieved during the consolidation. Upon retrieval, memory re-enters into a labile state, and can undergo the reconsolidation process. Through reconsolidation, the original memory trace is maintained or new information is added to it (Dudai, 2004, Nader, Schafe, & Ledoux, 2000).

AMPA receptors (AMPA receptors) are glutamate receptors responsible for fast excitatory neurotransmission in the mammalian central nervous system (Verdoorn, Burnashev, Monyer, Seeburg, & Sakmann, 1991) and are fundamental for brain function (Hong et al., 2013; Rumpel, LeDoux, Zador, & Malinow, 2005). AMPARs are also important for certain forms of synaptic plasticity (modulation in the strength of synapses that contribute to learning and memory) and are extremely sensitive to changes in experience and synaptic activity (Henley & Wilkinson, 2016; Shepherd, 2012).

Four kinds of subunits (GluA1-4) combine to form a tetrameric voltage-dependent ion channel. The predominant AMPARs are hetero-tetrameric, composed of GluA1 dimers and GluA2 dimers (ie, GluA1 / GluA2 heteromers) (Lee, 2012). Most AMPARs in the mammalian central nervous system contain the edited GluA2 subunit, are permeable to sodium (Na^+) and potassium (K^+), and calcium (Ca^{2+}) impermeable (CI-AMPA receptors). However, a less common AMPAR subtype lacking the GluA2 subunit or containing non-edited GluA2 exhibit the permeability to Ca^{2+} (CP-AMPA receptors) (Sommer, Köhler et al., 1991). AMPAR composition determines its biophysical properties and trafficking to the synapses and, therefore, its biological function (Dingledine, Borges, Bowie, & Traynelis, 1999; Sommer et al., 1991).

CP-AMPA receptor was first identified in a subset of interneurons. Recently, the presence of these receptor has been pointed in pyramidal synapses under certain specific conditions (Lee, 2012). Around 80% of pyramidal neurons in the hippocampus contain calcium-impermeable AMPARs (CI-AMPA receptors) (Lu et al., 2009), and these receptors are also abundant in pyramidal neurons in the amygdala (McDonald, 1996). These data demonstrate that the presence of CP-AMPA receptor at synapses is under intense regulation and is dependent on neuronal activity (Lee, 2012). CI-AMPA receptors are known for being stable at the synapses and contributing to basal neurotransmission, whereas CP-AMPA receptors are

transiently expressed and recruited during synaptic plasticity, a Ca^{2+} -dependent phenomenon (Hong et al., 2013; Plant et al., 2006).

Calcium is an important second messenger controlled by rigid homeostatic mechanisms. It is responsible for regulating a wide variety of cellular processes (Clapham, 1995). Among them is synaptic plasticity during learning and memory (Arundine & Tymianski, 2003). In view of this, it is possible to understand that the trafficking of AMPARs to and from synapses is the main mechanism underlying synaptic plasticity and plays an important role in long-term forms of synaptic plasticity, such as long-term potentiation (LTP), long-term depression (LTD) and homeostatic plasticity (Shepherd, 2012).

Studies have revealed a transient increase in CP-AMPA expression in lateral amygdala synapses following fear conditioning, being elevated in few minutes and persisting for hours (Clem & Huganir, 2010; Hong et al., 2013). In the course of consolidation, CP-AMPA receptors are replaced by CI-AMPA receptors, in line with memory trace stabilization (Hong et al., 2013). On the other hand, fear memory retrieval induces destabilization of the memory trace, which has been linked to a switch from CI-AMPA receptors to CP-AMPA receptors (Hong et al., 2013). Despite extensive evidence of the involvement of CP-AMPA receptors in synaptic plasticity in the hippocampus (Beattie et al., 2000; Park et al., 2016; Plant et al., 2006), their direct role in memory with *in vivo* studies has been less explored.

In summary, studies indicate that the expression of CP-AMPA receptors on the synaptic surface is associated with the plasticity and memory labilization, whereas its replacement by CI-AMPA receptors may promote memory stabilization. However, there is still a lack in the understanding of the role of CP-AMPA receptor activity in different brain structures for memory processes, especially in the hippocampus. Furthermore, since all the *in vivo* studies focused on aversive memory tasks, whether CP-AMPA receptor dynamics in tasks with different requirements is similar is unknown. Therefore, this study aims to elucidate the role of CP-AMPA receptor expression in the basolateral amygdala and the hippocampus for fear memory consolidation and retrieval, as well compare consolidation in different tasks, the role of this receptor in the HPC in tasks involving labilization of the memory trace (reversal learning and updating) and forgetting.

Material and Methods

Subjects

Male adult Wistar rats (age 2–3 months, weight 290–350 g) from our breeding colony were used. Animals were housed in plastic cages, four to five per cage, in a constant temperature of 24 ± 1 °C under a 12/12 h light/dark cycle (lights on at 7 a.m.) with water and food available ad libitum. All experiments were performed in accordance to the national animal care legislation and guidelines (Brazilian Law 11.794/2008) and the project has been approved by the Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul (project number 30567).

Stereotaxic Surgery and Cannula Placement

Rats were deeply anesthetized by an i.p. injection of ketamine/ xylazine (75 and 10 mg/kg, respectively) and bilaterally implanted in the brain targeting the dorsal hippocampus, with 27-gauge guide cannulae. Coordinates for hippocampus cannulation were anteroposterior (AP) -4.0 mm (from bregma), laterolateral (LL) ± 3.0 mm, and dorsoventral (DV) -1.6 mm, positioned just 1.0 mm above the CA1 area of the dorsal hippocampus. Coordinates for basolateral amigdala cannulation were (AP) -2.5 mm (from bregma), (LL) ± 5.1 mm, and (DV) -7.0 mm, positioned just 1.0 mm above the basolateral nuclei. After a period of 5–7 days recovery from surgery, animals were submitted to behavioral tests. Following the behavioral experiments, subjects were sacrificed and their brains were dissected and preserved in 10% formaldehyde to verify cannula position. Only animals with correct cannula placements were included in the statistical analysis.

Drugs and Administration

NASPM (1-Naphthylacetyl sperimine) a CP-AMPA receptor antagonist, was prepared in a vehicle solution (1% DMSO in sterile isotonic saline). At the time of infusion, a 30-gauge infusion needle was fitted into a guide cannula, with its tip protruding 1.0 mm beyond the guide cannula end and aimed at the pyramidal cell layer of CA1 of the dorsal hippocampus or at basolateral nucleus of the amygdala. A volume of 0.5 or 1 μ l of NASPM (0.4, 4 and 40 μ M) or vehicle (DMSO 1%) was bilaterally infused in a time of 90 s.

Behavioral procedures

Contextual Fear Conditioning: The conditioning chamber (context) consisted of an illuminated Plexiglas box (25.0 × 25.0-cm grid of parallel 0.1-cm caliber stainless steel bars spaced 1.0 cm apart). The illumination inside the room was ~400–800 lx. In the conditioning session (training), rats were placed in the chamber for 3 min for habituation and then received two 2 s foot shocks, of 0.7 mA, separated by a 30 s interval. Before returning to their home cages, animals were kept in the conditioning environment for an additional 30 s. **Memory consolidation test session** 48 hours after training, animals were tested for 4 min in the same context and then returned to their homecages. **Memory retrieval session** Subjects were reexposed to the context, 48 hours after training without footshocks, during 4 min.

Auditory Fear Conditioning: The conditioning chamber (context) consisted of an illuminated Plexiglas box (25.0 × 25.0-cm grid of parallel 0.1-cm caliber stainless steel bars spaced 1.0 cm apart). **Habituation** Animals were given 2 days of habituation in the context A for 10 min. **Training** 24h after habituation rats were conditioned in context B. After 2 min of acclimation, one tone was presented for 30 s and it coterminated with a footshock (0.5 mA, 2 s). 3 tone–footshock pairings were given. The interpairing interval was 1 min. One minute after the final pairing, rats were returned to their home cages. **Memory consolidation test session** 24h after training, 3 tones were presented for 30 s without coterminated footshock. Animals were placed in context A for 2 minutes, then presented three 30-second tones with 1-minute intervals. After 1 minute, animals were returned to their homecages. Percentage time freezing during tone presentation was quantified. **Memory retrieval session** 48 hours after training animals were placed in context A were presented three 30-second tones without coterminated footshock with 1-minute intervals. One minute after the last tone, rats were returned to their home cages. Percentage time freezing during tone presentation was quantified.

Immediate shock deficit or context pre-exposure facilitation effect (CPEE): the conditioning chamber is the same used in contextual fear conditioning. Animals were initially pre-exposed to the context for 180 seconds. On the next day, rats received 0.4 μM NASPM or DMSO 1% infusions into HPC 20 minutes before briefly reexposed to the operant chamber for 15 seconds and, in the end, received 2 footshocks (0.7 mA) before being removed immediately and returned to the homecage. Two days later, animals were placed in the operant chambers for 4 minutes and the freezing was scored. The animals

exposed for 180 seconds on day 1 are expected to integrate the contextual information with the shock received the next day. Without the context pre-exposure session, immediate footshock results in little conditioned fear to the context (the immediate shock deficit). Protocol adapted from Lee, 2010.

