

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

HENRIQUE SCHAAAN FERNANDES

**O PAPEL DOS RECEPTORES DE IP₃ NA CONSOLIDAÇÃO, EVOCAÇÃO,
RECONSOLIDAÇÃO E EXTINÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA CONTEXTUAL**

PORTO ALEGRE

2021

HENRIQUE SCHAAAN FERNANDES

**O PAPEL DOS RECEPTORES DE IP₃ NA CONSOLIDAÇÃO, EVOCAÇÃO,
RECONSOLIDAÇÃO E EXTINÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA CONTEXTUAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências do 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: Lucas de Oliveira Alvares

PORTO ALEGRE

2021

AGRADECIMENTOS

Ao professor Lucas, pela orientação solícita e confiança.

Aos colegas de laboratório, por toda a ajuda e amizade; especialmente ao Bruno, por todos os ensinamentos e bons conselhos.

À Tina, pelo grande cuidado com os animais e pela companhia.

À minha família, que sempre me apoiou.

RESUMO

Os canais intracelulares de cálcio (Ca^{2+}) desempenham um papel dinâmico na homeostase neuronal de Ca^{2+} , funcionando tanto no tamponamento do excesso de Ca^{2+} no citoplasma quanto como uma fonte adicional de Ca^{2+} quando o aumento na concentração é necessário. Entretanto, apesar do grande número de evidências implicando o Ca^{2+} como um segundo-mensageiro essencial em muitas cascatas de sinalização subjacentes à plasticidade sináptica, o envolvimento direto dos canais intracelulares de Ca^{2+} (CIC) no processamento da memória tem sido pouco estudado. Neste trabalho, foi investigado o papel do receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3R), um tipo de CIC, em diferentes fases da memória aversiva contextual através de inibição farmacológica no hipocampo dorsal. Primeiro, a administração pós-treino do antagonista de IP_3R 2-aminoetildifenil borato (2-APB) causou prejuízo na consolidação da memória de maneira dependente de dose e tempo. Além disso, o bloqueio de IP_3Rs inibiu também a evocação da memória. A reconsolidação e a extinção da memória, no entanto, não se mostraram vulneráveis à administração de 2-APB. Em conjunto, os presentes resultados indicam que os IP_3Rs hipocampais desempenham um papel importante na consolidação e na evocação da memória aversiva contextual.

ABSTRACT

Intracellular calcium stores play a dynamic role in neuronal calcium (Ca^{2+}) homeostasis both by buffering Ca^{2+} excess in the cytoplasm or providing an additional source of Ca^{2+} when concentration increase is needed. However, in spite of the large body of evidence showing Ca^{2+} as an essential second messenger in many signaling cascades underlying synaptic plasticity, the direct involvement of the intracellular Ca^{2+} -release channels (ICRCs) in memory processing has been highly overlooked. Here the role of the ICRC inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP_3R) activity during different memory phases was investigated through pharmacological inhibition in the dorsal hippocampus during contextual fear conditioning. It was first found that post-training administration of the IP_3R antagonist 2-aminoethyl diphenylborinate (2-APB) impaired memory consolidation in a dose and time-dependent manner. Inhibiting IP_3Rs also disrupted memory retrieval. Contextual fear memory reconsolidation or extinction, however, were not sensitive to IP_3R blockade. Taken together, these results indicate that hippocampal IP_3Rs play an important role in contextual fear memory consolidation and retrieval.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPAR: receptor de α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico

Ca²⁺: íon cálcio

CaMKII: proteína cinase dependente de Ca²⁺/calmodulina II

cAMP: monofosfato cíclico de adenosina

CCDV: canal de Ca²⁺ dependente de voltagem

CIC: canal intracelular de cálcio

CICR: liberação de Ca²⁺ induzida por Ca²⁺

CP-AMPA: receptor de AMPA permeável a Ca²⁺

ERK: cinase regulada por sinal extracelular

IP₃R: receptor de IP₃

LTD: depressão de longa duração

LTM: memória de longa duração

LTP: potenciação de longa duração

MAPK: proteína cinase ativada por mitógeno

mGluR: receptor metabotrópico glutamatérgico

Na²⁺: íon sódio

NMDAR: receptor de N-metil-D-aspartato

PIP₂: fosfatidilinositol-3,4-bifosfato

PKA: proteína cinase A

PKC: proteína cinase C

PLC: fosfolipase C

RE: retículo endoplasmático

RyR: receptor de rianodina

STM: memória de curta duração

SUMÁRIO

RESUMO	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vi
1. INTRODUÇÃO	8
1.1. MEMÓRIA	8
1.2. CÁLCIO NEURONAL	9
1.2.1. FONTES EXTRACELULARES DE CÁLCIO NEURONAL	9
1.2.2. FONTES INTRACELULARES DE CÁLCIO NEURONAL	10
1.3. CÁLCIO E MEMÓRIA	11
1.3.1. CANAIS INTRACELULARES DE CÁLCIO E MEMÓRIA	12
2. OBJETIVOS	14
2.1. OBJETIVO GERAL	14
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3. RESULTADOS	15
3.1. ARTIGO CIENTÍFICO	15
4. DISCUSSÃO	35
5. CONCLUSÃO	38
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

1. INTRODUÇÃO

1.1. MEMÓRIA

A memória é o mecanismo encefálico que permite que informações sejam armazenadas e evocadas quando necessário. Dependendo do tipo de informação a ser retida no encéfalo, diferentes sistemas de memória são recrutados; estes, por sua vez, operam em distintas estruturas encefálicas.

É comum, por exemplo, a divisão das memórias entre declarativas e não-declarativas. Lembranças de fatos ou eventos são evocações conscientes, a que humanos podem se referir; são memórias declarativas, ou explícitas. Dentre as não-declarativas, ou implícitas, estão memórias emocionais, de habilidades motoras, de hábitos e de diferenciação entre cheiros e gostos. Memórias declarativas são principalmente codificadas pelo sistema hipocampal temporal medial, que inclui os córtices perirrinal e entorrinal, o hipocampo e o subículo (Squire & Zola 1996, Squire & Zola-Morgan 1991). Já os diferentes subtipos de memórias não-declarativas envolvem várias e distintas regiões encefálicas, incluindo a amígdala, os núcleos da base e o cerebelo (Squire & Dede 2015, Yin & Knowlton 2006).

Memórias também variam na duração de sua retenção. Elas podem conservar-se por poucos segundos, minutos ou horas, como no caso das memórias de curta duração (STM – do inglês *short term memory*), ou por muitas horas, dias ou mesmo pelo resto da vida, tornando-se memórias de longa duração (LTM – do inglês *long term memory*). Para se tornarem LTMs, novos traços mnemônicos passam por um processo conhecido como consolidação (McGaugh 2000). Memórias são inicialmente frágeis, suscetíveis a alterações, e precisam da síntese de novas proteínas para tornarem-se resistentes e duradouras – consolidarem-se (Kandel et al. 2014).

Isso ocorre, no nível celular, através do fortalecimento das conexões entre os neurônios, as sinapses. Esse tipo de plasticidade sináptica é conhecido como potenciação de longa duração (LTP – do inglês *long term potentiation*); seu inverso, ou seja, o enfraquecimento das sinapses, é denominado depressão de longa duração (LTD – do inglês *long term depression*). LTP e LTD podem, portanto, alterar persistentemente a comunicação entre neurônios de acordo com as informações recebidas pelo organismo; dessa forma, são amplamente consideradas o substrato físico da memória, os mecanismos celulares através dos quais a memória é criada e mantida (LeDoux 2000, Nabavi et al. 2014, Stevens 1998).

A extensa pesquisa na área da memória permitiu que fossem discernidas importantes etapas na sua formação e manutenção. Após a *aquisição*, momento em que a experiência é vivenciada, o traço mnemônico passa pela *consolidação*, descrita anteriormente. A reexposição a um elemento que compõe a memória causa a *evocação*, que pode ser observada em animais através de alterações no comportamento. A evocação de uma memória pode dar início a dois processos distintos, dependendo dos estímulos recebidos: a *reconsolidação*, na qual o traço é instabilizado e reestabilizado, mais forte e/ou atualizado com novas informações (Nader 2015); ou a *extinção*, criação de um novo traço que inibe a expressão do anterior (Abel & Lattal 2001).