Object location: For object location (OL) task we used a black square arena (60× 60× 60 cm) made of wood with distinct visual cues in the walls. The general protocol for this paradigm consisted of three distinct phases: (1) **Habituation** 4 consecutive days of 4 trials 5-min exposure for habituation in the absence of objects, (2) **Training** 1 day of 3 trials 5-min training session with two identical objects positioned in opposite corners (15 cm distant of the walls), and (3) **Test** 5-min test session for memory retention. Test sessions were performed 1 after the last day of training. For OL retention test, one of the identical objects was displaced into a different position in the arena. The objects consist of cylindrical glass containers. The time spent exploring each object in each session was quantified and memory was indicated by an exploration index, calculated as the ratio of the exploration time of the repositioned object to the total exploration time of both objects. Behavioral experiments were conducted only at daytime, being performed in a illuminated room (constant temperature of 22 ± 1 °C). A video camera installed above the arena was used to record the experiment.

Water Maze: A circular pool was partially filled with water (19 – 21°C). A circular escape platform (10 cm diameter) was submerged approximately 0.5 cm below the surface of the water in the center of one of the pool quadrants (N, S, E, W). The animal has to find the platform through visual cues present on the walls of the experiment room. **Training** Rats received six consecutive training trials per day for five days, with the platform remaining in the same place. Each trial began by placing the animal into the pool, facing the wall, from one of eight possible start positions. The order of the release points varied randomly across days. The trial ended when the rat reached the hidden escape platform or after 60 s (total trial time) had elapsed. If the rat failed to locate the hidden platform the experimenter gently guided it to the platform. The rat stayed on the platform for 20 s. **Memory consolidation test session** On day 6, a 2-minute test session was carried out with the platform removed. The time animals took to find the platform in each trial of the training sessions (latency) was quantified and learning was assessed by comparing the average latency of the session across days. In the test, memory was

measured as the time spent in the quadrant where the platform was originally located (target quadrant). **Reversal learning** On day six, reversal training took place. Rats received eight consecutive training trials during which the hidden platform was located in the position opposite to that of initial training. Each trial was performed in the same way as described above. **Test** 24 hours later, the escape platform was removed from the water and the rat was allowed to swim freely for 120 s. The animal was placed in a point equidistant from where the platforms were in the training and in the reversal learning. The rat behavior in the pool was recorded by an overhead video camera. In the test, we measured a time index (amount of time rats spent searching in the target zone where the platform was in the first learning/time spent the target zone where was the platform in the reversal learning). Protocol adapted from Pamplona and Takahashi, 2006.

Behavioral Measurement

Freezing behavior was used as a memory index, being registered using a stopwatch in real time by an experienced observer that was unaware of the experimental conditions. Freezing was defined as total immobilization except for movements required for respiration (Blanchard, Blanchard, 1969).

Statistical Analysis

Since data from all experimental groups was proven to be both homoscedastic and normally distributed (Kolmogorov-Smirnov test with Lilliefors correction, $P > 0.05$), results were analyzed with Student's unpaired t-test (two tailed), one sample t-test, one-way or two-way ANOVA (repeated measures when necessary), followed by Tukey post hoc test for within and between comparisons. The data were expressed as mean \pm SEM and the values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Experiment 1: NASPM infusion in the BLA impairs fear memory consolidation

With the aim of studying the effects of NASPM upon the memory processes, a dose-response curve was performed and the optimal dose of this drug was used in the rest of the experiments. Animals were trained using the auditory fear conditioning paradigm and infused immediately after training in the BLA with 0.4, 4, 40 μ M NASPM, or vehicle (DMSO 1%). Animals were habituated in context A for two days, trained in context B 24 hours later and tested in context A after 24 hours (Figure 1A). There was a significant

effect of treatment on freezing levels in the tone consolidation test ($F_{3,28} = 10.32$; $p < 0.0001$) (Figure 1B). Tukey *post hoc* analysis showed that animals treated with NASPM displayed lower freezing levels than controls, ($p < 0.001$ (control vs 0.4); $p < 0.05$ (control vs 4); $p < 0.001$ (control vs 40)). Thus, NASPM prevented memory consolidation at all doses used. Based on these results, 0.4 μM was the NASPM concentration chosen for the subsequent experiments.

Experiment 2: NASPM infusion in the HPC impairs fear memory consolidation

In view of the results of the first experiment in the BLA, we attempted to verify whether blocking CP-AMPA receptor by NASPM would also impair fear memory consolidation when infused into the hippocampus. Using the contextual fear conditioning paradigm, animals were tested 48 hours following training. Immediately after training, 0.4 μM NASPM or DMSO 1% was infused into the hippocampus (Figure 1C). Freezing levels in the consolidation test were significantly reduced in the NASPM group compared to the control ($T(33) = 2.182$; $p = 0.0363$) (Figure 1D), indicating impairment in memory consolidation. These results suggest that the receptor plays an essential role in the fear memory consolidation also in the HPC.

Experiment 3: NASPM infusion in the HPC does not affect neutral memory consolidation

According to the results of the previous experiments, the NASPM impaired fear memory consolidation in the BLA and in the HPC according to the pavlovian paradigm. Then we decided to verify whether blocking CP-AMPA receptors would also have effect in the consolidation of a neutral memory dependent on the hippocampus. Animals underwent the object location task, received 0.4 μM NASPM or DMSO 1% infusions into HPC after the last training and were tested 24 hours later (Figure 2A). NASPM group ($T(6) = 3.393$; $p = 0.015$) and the control group ($T(7) = 3.213$; $p = 0.015$) explored more the object moved to a new position than the original one, as indicated by the exploration index (exploration time for replaced object/sum of both) in the test session, indicating both groups learned the objects original position and were able to remember during the test session. Since there was no significant difference of object preference between groups ($T(13) = 0.0181$; $p = 0.9858$) (Figure 2B), it suggests CP-AMPA blocking does not affect neutral memory consolidation in the HPC.

Experiment 4: NASPM infusion in the HPC affects spatial memory consolidation

Due to results in previous experiments where CP-AMPA activity was shown to be required for fear memory consolidation and not for neutral memory consolidation, we used a task with a low level of averseness to assess spatial memory consolidation to assess whether CP-AMPA has an important role in this task. Animals were trained in the water maze task, received 0.4 μ M NASPM or DMSO into the HPC after each training session, and memory was assessed 24 hours after the fifth training (Figure 3A). There was a significant effect of time on the latency to find the platform during the training sessions ($F_{(4,52)} = 21.41$; $p < 0.0001$) indicating that both groups decreased the latency over time and learned the task, but no difference between groups was observed (treatment factor $F_{(1,13)} = 0.0503$; $p = 0.8259$) nor interaction ($F_{(4,52)} = 0.9849$; $p = 0.4240$) (Figure 3B). In the session test, the NASPM group spent less time in the target quadrant during two minutes than controls ($T(13) = 3.125$; $p = 0.008$) (Figure 3C).

Experiment 5: NASPM infusion in the BLA impairs fear memory retrieval

Due to impairment on fear memory consolidation shown in our previous experiments 1 and 2 and the information that fear memory retrieval induces destabilization of the memory trace, which has been linked to a switch from CI-AMPA to CP-AMPA (Hong et al., 2013), we assessed whether CP-AMPA activity in the BLA played a role in fear retrieval. A retrieval session was carried out 24 hours following training. 0.4 μ M NASPM or 1% DMSO was infused into the BLA 20 minutes prior to retrieval (Figure 4A). Freezing levels in the retrieval session were significantly reduced in the NASPM group compared to the control ($T(19) = 2,297$; $p = 0,03$), indicating impairment in memory retrieval. These results suggest that the receptor plays an essential role in the fear memory retrieval in the BLA. There was no difference in freezing levels in the retrieval session ($p = 0.2622$) (Figure 4B), indicating no impairment in memory retrieval. These results suggest that the receptor plays a critical role in fear memory retrieval in the BLA.

Experiment 6: NASPM infusion in the HPC impairs fear memory retrieval

In experiment 6, we assessed whether CP-AMPA activity in the HPC played a role in fear retrieval. A retrieval session was carried out 24 hours following training and 0.4 μ M NASPM or 1% DMSO was infused into CA1 HPC 20 minutes prior to retrieval (Figure 4C). Freezing levels in the retrieval session were significantly reduced in the NASPM group compared to the control ($T(20) = 2.190$; $p = 0.0406$) (Figure 4D), indicating

impairment in memory retrieval. These results suggest that the receptor plays an essential role in the fear memory retrieval in the HPC.

Experiment 7: NASPM infusion in the HPC impairs reversal learning acquisition

Since memory retrieval might induce labile in order to be modified (Dudai, 2004; Monfils, Cowansage, Klann, & LeDoux, 2009), we used a water maze task to assess whether CP-AMPA has a key role in reversal learning. Animals underwent five training sessions with a hidden platform under water, six consecutive training trials per day for five days, with the platform remaining in the same place (target quadrant). On day six, rats received eight consecutive training trials during which the hidden platform was located in the position opposite to that of initial training (opposite quadrant; reversal training). Twenty minutes before reversal training 0.4 μ M NASPM or vehicle was infused into HPC. Twenty four hours later, the escape platform was removed from the water and the rat was allowed to swim freely for 120 s (Figure 5A). There was a significant effect of time on the latency to find the platform during the training sessions ($F_{(7,119)} = 6.274$; $p < 0.0001$) (Figure 5B), indicating that both groups decreased the latency over time and learned the task, but performance was not affected by NASPM, since there was no effect of treatment ($F_{(1,17)} = 3.009$; $p = 0.1009$) nor interaction ($F_{(7, 119)} = 0.9473$; $p = 0.4731$). In the test, the time index (amount of time rats spent searching in the target zone where the platform was in the first learning/time spent the target zone where was the platform in the reversal learning) shows the NASPM group spent more time in the target quadrant than controls ($T_{(16)} = 2,359$; $p = 0,0314$) (Figure 7C), suggesting an impairment in the acquisition of reversal learning.

Experiment 8: NASPM infusion in the HPC impairs the updating memory

Due to CP-AMPA key role on destabilization of the memory trace as we show in the previous experiment (experiment 7) we assessed whether blocking CP-AMPA activity in the HPC would impair the integration of the contextual information with the shock received the next day in the immediate shock deficit protocol. The animals were initially pre-exposed to the context for 180 seconds. On the next day, the rats received 0.4 μ M NASPM or DMSO 1% infusions into HPC were briefly reexposed to the operant chamber for 15 seconds and, in the end, received 2 footshocks (0.7 mA) (Figure 6A). The NASPM group freezing levels in the test session were significantly lower compared to the control ($T_{(12)} = 3.190$; $p = 0.0078$) (Figure 6B), indicating impairment in reducing the immediate

shock deficit. These results suggest that the receptor plays an essential role in updating memory in the HPC.

Discussion

Memory consolidation

One of the goals of experiment 1 was to perform a dose-response curve using three NASPM concentrations, 0.4, 4 and 40 μM to find the optimal dose of this drug. We found expressive freezing reduction with the lowest concentration, which was used in the subsequent experiments.

In experiments 1 and 2, we assessed whether CP-AMPA performs an important role in memory consolidation using fear conditioning. Despite evidence that CP-AMPA is inserted into potentiated synapses in the lateral amygdala (Clem & Haganir, 2010; Hong et al., 2013; Rumpel et al., 2005) and into the hippocampus for LTP induction (Gray, Fink, Sarinana, Vissel, & O'Dell, 2007; Park et al., 2016; Plant et al., 2006), its direct effect on memory consolidation had not been tested.

Whereas the initial period of consolidation would be a plastic state (Dudai, 2004), we hypothesized that CP-AMPA function would be crucial in this moment to promote proper stabilization of the memory trace. The deleterious effect of NASPM on memory consolidation in experiments 1 and 2 indicates that CP-AMPA activity in the BLA and CA1 hippocampus was important in the beginning of consolidation, during a moment when the memory trace was still unstable, and the blockade of this receptor prevented proper stabilization of the trace.

This finding is in agreement with studies that report an increase in CP-AMPA expression in thalamus-lateral amygdala synapses after fear conditioning (Clem & Haganir, 2010; Hong et al., 2013). Nevertheless, the time window in which CP-AMPA is detected is wide: according to electrophysiological recordings in slices, it ranged from 5 min to 12 hours (Hong et al., 2013) and from 12 to 48 hours following auditory fear conditioning (Clem & Haganir, 2010). Differences in the fear conditioning protocols might account for this discrepancy. It was also expected to find the impairment in memory consolidation the hippocampus, as CP-AMPA has been shown to take part in some mechanisms of hippocampal LTP induction (Park et al., 2016; Plant et al., 2006), but not all (Adesnik & Nicoll, 2007; Gray et al., 2007; Park et al., 2016).

Of note, the temporal dynamics of CP-AMPA in consolidation has not been addressed in vivo so far, although our results corroborate the assumption that CP-

AMPA is rapidly driven into the synapses in plastic states, such as the beginning of memory consolidation and memory retrieval. Stabilization of the trace is mediated by synaptic strengthening (related to LTP), and it is possible that NASPM perturbed this plasticity period by hindering CP-AMPA contribution during the initial period of consolidation, disrupting stabilization of the memory trace.

Due to our finding that fear memory consolidation was impaired by CP-AMPA blockade, in experiment 3 we aimed at assessing consolidation of a neutral memory dependent on the hippocampus. The object location task suggests that CP-AMPA was not necessary for consolidation of such neutral memory or, at least, not in the initial period of consolidation. It is possible that the CP-AMPA temporal dynamics differs according to the emotional valence of memory. Moreover, in experiment 4 we tested consolidation in the water maze, a hippocampus-dependent spatial memory task. Animals treated with NASPM displayed a memory deficit in the test session.

The object location and the water maze task differ in that the former has no motivational components, while the latter has an averseness factor, lower than fear conditioning (cool water), and contains a reinforcement for animals to learn (the platform allows them to escape water) (Vorhees & Williams, 2014).

In view of the key role of NE release in the emotional regulation of memory, this neuromodulator, as well as emotional stress, is responsible for the induction of GluA1 phosphorylation at specific sites promoting its synaptic insertion. This NE-driven phosphorylation of GluA1 lowers the threshold for LTP and in behavioral experiments, lowers the threshold for memory formation, providing a possible underlying molecular mechanism for emotion enhancements learning and memory (Hu et al., 2007). It can explain the different results we found in experiment 3, in which we used a task with lower emotional stress.

Taken together, experiments 1 to 4 indicate that memory valence and learning conditions may influence the mechanisms underlying memory consolidation, likely by the effects of arousal and stress (Mumby, 2002; Hu et al., 2007), and might as well influence CP-AMPA trafficking to the synapses, in line with studies that do not identify CP-AMPA insertion in CA1 in LTP (Adesnik & Nicoll, 2007; Gray et al., 2007).

Memory retrieval

Memory retrieval is also associated to plasticity since it involves an abrupt exchange of CI-AMPA to CP-AMPA (Hong et al., 2013). Previous work shows that blocking this switch of AMPAR prevents memory destabilization, suggesting that this transient exchange could underlie the memory trace labilization process. Thus, the CP-AMPA synaptic expression transforms a consolidated and stable memory into an unstable one (Hong et al., 2013). In experiments 5 and 6, we aimed at elucidating the role of CP-AMPA activity specifically in the BLA and in the HPC in memory retrieval. We hypothesized that fear memory retrieval would promote CP-AMPA synaptic insertion and its blockade by NASPM would impair memory expression.

According to our expectations, we found evidence for CP-AMPA involvement in the BLA and in the HPC, as observed in the retrieval sessions. The fear expression was reduced in the retrieval session in experiment 5 (BLA), and we found the same result in experiment 6 (HPC). This suggests that CP-AMPA is recruited in the BLA and in the HPC for memory retrieval, which occurs when the animal is exposed to a familiar stimulus (the context or the tone), and its blockade impaired retrieval. Indeed, short retrieval sessions, which are known for triggering reconsolidation (Monfils et al., 2009; Suzuki, 2004), induce CI-AMPA endocytosis (Bhattacharya et al., 2017; Hong et al., 2013; Rao-Ruiz et al., 2011) and a transient switch from CI to CP-AMPA (Hong et al., 2013). We assume that this switch could be also observed during memory retrieval in both structures.

Memory update

The consolidated memory expression leads to its destabilization. Retrieval labilizes the previously existing memory trace leaving it susceptible to interferences. The reconsolidation is necessary to turn this memory stable again. Functionally, retrieval-induced plasticity suggests the possibility of a memory being updated with new information addition through reconsolidation. In this way, memory would maintain its relevance even in the face of different circumstances of those present at the moment of its acquisition (Lee, Nader, & Schiller, 2017).

In experiments 7 and 8, we investigated the role of CP-AMPA activity specifically in the HPC in memory update through two different tasks (Reversal learning in Water Maze in experiment 7 and Immediate shock deficit in experiment 8). We hypothesized that fear memory retrieval would promote CP-AMPA synaptic insertion

and its blockade by NASPM would impair the destabilization of the memory and prevent memory update.

According to our expectations, we found evidence for CP-AMPA involvement in the HPC memory update in both tasks. In experiment 7, in the test session, the NASPM group spent more time in the target quadrant than controls, suggesting an impairment in the acquisition of reversal learning. It means that CP-AMPA blockade before reversal learning session prevented the memory update. In experiment 8, in the test session, the NASPM group freezing levels were significantly lower compared to the control group indicating impairment in reducing the immediate shock deficit. Suggesting an impairment the memory update too. These results suggest that CP-AMPA plays an essential role in update memory in the HPC.

Conclusion

Our results show that the consolidation of aversive memories depends on the activity of CP-AMPA in BLA and HPC. In HPC, the emotional valence of memory and the type of task to which the animals were submitted appear to be determinants for CP-AMPA activity. Hippocampal CP-AMPA plays an important role in contextual fear memory and slightly aversive spatial memory consolidation, but not in neutral memory consolidation. Furthermore, CP-AMPA plays an important role in memory retrieval in the HPC and in the BLA. CP-AMPA also participates in processes that involve changes in consolidated memory, as in the acquisition of the reversal learning and in the memory update. Our data support a role of CP-AMPA in mnemonic processes that are associated to plastic changes in the brain.