1.2. CÁLCIO NEURONAL

O cálcio (Ca^{2+}) é um íon que funciona como segundo mensageiro em inúmeras atividades essenciais de todas as células eucarióticas. Algumas dessas funções são comuns a todas as células, como o controle do metabolismo através dos processos de fosforilação e desfosforilação de enzimas, a manutenção do citoesqueleto, a exocitose e a expressão gênica (Clapham 2007); outras, específicas de determinados tipos celulares. Destas, muitas ocorrem no neurônio: controle da excitabilidade neuronal, desenvolvimento da morfologia neuronal, formação de sinapses, liberação de neurotransmissores e plasticidade sináptica (Brini et al. 2014, Citri & Malenka 2008).

Para que tantas funções ocorram, é necessário um fino ajuste do fluxo de Ca^{2+} através da membrana plasmática e entre organelas. A concentração de Ca^{2+} no citosol deve manter-se muito baixa, de forma que pequenas alterações – com baixo gasto energético – sejam suficientes para ativar as cascatas de sinalização necessárias (Brini et al. 2014). De fato, a concentração de Ca^{2+} fora da célula é muito maior do que dentro; nas escalas de mM e nM, respectivamente. A manutenção de tal equilíbrio e a coordenação dos níveis de Ca^{2+} nos diferentes microdomínios intracelulares requerem uma complexa maquinaria celular. Canais iônicos e bombas – tanto na membrana plasmática quanto nas membranas do retículo endoplasmático (RE), da mitocôndria, do aparelho de Golgi e do núcleo; receptores metabotrópicos; proteínas ligantes ao Ca^{2+} ; todos colaboram para regular os níveis adequados de Ca^{2+} em cada compartimento celular (Brini et al. 2014, Mateos-Aparicio & Rodríguez-Moreno 2020).

1.2.1. FONTES EXTRACELULARES DE CÁLCIO NEURONAL

Na membrana plasmática do neurônio, íons Ca^{2+} podem fluir de fora para dentro da célula através de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem (CCDVs) e dos receptores glutamatérgicos N-metil-D-aspartato (NMDARs). Em situações de plasticidade, também há a expressão de um tipo de receptor α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) permeável a Ca^{2+} (Lalanne et al. 2018).

Os diferentes subtipos de CCDVs estão presentes por toda a extensão da membrana, desde os dendritos até o terminal axonal, passando pelo soma (Vierra et al. 2019, Wild et al. 2019). O Ca^{2+} que através deles entra na célula é essencial para a liberação de neurotransmissores do terminal axonal para a fenda sináptica, a regulação da excitabilidade neuronal e a indução de expressão gênica (Murphy et al. 1991, Simms & Zamponi 2014, Wheeler et al. 1994).

Os NMDARs são receptores glutamatérgicos e canais iônicos que são majoritariamente expressos na membrana pós-sináptica do neurônio. Abrem após ligação de glutamato e glicina e permitem a passagem de cálcio após despolarização da membrana (Liu & Zhang 2000, Vyklicky et al. 2014). Sua principal função é induzir a LTP ou a LTD, sendo este o primeiro influxo pós-sináptico de Ca^{2+} após estímulo pré-sináptico, desencadeando as várias cascatas metabólicas que culminarão no fortalecimento ou enfraquecimento da sinapse (Collingridge et al. 1983, Dunwiddie & Lynch 1978).

Os AMPARs são responsáveis pela rápida despolarização pós-sináptica inicial causada pela entrada de sódio (Na^+), sendo normalmente impermeáveis a Ca^{2+} (Verdoorn et al. 1991). Entretanto, há um subtipo desse receptor que é permeável a Ca^{2+} por não possuir a subunidade GluA2 ou tê-la alterada (Sommer et al. 1991). Os CP-AMPA (do inglês *calcium permeable*) são transitoriamente expressos e recrutados à densidade pós-sináptica durante eventos de plasticidade sináptica como a LTP, aumentando o fluxo de Ca^{2+} que ocorre via NMDARs (Park et al. 2018).