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements: This research was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

- Adesnik, H., & Nicoll, R. A. (2007). Conservation of Glutamate Receptor 2-Containing AMPA Receptors during Long-Term Potentiation. *Journal of Neuroscience*, *27*(17), 4598–4602. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0325-07.2007>
- Arundine, M., Tymianski, M. (2003). Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium*, *34*(4-5), 325-337. [https://doi.org/10.1016/S0143-4160\(03\)00141-6](https://doi.org/10.1016/S0143-4160(03)00141-6)
- Bhattacharya, S., Kimble, W., Buabeid, M., Bhattacharya, D., Bloemer, J., Alhowail, A., ... Suppiramaniam, V. (2017). Altered AMPA receptor expression plays an important role in inducing bidirectional synaptic plasticity during contextual fear memory reconsolidation. *Neurobiology of Learning and Memory*, *139*, 98–108. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.12.013>
- Beattie, E. C., Carroll, R. C., Yu, X., Morishita, W., Yasuda, H., von Zastrow, M., & Malenka, R. C. (2000). Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD. *Nature Neuroscience*, *3*(12), 1291–1300. <https://doi.org/10.1038/81823>
- Blanchard, R.J., & Blanchard, D.C. (1969). Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *68*(1), 129–135. <http://dx.doi.org/10.1037/h0027676>
- Clapham, D.E. (1995). Calcium signaling. *Cell*, *131*(6), 1047-1058. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.028>
- Clem, R. L., & Huganir, R. L. (2010). Calcium-Permeable AMPA Receptor Dynamics Mediate Fear Memory Erasure. *Science*, *330*(6007), 1108–1112. <https://doi.org/10.1126/science.1195298>
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., & Traynelis, S. F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological Reviews*, *51*(1), 7–61.
- Dudai, Y. (2004). The Neurobiology of Consolidations, Or, How Stable is the Engram? *Annual Review of Psychology*, *55*(1), 51–86. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.55.090902.142050>
- Henley, J., & Wilkinson, K. (2016). Synaptic AMPA receptor composition in development, plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, *17*(6), 337–350. DOI: 10.1038/nrn.2016.37
- Gray, E. E., Fink, A. E., Sarinana, J., Vissel, B., & O'Dell, T. J. (2007). Long-Term Potentiation in the Hippocampal CA1 Region Does Not Require Insertion and Activation of GluR2-Lacking AMPA Receptors. *Journal of Neurophysiology*, *98*(4), 2488–2492. <https://doi.org/10.1152/jn.00473.2007>
- Hong, I., Kim, J., Kim, J., Lee, S., Ko, H.-G., Nader, K., ... Choi, S. (2013). AMPA receptor exchange underlies transient memory destabilization on retrieval. *Proceedings*

of the National Academy of Sciences, 110(20), 8218–8223.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1305235110>

Hu, E. Real, K. Takamiya, M.G. Kang, J. Ledoux, R.L. Huganir & R. Malinow. (2007) Emotion enhances learning via norepinephrine regulation of AMPA-receptor trafficking. *Cell*, 131(1), 160-173. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.09.017>

Lee, H. K. (2012). Ca²⁺-permeable AMPA receptors in homeostatic synaptic plasticity. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 5(17), 1-18. 10.3389/fnmol.2012.00017

Lee, J.L.C. (2010). Memory reconsolidation mediates the updating of hippocampal memory content. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 4, 168. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2010.00168>

McDonald, A. J. (1996). Localization of AMPA glutamate receptor subunits in subpopulations of non-pyramidal neurons in the rat basolateral amygdala. *Neuroscience Letters*, 208(3), 175–178. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(96\)12585-4](https://doi.org/10.1016/0304-3940(96)12585-4)

Monfils, M.-H., Cowansage, K. K., Klann, E., & LeDoux, J. E. (2009). Extinction-Reconsolidation Boundaries: Key to Persistent Attenuation of Fear Memories. *Science*, 324(5929), 951–955. <https://doi.org/10.1126/science.1167975>

Mumby, D. G. (2002). Hippocampal Damage and Exploratory Preferences in Rats: Memory for Objects, Places, and Contexts. *Learning & Memory*, 9(2), 49–57. <https://doi.org/10.1101/lm.41302>

Nader, K., Schafe, G.E. & Ledoux, J.E. (2000). The labile nature of consolidation theory. *Nature Reviews Neuroscience*, 1(2000), 216-219. doi:10.1038/35044580

Pamplona, F.A., & Takahashi, R.N. (2006). WIN 55212-2 impairs contextual fear conditioning through the activation of CB1 cannabinoid receptors. *Neuroscience Letters*, 397 (1-2), 88–92. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.12.026>

Park, P., Sanderson, T. M., Amici, M., Choi, S.-L., Bortolotto, Z. A., Zhuo, M., ... Collingridge, G. L. (2016). Calcium-Permeable AMPA Receptors Mediate the Induction of the Protein Kinase A-Dependent Component of Long-Term Potentiation in the Hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 36(2), 622–631. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3625-15.2016>

Plant, K., Pelkey, K. A., Bortolotto, Z. A., Morita, D., Terashima, A., McBain, C. J., ... Isaac, J. T. R. (2006). Transient incorporation of native GluR2-lacking AMPA receptors during hippocampal long-term potentiation. *Nature Neuroscience*, 9(5), 602–604. <https://doi.org/10.1038/nn1678>

Rao-Ruiz, P., Rotaru, D. C., van der Loo, R. J., Mansvelder, H. D., Stiedl, O., Smit, A. B., & Spijker, S. (2011). Retrieval-specific endocytosis of GluA2-AMPA receptors underlies adaptive reconsolidation of contextual fear. *Nature Neuroscience*, 14(10), 1302–1308. <https://doi.org/10.1038/nn.2907>

- Rumpel, S., LeDoux, J., Zador, A., & Malinow, R. (2005). Postsynaptic receptor trafficking underlying a form of associative learning. *Science*, *308*(5718), 83–88. <https://doi.org/10.1126/science.1103944>
- Shepherd, J.D. (2012). Memory, plasticity and sleep - A role for calcium permeable AMPA receptors? *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *5*(49), 1-5. <http://doi.org/10.3389/fnmol.2012.00049>
- Sommer, B., Köhler, M., Sprengel, R., & Seeburg, P. H. (1991). RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell*, *67*(1), 11–19.
- Suzuki, A. (2004). Memory Reconsolidation and Extinction Have Distinct Temporal and Biochemical Signatures. *Journal of Neuroscience*, *24*(20), 4787–4795. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5491-03.2004>
- Verdoorn, T., Burnashev, N., Monyer, H., Seeburg, P., & Sakmann, B. (1991). Structural determinants of ion flow through recombinant glutamate receptor channels. *Science*, *252*(5013), 1715–1718. <https://doi.org/10.1126/science.1710829>
- Vorhees, C. V., & Williams, M. T. (2014). Value of water mazes for assessing spatial and egocentric learning and memory in rodent basic research and regulatory studies. *Neurotoxicology and Teratology*, *45*, 75–90. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2014.07.003>

Legends and figures

Figure 1. Blocking CP-AMPA in the BLA and in the HPC impairs fear memory consolidation. (A) Schematic representation of the auditory fear memory consolidation. (B) Freezing levels during tone test session. NASPM animals displayed reduced freezing compared to the controls during tone test session ($p < 0.0001$) ($n = 13$ for control, $n = 6$ for $0.4 \mu\text{M}$ NASPM, $n = 7$ for $4 \mu\text{M}$ NASPM, $n = 6$ for $40 \mu\text{M}$ NASPM). Data are presented as mean \pm SEM. (*) Significant difference ($p < 0.05$, one-way ANOVA, followed by Tukey post hoc). (***) Significant difference ($p < 0.001$, one-way ANOVA, followed by Tukey post hoc). (C) Schematic representation of the contextual fear memory consolidation. (D) Freezing levels during test session. NASPM animals displayed reduced freezing compared to the controls ($p < 0.05$) ($n = 18$ for control and $n = 17$ for $0.4 \mu\text{M}$ NASPM). Data are presented as mean \pm SEM. (*) Significant difference ($p < 0.05$, Student's t-test).

Figure 2. Blocking CP-AMPA in the HPC does not affect consolidation of object location memory. (A) Schematic representation of the testing memory consolidation in the object location task. (B) Exploration index (exploration time for replaced object/sum of both) in the test session. NASPM and control animals explored more the object moved to a new position than the original one ($p < 0.05$), but there was no difference between groups ($p > 0.05$) ($n = 8$ for control and $n = 7$ for $0.4 \mu\text{M}$ NASPM). Data are presented as mean \pm SEM.

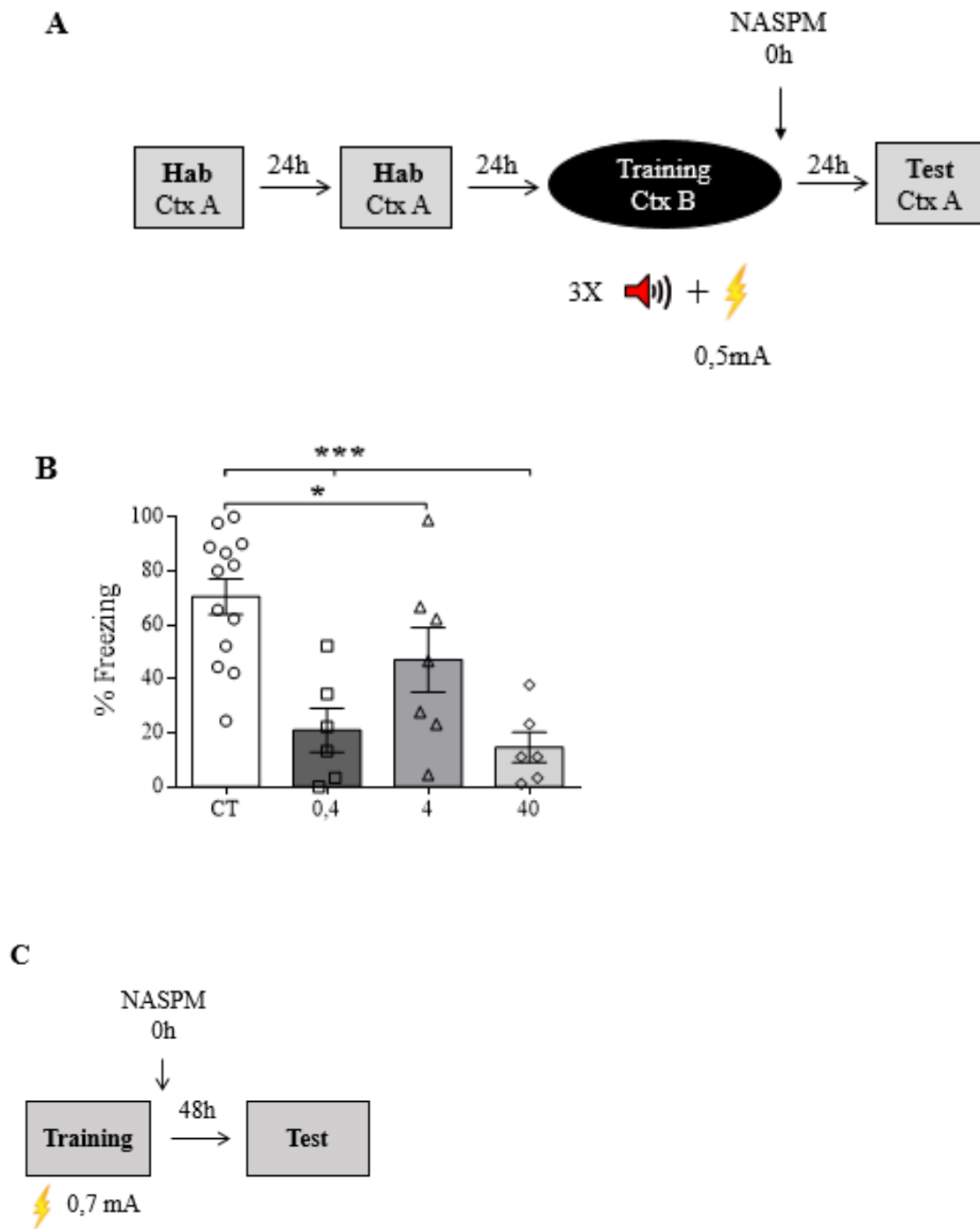
Figure 3. Blocking CP-AMPA in the HPC impairs spatial memory in the water maze. (A) Schematic representation of the testing memory consolidation in the water maze. Animals underwent five training sessions with a hidden platform under water, after each of which $0.4 \mu\text{M}$ NASPM was infused into CA1 HPC. In the test session, the platform was removed and spatial memory was assessed. (B) Learning curve (T1-T5 = training days 1 to 5). Both control and NASPM groups decreased the latency to find the platform over training days ($F_{(4,52)} = 21.41$; $p < 0.0001$), but no difference between groups was observed ($F_{(1,13)} = 0.0503$; $p = 0.8259$). (C) Time spent in the platform quadrant (zone) relative to the session test. NASPM group spent less time in the target quadrant than controls ($p < 0.05$) ($n = 8$ for control and $n = 7$ for $0.4 \mu\text{M}$ NASPM). Data are presented as mean \pm SEM. (**) Significant difference ($p < 0.05$, Student's t-test).

Figure 4. Blocking CP-AMPA in the BLA and in the HPC impairs fear memory retrieval. (A) Schematic representation of fear memory retrieval in the auditory fear conditioning task. (B) Freezing levels during retrieval session. A significant difference between groups was observed ($p < 0.05$) ($n = 11$ for control and $n = 10$ for $0.4 \mu\text{M}$ NASPM). Data are presented as mean \pm SEM. ($p > 0.05$, Student's t-test). (C) Schematic representation of fear memory retrieval in the contextual fear conditioning task. (D) Freezing levels during retrieval session. A significant difference between groups was observed ($p < 0.05$) ($n = 11$ for control and $n = 11$ for $0.4 \mu\text{M}$ NASPM). Data are presented as mean \pm SEM. (*) Significant difference ($p < 0.05$, Student's t-test).

Figure 5. Blocking CP-AMPA in the BLA impairs reversal learning. (A) Schematic representation of the reversal learning in water maze task. (B) Learning curve (T1-T5 = training days 1 to 5). Both control and NASPM groups decreased the latency to find the platform over training days ($F(7,119) = 6,274$; $p < 0.0001$). (C) Time index (amount of time rats spent searching in the target zone where the platform was in the first learning/time spent the target zone where was the platform in the reversal learning). NASPM group spent displayed a bigger index than controls ($p < 0.05$) ($n = 9$ for control, $n = 9$ for $0.4 \mu\text{M}$ NASPM) it suggests an impairment in the reverse learning. Data are presented as mean \pm SEM. (*) Significant difference ($p < 0.05$, Student's t-test).

Figure 6. Blocking CP-AMPA in the HPC impairs the updating memory. (A) Schematic representation of the testing memory consolidation in the object location task. (B) Freezing levels during test session. NASPM animals displayed reduced freezing compared to the controls ($p < 0.05$) ($n = 7$ for control and $n = 7$ for $0.4 \mu\text{M}$ NASPM). Data are presented as mean \pm SEM. (*) Significant difference ($p < 0.05$, Student's t-test).

Figure 1



D

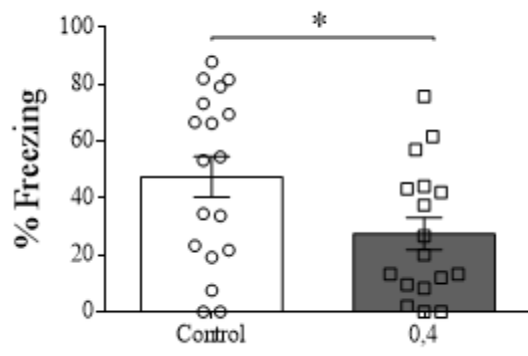


Figure 2

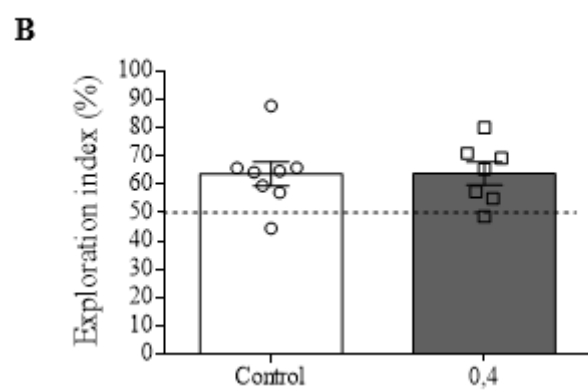
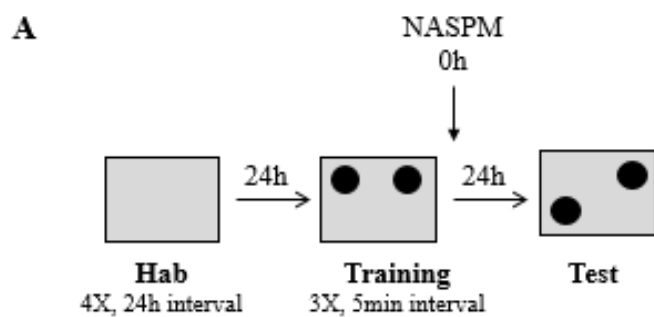