1.2.2. FONTES INTRACELULARES DE CÁLCIO NEURONAL

Grande parte do Ca^{2+} proveniente do meio extracelular é estocado em organelas, como o aparelho de Golgi, a mitocôndria e, principalmente, o RE. O RE, além de sequestrar o Ca^{2+} excessivo através de bombas Ca^{2+} -ATPase para manter os níveis de equilíbrio, faz também a função inversa, servindo como fonte. Os receptores de inositol-1,4,5-tri-fosfato (IP_3Rs) e de

rianodina (RyRs) são canais (canais intracelulares de cálcio; CICs) expressos na membrana do RE e têm como função a liberação regenerativa de Ca^{2+} , através do que é chamado de liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} (CICR, do inglês *calcium induced calcium release*); ou seja, quando o Ca^{2+} proveniente do meio extracelular se liga aos CICs, eles se abrem, permitindo a saída do Ca^{2+} estocado no RE (Berridge 1998). A abertura dos IP_3Rs requer também a ligação de IP_3 , um fosfolípido de membrana liberado pela hidrólise de fosfatidilinositol-3,4-bifosfato (PIP_2) após ativação da fosfolipase C (PLC), que por sua vez é ativada principalmente por receptores metabotrópicos como o mGluR (Berridge 1998, Foskett et al. 2007).

O RE se estende por todo o interior do neurônio, incluindo espinhos dendríticos e terminal axonal, e sua área de superfície é muito maior que a da membrana plasmática (Toescu et al. 2004). No soma e nos dendritos se estrutura como folhetos empilhados e interconectados, enquanto no axônio toma uma forma tubular (Bell et al. 2019, Terasaki 2018, Terasaki et al. 2013). Essa heterogeneidade estrutural reflete distintas funções do RE nos diferentes compartimentos neuronais (Karagas & Venkatachalam 2019).

O segmento do RE que se estende para dentro do espinho dendrítico forma uma estrutura especializada chamada aparelho espinhal (Gray 1959). O aparelho espinhal participa na regulação da morfogênese espinhal, da dinâmica do Ca^{2+} e, conseqüentemente, da plasticidade sináptica (Bell et al. 2019, Deller et al. 2003, Jedlicka et al. 2008). Sua estrutura de folhetos empilhados também permite uma alta densidade de ribossomos na membrana do RE no soma e nos dendritos, o que é necessário para a tradução proteica, requisito da LTP2 ou LTP intermediária (Bliss et al. 2018, Raymond 2007, Terasaki et al. 2013).

1.3. CÁLCIO E MEMÓRIA

A plasticidade sináptica é fundamental para a formação de memórias, e todos os tipos de plasticidade sináptica, de uma forma ou de outra, dependem de processos mediados por Ca^{2+} . Na bem conhecida LTP pós-sináptica dependente de NMDAR, o influxo de Ca^{2+} através dos NMDARs é responsável por ativar enzimas como a proteína cinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina II (CaMKII) e as proteínas cinases A (PKA) e C (PKC) (Colgan et al. 2018, Lledo et al. 1995, Makhinson et al. 1999). A atividade dessas proteínas cinases está diretamente envolvida na indução e manutenção dessa forma de LTP, ao aumentar o número de AMPARs na membrana pós-sináptica e a condutância desses canais (Benke et al. 1998, Brecht & Nicoll 2003, Collingridge et al. 2004). A sinalização de Ca^{2+} também é necessária para a ocorrência

de formas menos estudadas da LTP, como a LTP pós-sináptica independente de NMDAR e a LTP pré-sináptica, e de diferentes tipos de LTD (Mateos-Aparicio & Rodríguez-Moreno 2020).

A importância do Ca^{2+} proveniente do meio extracelular para os processos de memória é corroborada por estudos nos quais os efeitos da modulação da atividade dos canais de Ca^{2+} de membrana são observados em tarefas comportamentais. Vários deles demonstram que o bloqueio de NMDARs, CCDVs ou CP-AMPARs prejudica a consolidação e outras fases de diferentes tipos de memória (Castellano et al. 2001, Da Silva et al. 2013, Torquatto et al. 2019, Woodside et al. 2004).

1.3.1. CANAIS INTRACELULARES DE CÁLCIO E MEMÓRIA

O papel do Ca^{2+} liberado pelos CICs, entretanto, na codificação da memória não é tão bem conhecido. A literatura existente sugere, através de eletrofisiologia *in vitro*, importante envolvimento, mas há poucos trabalhos comportamentais para corroborar hipóteses.