Figure 3

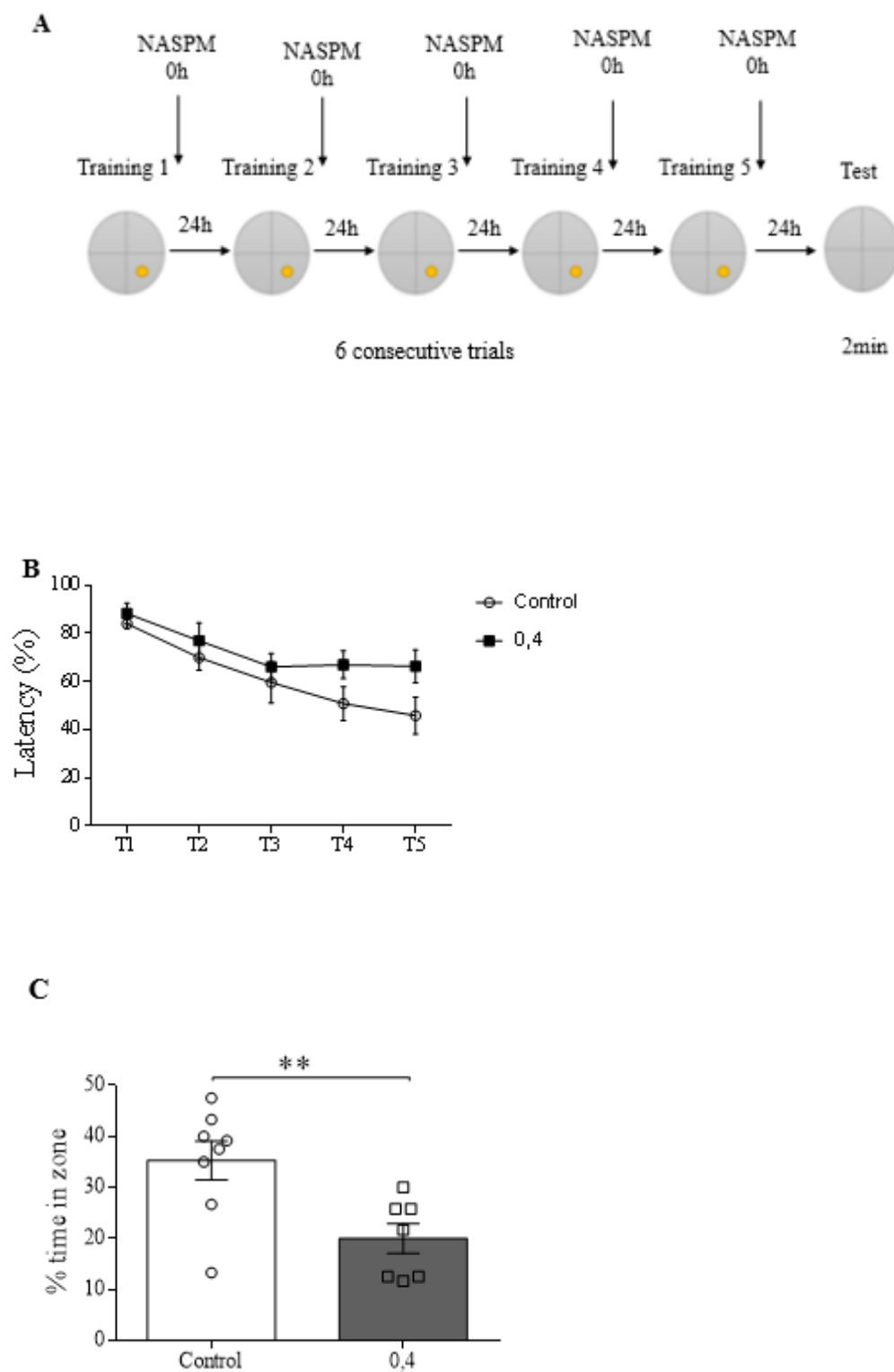
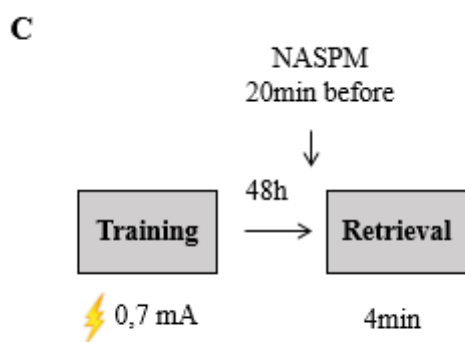
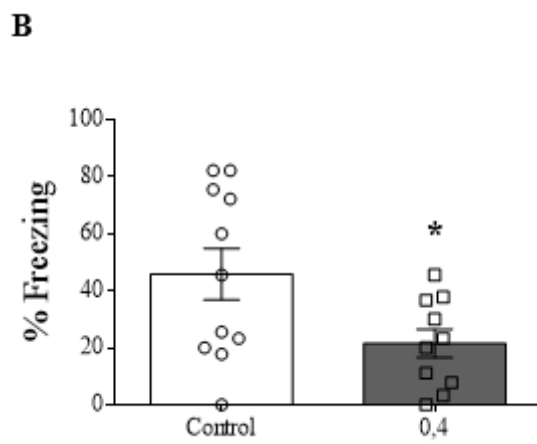
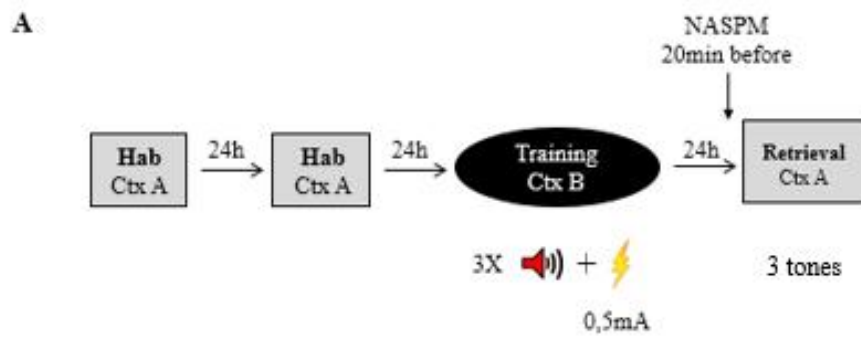


Figure 4



D

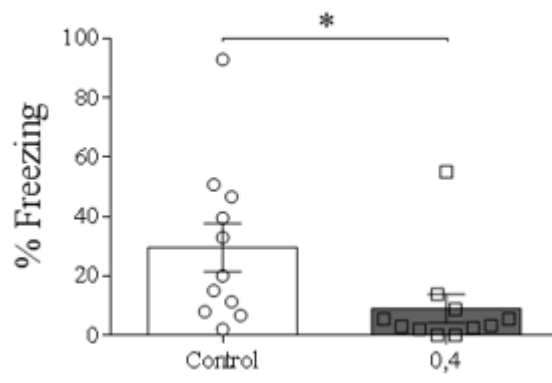
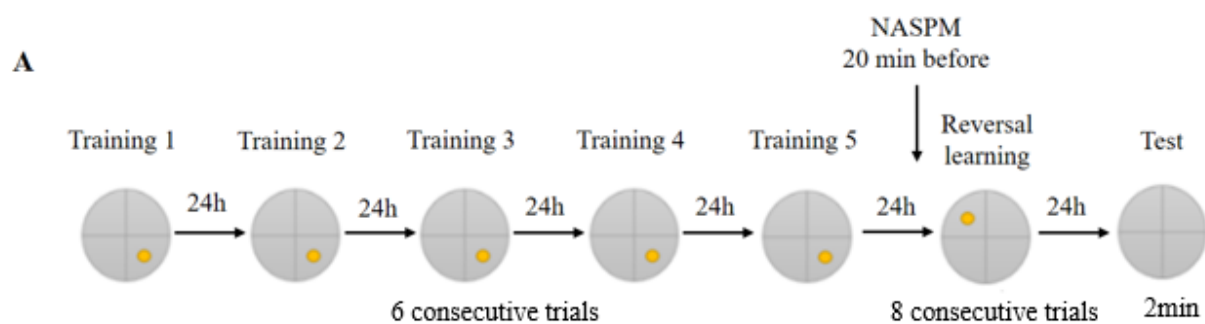
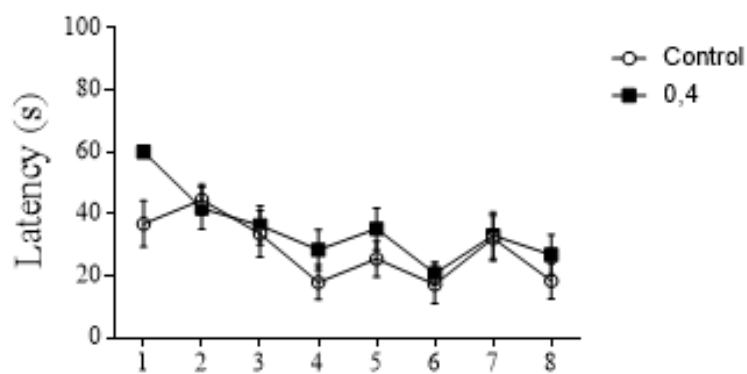


Figure 5



B



C

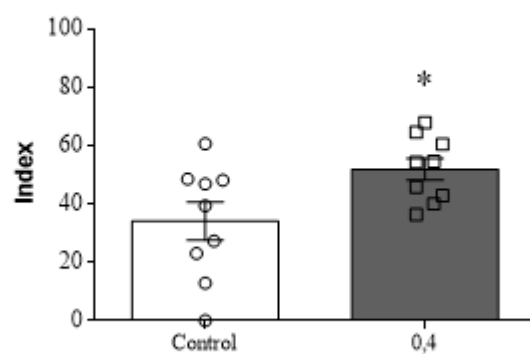
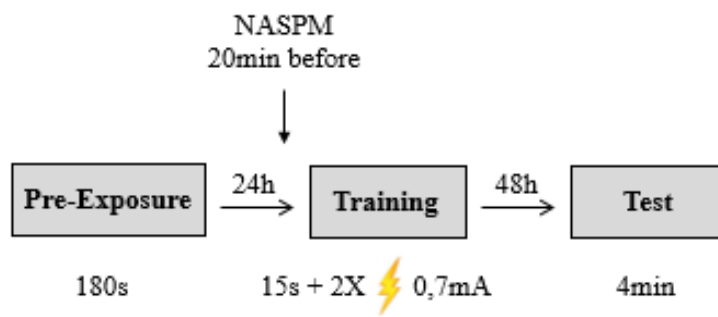
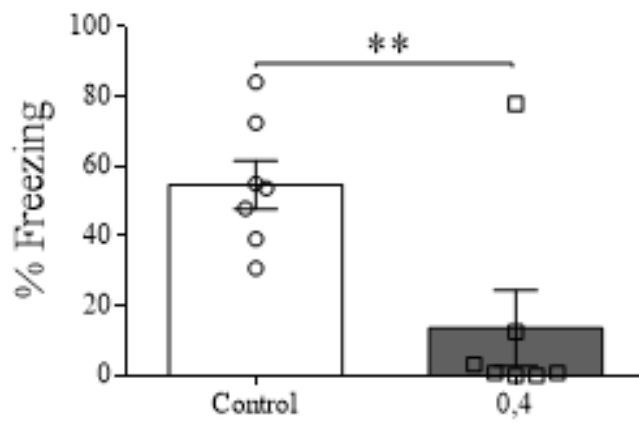


Figure 6

A



B



5 DISCUSSÃO GERAL

Demonstramos a importância do CP-AMPAR para diversos processos mnemônicos através de seus efeitos comportamentais. Os resultados obtidos indicam que o CP-AMPAR foi importante no início da consolidação de memórias aversivas na BLA e no HPC utilizando o condicionamento Pavloviano. Enquanto o período inicial da consolidação seria um estado plástico (Dudai, 2004), hipotetizamos que a função do CP-AMPAR seria crucial neste momento para promover a estabilização adequada do traço de memória. Durante este período, o traço da memória ainda era instável e o bloqueio desse receptor impediu a estabilização adequada do traço.

Apesar da evidência de que CP-AMPAR é inserido em sinapses potenciadas na amígdala lateral (Clem & Huganir, 2010; Hong et al., 2013; Rumpel et al., 2005) e no hipocampo para indução de LTP (Gray, Fink, Sarinana, Vissel, & O'Dell, 2007; Park et al., 2016; Plant et al., 2006), seu efeito direto na consolidação da memória ainda não havia sido testado.

Nossos achados estão de acordo com estudos que relatam um aumento na expressão de CP-AMPAR em sinapses entre o tálamo e a amígdala lateral após condicionamento aversivo (Clem & Huganir, 2010; Hong et al., 2013). No entanto, a janela de tempo em que o CP-AMPAR foi detectado é ampla: de acordo com registros eletrofisiológicos em fatias, houve a detecção deste receptor de 5 min a 12 horas (Hong et al., 2013) e de 12 a 48 horas após o condicionamento aversivo ao tom (Clem & Huganir, 2010). Diferenças nos protocolos de condicionamento aversivo podem explicar essa discrepância. Era esperado também encontrar o comprometimento na consolidação da memória no HPC, visto que o CP-AMPAR demonstrou participar em alguns mecanismos de indução de LTP no HPC (Park et al., 2016; Plant et al., 2006), mas não todos (Adesnik & Nicoll, 2007; Gray et al., 2007; Park et al., 2016).

Destaca-se que a dinâmica temporal do CP-AMPAR na consolidação da memória não foi abordada *in vivo* até o presente momento, embora nossos resultados corroborem a suposição de que o CP-AMPAR é conduzido rapidamente para as sinapses em estados plásticos, como o início da consolidação e a evocação da memória. A estabilização do traço é mediada pelo fortalecimento sináptico (relacionado à LTP), e é provável que o NASPM perturbe esse período de plasticidade dificultando a contribuição de CP-AMPAR durante o período inicial da consolidação, interrompendo, desta forma, a estabilização do traço da memória.

No HPC, os dados também indicam a participação de CP-AMPA na consolidação de memórias espaciais com um grau baixo de aversividade, mas não revelam a importância desse receptor na consolidação de memórias neutras. Testamos a consolidação no labirinto aquático, uma tarefa de memória espacial dependente do hipocampo, na qual os animais tratados com NASPM apresentaram déficit de memória. Na tarefa de localização de objetos, os resultados sugerem que o CP-AMPA não é necessário para a consolidação dessa memória neutra ou, pelo menos, não no período inicial de consolidação. É possível que a dinâmica temporal CP-AMPA difira de acordo com a valência emocional da memória.

As tarefas de localização de objetos e o labirinto aquático diferem entre si visto que o primeiro não tem componentes motivacionais, enquanto o último possui um fator de aversão, menor que o condicionamento aversivo (água fria) e contém um reforço para que os animais aprendam (a plataforma permite que eles escapem água) (Vorhees & Williams, 2014).

A liberação de noradrenalina (NE) possui papel fundamental na regulação emocional da memória. Este neuromodulador, bem como o estresse emocional, é responsável pela indução de fosforilação de GluA1 em locais específicos promovendo sua inserção sináptica. Esta fosforilação orientada de GluA1 pela NE reduz o limiar para LTP em experimentos comportamentais, reduzindo o limiar para a formação da memória e proporcionando um possível mecanismo molecular subjacente para o aprendizado e a memória de eventos com componentes emocionais (Hu et al., 2007). Estes dados podem explicar os diferentes resultados que encontramos no experimento 3, em que usamos uma tarefa com menor estresse emocional.

Desse modo, a valência emocional da memória e o tipo de tarefa a que os animais foram submetidos podem influenciar os mecanismos subjacentes à consolidação da memória, provavelmente, pelos efeitos da excitação e do estresse (Mumby, 2002; Hu et al., 2007) e também podem influenciar o tráfego de CP-AMPA para as sinapses, de acordo com estudos que não identificam a inserção de CP-AMPA em CA1 em LTP (Adesnik & Nicoll, 2007; Gray et al., 2007).

Através de protocolos de consolidação em diferentes tipos de tarefas (aversivas e neutras) buscamos uma melhor compreensão da influência da valência emocional na atividade do CP-AMPA. Entretanto, convém explorar mais tal influência buscando eliminar possíveis efeitos encontrados devido a diferenças características de cada tarefa utilizada. Poderiam ser feitos experimentos utilizando uma mesma tarefa e variando

apenas a valência emocional. Por exemplo, empregar tarefas de condicionamento aversivo variando a intensidade do choque ou a quantidade de pareamentos. Eliminando, assim, a possível interferência do uso de diferentes tarefas. Seria interessante também avaliar se a valência emocional da memória interfere na dinâmica temporal do CP-AMPA, analisando o efeito do bloqueio desse receptor em diferentes tempos dentro da janela de consolidação sináptica de memórias aversivas de diferentes intensidades. O mesmo poderia ser feito utilizando tarefas de memórias neutras.

Os resultados dos experimentos de evocação sugerem que os receptores CP-AMPA inseridos na membrana pós-sináptica durante a evocação têm um papel fundamental para a expressão da memória. Buscamos elucidar o papel da atividade CP-AMPA na evocação da memória especificamente no BLA e no HPC. Hipotetizamos que a evocação da memória aversiva promoveria a inserção sináptica de CP-AMPA e seu bloqueio por NASPM prejudicaria a expressão da memória.

De acordo com as nossas expectativas, encontramos evidências para o envolvimento de CP-AMPA na BLA e no HPC. Conforme observado nas sessões de evocação, a expressão de medo foi reduzida em ambos os experimentos. Isto sugere que o CP-AMPA é recrutado na BLA e no HPC para a evocação da memória, que ocorre quando o animal é exposto a um estímulo familiar (o contexto ou o tom) e que o bloqueio de CP-AMPA prejudica a evocação.

A evocação da memória também está associada à plasticidade, pois envolve uma troca abrupta de CI-AMPA para CP-AMPA (Hong et al., 2013). O trabalho anterior mostra que o bloqueio desta mudança de AMPAR evita a desestabilização da memória, sugerindo que essa troca transitória poderia estar subjacente ao processo de labilização do traço da memória. Assim, a expressão sináptica CP-AMPA transforma uma memória consolidada e estável em uma instável (Hong et al., 2013). Tais resultados estão de acordo com os dados dos nossos experimentos.

De fato, as sessões curtas de evocação, que são conhecidas por desencadear a reconsolidação (Monfils et al., 2009; Suzuki, 2004), induzem a endocitose de CI-AMPA (Bhattacharya et al., 2017; Hong et al., 2013; Rao-Ruiz et al., 2011) e uma troca transitória de CI para CP-AMPA (Hong et al., 2013). Nós assumimos que essa troca também pode ser observada durante a evocação da memória em ambas as estruturas.

Buscando uma maior compreensão acerca da participação dos CP-AMPARs na evocação, o mesmo experimento poderia ser realizado com protocolo envolvendo mais pareamentos ou utilizando choques mais fracos e mais fortes a fim de identificar se o

nível de aversividade da memória formada interfere na participação destes receptores durante a evocação.

Os resultados dos experimentos de atualização da memória no HPC sugerem um papel fundamental dos receptores CP-AMPA inseridos na membrana pós-sináptica durante a evocação para o acréscimo de novas informações. Investigamos o papel da atividade de CP-AMPA especificamente no HPC na atualização da memória através de duas tarefas diferentes (aprendizado reverso no labirinto aquático e déficit do choque imediato). Hipotetizamos que a evocação da memória aversiva promoveria a inserção sináptica CP-AMPA e seu bloqueio pela NASPM prejudicaria a desestabilização da memória e evitaria a atualização da memória.

De acordo com nossas expectativas, encontramos evidências do envolvimento do CP-AMPA no HPC na atualização da memória em ambas as tarefas. No experimento 7, na sessão de teste, o grupo NASPM gastou mais tempo no quadrante alvo do que os controles, sugerindo prejuízo na aquisição do aprendizado reverso. Isso significa que o bloqueio CP-AMPA antes da sessão de aprendizado reverso impediu a atualização da memória. No experimento 8, na sessão de teste, os níveis de congelamento do grupo NASPM foram significativamente menores em comparação com o grupo controle, indicando comprometimento na redução do déficit do choque imediato, sugerindo, também, um prejuízo na atualização da memória.

A expressão de memória consolidada leva à sua desestabilização. A evocação labiliza o traço de memória anteriormente existente deixando-o suscetível a interferências. A reconsolidação é necessária para tornar esta memória estável novamente. Funcionalmente, a plasticidade induzida pela evocação sugere a possibilidade de uma memória ser atualizada com a adição de novas informações através da reconsolidação. Desta forma, a memória manteria sua relevância mesmo diante das diferentes circunstâncias presentes no momento da sua aquisição (Lee, Nader, & Schiller, 2017).

Visto que ambas as tarefas utilizadas envolvem evocação de uma memória previamente consolidada, esses experimentos corroboram a ideia de que o CP-AMPA inserido na sinapse faz parte dos mecanismos que não apenas promovem a evocação, como também permitem a sua labilização e alteração da memória no HPC.

Hong et al. (2013) verificaram que o bloqueio de CP-AMPA na amígdala lateral (LA) imediatamente após a evocação prejudicou a reconsolidação. Sugerimos refazer o experimento utilizado naquele trabalho, utilizando a tarefa de condicionamento aversivo

ao contexto com infusão de NASPM no HPC após a evocação. Se os resultados encontrados indicassem um prejuízo na reconsolidação também no HPC, poderia ser feito o experimento do aprendizado reverso para verificar a participação de CP-AMPAR na reconsolidação no Water Maze.