Já foi demonstrado que a atividade de RyRs e IP_3Rs influencia na LTP, LTD, liberação de neurotransmissores, excitabilidade dendrítica e transcrição gênica (revisado em Baker et al. 2013). Cada um desses tipos de receptores intracelulares, contudo, parece contribuir diferentemente para esses processos, e seus locais de expressão variam de forma correspondente. RyRs são encontrados primariamente nos espinhos dendríticos; IP_3Rs , nos dendritos, especialmente sob sítios sinápticos (Sharp et al. 1993). Esta distribuição espacial dos CICs está de acordo com estudos que indicam a necessidade de RyRs para a ocorrência da LTP1 (ou fase precoce da LTP) e de IP_3Rs para a LTP2 (ou LTP intermediária) (Raymond & Redman 2002); segundo o modelo proposto pelos autores, o Ca^{2+} amplificado pelos RyRs no espinho após estímulo fraco permite uma curta potenciação, enquanto a ativação dos IP_3Rs por estímulos de intensidade intermediária causa potenciação mais duradoura através do recrutamento da maquinaria de síntese proteica presente no dendrito (Raymond 2007, Raymond & Redman 2006).

São escassas, entretanto, as evidências comportamentais. Em galinhas, em uma tarefa de esquivas discriminatória, a infusão pós-treino de antagonistas de ambos RyRs e IP_3Rs no mesopálio medial intermediário (uma região crítica para o processamento da memória em galinhas; Gibbs 2008) impede a retenção da memória (Baker et al. 2008, Edwards & Rickard 2006). Em camundongos, a inibição hipocampal de RyRs imediatamente após o treino de

esquiva inibitória também prejudica a consolidação (Galeotti et al. 2008). Ainda não foi investigado, portanto, o efeito da modulação de IP₃Rs nas diferentes fases da memória em mamíferos. Este é o objetivo deste trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar se a inibição farmacológica dos receptores IP₃ prejudica os diferentes processos de memória em ratos *Wistar* submetidos à tarefa de condicionamento aversivo contextual (CAC).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar os efeitos da administração (em diferentes momentos da janela de consolidação) hipocampal do antagonista de IP₃Rs 2-APB na consolidação da memória aversiva contextual em ratos *Wistar*.

2. Analisar o efeito da administração hipocampal do antagonista de IP₃Rs 2-APB na evocação da memória aversiva contextual em ratos *Wistar*.

3. Analisar o efeito da administração hipocampal do antagonista de IP₃Rs 2-APB na reconsolidação da memória aversiva contextual em ratos *Wistar*.

4. Analisar o efeito da administração hipocampal do antagonista de IP₃Rs 2-APB na extinção da memória aversiva contextual em ratos *Wistar*.

3. RESULTADOS

3.1. ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados obtidos durante este trabalho estão descritos no seguinte artigo científico, que foi redigido de acordo com as normas da *Neurobiology of Learning and Memory* e será submetido à mesma.

Effects of hippocampal IP3R inhibition on contextual fear memory consolidation, retrieval, reconsolidation and extinction

Henrique Schaan Fernandes, Bruno Popik, Lucas de Oliveira Alvares*

Laboratório de Neurobiologia da Memória, Biophysics Department, Biosciences Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, 91,501-970 Porto Alegre, Brazil

Graduate Program in Neuroscience, Institute of Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, 90,046-900 Porto Alegre, Brazil

* Corresponding author at: Laboratório de Neurobiologia da Memória, Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9500, prédio 43422, sala 216, CEP 91,501-970 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. E-mail address: lucas.alvares@ufrgs.br (L. de Oliveira Alvares).

Abstract

Intracellular calcium stores (ICS) play a dynamic role in neuronal calcium (Ca^{2+}) homeostasis both by buffering Ca^{2+} excess in the cytoplasm or providing an additional source of Ca^{2+} when concentration increase is needed. However, in spite of the large body of evidence showing Ca^{2+} as an essential second messenger in many signaling cascades underlying synaptic plasticity, the direct involvement of the intracellular Ca^{2+} -release channels (ICRCs) in memory processing has been highly overlooked. Here we investigated the role of the ICRC inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R) activity during different memory phases using pharmacological inhibition in the dorsal hippocampus during contextual fear conditioning. We first found that post-training administration of the IP3R antagonist 2-aminoethyl diphenylborinate (2-APB) impaired memory consolidation in a dose and time-dependent manner. Inhibiting IP3Rs also disrupted memory retrieval. Contextual fear memory reconsolidation or extinction, however, were not sensitive to IP3R blockade. Taken together, our results indicate that hippocampal IP3Rs play an important role in contextual fear memory consolidation and retrieval.