A infusão de NASPM no HPC seria feita imediatamente após a sessão do aprendizado reverso para verificar se o CP-AMPAR inserido na membrana durante a evocação perturbaria o processo de reconsolidação (prejudicando o aprendizado reverso). O mesmo poderia ser feito para o choque imediato: a infusão de NASPM no HPC seria feita imediatamente após a sessão de treino para verificar seu impacto na reconsolidação.

Nossos resultados corroboram os dados que indicam o envolvimento do CP-AMPAR nos processos de formação e alteração da memória. Eles também fornecem uma melhor compreensão sobre o papel do CP-AMPAR, analisado através de dados comportamentais, nos processos mnemônicos. Dados até então pouco trabalhados pela literatura. E ampliam o conhecimento pré-existente acerca do tráfico de AMPA com base em mecanismos moleculares.

Com intuito de fornecer maior robustez aos resultados comportamentais encontrados, duas técnicas podem ser empregadas: western blot e registro eletrofisiológico. O western blot com a técnica de sinaptossomo através do qual a utilização das frações sinápticas de hipocampo e amígdala permitiria quantificar as subunidades GluA1 e GluA2. Através da comparação GluA2/GluA1 em diferentes momentos, seria possível inferir a expressão de CP-AMPAR (caracterizado por não conter GluA2) como no início da consolidação, na evocação, durante a sessão do aprendizado reverso, da sessão do choque imediato e em cada um dos dias do protocolo de esquecimento. Porém essa abordagem não é muito precisa, visto que não há marcador específico para o CP-AMPAR. Uma técnica mais precisa seria o registro eletrofisiológico das correntes excitatórias pós-sinápticas realizado em fatias de estruturas encefálicas obtidas após a realização de protocolos comportamentais específicos, como no início da consolidação, na evocação, durante a sessão do aprendizado reverso, da sessão do choque imediato e em cada um dos dias do protocolo de esquecimento. Através de método, seria possível mensurar o índice de retificação de corrente, propriedade característica do CP-AMPAR, uma medida mais direta da expressão sináptica desse receptor.

6 CONCLUSÕES

Este trabalho configura uma dissertação de mestrado e visou elucidar o papel do receptor AMPA permeável a cálcio (CP-AMPA) em diversos processos mnemônicos. Seu desenvolvimento deu-se como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de mestre.

Nossos resultados demonstram que a consolidação de memórias aversivas é dependente da atividade de CP-AMPA na BLA e no HPC. No HPC, a valência emocional da memória e o tipo de tarefa a que os animais foram submetidos parecem ser determinantes para a atividade CP-AMPA. No HPC, o CP-AMPA desempenha um papel chave na consolidação da memória aversiva contextual e da memória ligeiramente aversiva espacial, mas não na consolidação de uma memória neutra. Além disso, o CP-AMPA desempenha um papel importante na recuperação da memória no HPC e na BLA. O CP-AMPA também participa de processos que envolvem mudanças na memória consolidada, como na aquisição do aprendizado reverso e na atualização de memória. Nossos dados suportam um papel importante do CP-AMPA em processos mnemônicos que estão associados a mudanças plásticas no cérebro.

REFERÊNCIAS

ARUNDINE, M.; TYMIANSKI, M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. **Cell calcium**, v. 34, n. 4, p. 325-337, 2003.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

BHATTACHARYA, S. et al. Altered AMPA receptor expression plays an important role in inducing bidirectional synaptic plasticity during contextual fear memory reconsolidation. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 139, p. 98–108, mar. 2017.

BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C. Defensive reactions in the albino rat. **Learning and Motivation**, v. 2, n. 4, p. 351–362, nov. 1971.

CLEM, R. L.; HUGANIR, R. L. Calcium-Permeable AMPA Receptor Dynamics Mediate Fear Memory Erasure. **Science**, v. 330, n. 6007, p. 1108–1112, 19 nov. 2010.

DINGLELINE, R. et al. The glutamate receptor ion channels. **Pharmacological Reviews**, v. 51, n. 1, p. 7–61, mar. 1999.

DUDAI, Y. The Neurobiology of Consolidations, Or, How Stable is the Engram? **Annual Review of Psychology**, v. 55, n. 1, p. 51–86, fev. 2004.

GOOSENS, K. A. Hippocampal regulation of aversive memories. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 21, n. 3, p. 460–466, jun. 2011.

HENLEY, J. M.; WILKINSON, K. A. Synaptic AMPA receptor composition in development, plasticity and disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 17, n. 6, p. 337–350, 15 abr. 2016.

HONG, I. et al. AMPA receptor exchange underlies transient memory destabilization on retrieval. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 20, p. 8218–8223, 14 maio 2013.

LEDOUX, J. E. Emotion circuits in the brain. **Annual Review of Neuroscience**, v. 23, p. 155–184, 2000.

LEE, H. K. Ca²⁺-permeable AMPA receptors in homeostatic synaptic plasticity. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 5, 2012.

LEE, H. K. et al. Specific roles of AMPA receptor subunit GluR1 (GluA1) phosphorylation sites in regulating synaptic plasticity in the CA1 region of hippocampus. **Journal of neurophysiology**, v. 103, n. 1, p. 479-489, 2009.

LU, W. et al. Subunit Composition of Synaptic AMPA Receptors Revealed by a Single-Cell Genetic Approach. **Neuron**, v. 62, n. 2, p. 254–268, abr. 2009.

LUSCHER, C.; MALENKA, R. C. NMDA Receptor-Dependent Long-Term Potentiation and Long-Term Depression (LTP/LTD). **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 6, p. a005710–a005710, 1 jun. 2012.

- LYNCH, M. A. Long-Term Potentiation and Memory. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 1, p. 87–136, 1 jan. 2004.
- MALENKA, R. C.; BEAR, M. F. LTP and LTD. **Neuron**, v. 44, n. 1, p. 5–21, set. 2004.
- MAN, H. Y. GluA2-lacking, calcium-permeable AMPA receptors—inducers of plasticity? **Current opinion in neurobiology**, v. 21, n. 2, p. 291-298, 2011.
- MCDONALD, A. J. Localization of AMPA glutamate receptor subunits in subpopulations of non-pyramidal neurons in the rat basolateral amygdala. **Neuroscience Letters**, v. 208, n. 3, p. 175–178, abr. 1996.
- MIGUES, P. V. et al. Blocking Synaptic Removal of GluA2-Containing AMPA Receptors Prevents the Natural Forgetting of Long-Term Memories. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 12, p. 3481–3494, 23 mar. 2016.
- MONFILS, M.-H. et al. Extinction-Reconsolidation Boundaries: Key to Persistent Attenuation of Fear Memories. **Science**, v. 324, n. 5929, p. 951–955, 15 maio 2009.
- NADER, K.; HARDT, O. A single standard for memory: the case for reconsolidation. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 3, p. 224–234, mar. 2009.
- NADER, K.; SCHAFE, G. E.; LE DOUX, J. E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 722–726, 17 ago. 2000.
- NADER, K.; SCHAFE, G. E.; LEDOUX, J. E. The labile nature of consolidation theory. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 1, n. 3, p. 216–219, dez. 2000.
- PAUSE, B. M. et al. Perspectives on Episodic-Like and Episodic Memory. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 7, 2013.
- PLANT, K. et al. Transient incorporation of native GluR2-lacking AMPA receptors during hippocampal long-term potentiation. **Nature Neuroscience**, v. 9, n. 5, p. 602–604, maio 2006.
- PRESTON, A. R.; EICHENBAUM, H. Interplay of Hippocampus and Prefrontal Cortex in Memory. **Current Biology**, v. 23, n. 17, p. R764–R773, set. 2013.
- RAO-RUIZ, P. et al. Retrieval-specific endocytosis of GluA2-AMPA receptors underlies adaptive reconsolidation of contextual fear. **Nature Neuroscience**, v. 14, n. 10, p. 1302–1308, 11 set. 2011.
- RODRIGUES, S. M.; SCHAFE, G. E.; LEDOUX, J. E. Molecular Mechanisms Underlying Emotional Learning and Memory in the Lateral Amygdala. **Neuron**, v. 44, n. 1, p. 75–91, set. 2004.
- RUMPEL, S. et al. Postsynaptic receptor trafficking underlying a form of associative learning. **Science (New York, N.Y.)**, v. 308, n. 5718, p. 83–88, 1 abr. 2005.
- SHEPHERD, J. D. Memory, plasticity and sleep-A role for calcium permeable AMPA receptors?. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 5, 2012.

SOMMER, B. et al. RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. **Cell**, v. 67, n. 1, p. 11–19, 4 out. 1991.

VERDOORN, T. et al. Structural determinants of ion flow through recombinant glutamate receptor channels. **Science**, v. 252, n. 5013, p. 1715–1718, 21 jun. 1991.

VORHEES, C. V.; WILLIAMS, M. T. Value of water mazes for assessing spatial and egocentric learning and memory in rodent basic research and regulatory studies. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 45, p. 75–90, set. 2014.

ZHU, J. J. et al. Postnatal synaptic potentiation: delivery of GluR4-containing AMPA receptors by spontaneous activity. **Nature Neuroscience**, v. 3, n. 11, p. 1098–1106, nov. 2000.

WRIGHT, A.; VISSEL, B. The essential role of AMPA receptor GluR2 subunit RNA editing in the normal and diseased brain. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 5, 2012.