Keywords

Calcium

Fear conditioning

Rats

2-APB

1. Introduction

Many of the signaling cascades that orchestrate learning and memory depend on calcium (Ca^{2+}) as a second messenger. For instance, the persistent strengthening and weakening of synapses known as long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD), respectively, which are considered the major cellular mechanisms that underlie learning and memory, both need an increase in Ca^{2+} concentration to occur (R C Malenka, Lancaster, & Zucker, 1992; Robert C Malenka & Bear, 2004). Blockade of plasma membrane Ca^{2+} channels such as N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) or voltage-gated Ca^{2+} channels (VGCCs) impair different memory phases such as consolidation, retrieval, reconsolidation and extinction (Bauer, Schafe, & LeDoux, 2002; Iwamura, Yamada, & Ichitani, 2016; Shimizu, Tang, Rampon, & Tsien, 2000; Suzuki et al., 2004). Still, these extracellular Ca^{2+} sources are not the only ones that contribute to the increase of intracellular Ca^{2+} concentration.

The endoplasmic reticulum (ER), which extends from the soma to dendrites and dendritic spines, stores Ca^{2+} so that its basal concentration in the cytosol is maintained at a low level (Brini, Calì, Ottolini, & Carafoli, 2014; Meldolesi, 2001; Spacek & Harris, 1997). Neurons can thus increase or spatially amplify the Ca^{2+} signals that enter through plasma membrane Ca^{2+} channels by inducing the opening of the intracellular Ca^{2+} -release channels (ICRCs) located at the ER membrane: inositol 1,4,5-trisphosphate receptors (IP_3Rs) and ryanodine receptors (RyRs) (Berridge, 1998). Both channels open in response to Ca^{2+} , while IP_3R opening also requires binding of IP_3 , a membrane phospholipid released from the hydrolysis of phosphatidylinositol biphosphate (PIP₂) after activation of phospholipase C (PLC), which in turn is activated mainly by metabotropic receptors such as mGluR (Berridge, 1998; Foskett, White, Cheung, & Mak, 2007).

Despite substantial evidence showing ICRCs roles in neuronal Ca^{2+} signaling, their specific contribution to memory processes is not clear, especially at the behavioral level. It has been shown that they are involved in LTP, LTD, neurotransmitter release, dendritic excitability and gene transcription (reviewed in Kathryn D Baker, Edwards, & Rickard, 2013). Of special interest is the involvement of IP_3Rs , in particular, in later phases of LTP and protein synthesis. Raymond et al. (2000) observed that the blockade of RyRs inhibits LTP1 (or early-LTP), while blocking IP_3Rs inhibits LTP2 (or intermediate-LTP) in rat hippocampal slices. LTP2 is dependent on local protein synthesis from pre-existing mRNA (C R Raymond, Thompson, Tate, & Abraham, 2000). Accordingly, IP_3Rs are preferentially located in the dendritic shaft (Sharp et al., 1993), mostly directly beneath synaptic sites, where there is also protein synthesis

machinery (Steward & Schuman, 2001). Many examples of dendritic protein synthesis regulated by Ca^{2+} have been shown (Kelleher, Govindarajan, & Tonegawa, 2004). It is reasonable to assume, therefore, that blockade of IP_3Rs could have an impact on memory encoding.

Yet, studies investigating the roles of IP_3Rs in memory processes in behaving animals are scarce. In the day-old chick, post-training IP_3R or mGluR1 inhibition in the intermediate medial mesopallium (a critical region for memory processing in chicks) in a discrimination avoidance task persistently impairs memory retention from 90 min post-training, a time point considered to be in the protein synthesis-dependent LTM stage (K D Baker, Edwards, & Rickard, 2008; Gibbs & Ng, 1979). In rodents, however, no such work, to our knowledge, has been done. We hypothesized that IP_3Rs could play an important role in distinct memory phases and therefore sought to elucidate, using contextual fear conditioning in rats, the effect of IP_3R blockade on memory consolidation, retrieval, reconsolidation and extinction.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male adult Wistar rats (aged 2–3 months, weighing 300–400 g) from the Center for Reproduction and Experimentation of Laboratory Animals (CREAL) at the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS) were used for all experiments. They were housed in plastic cages, four animals per cage, under controlled temperature (21 ± 2 °C) and a 12/12h light/dark cycle with regular chow and water available ad libitum. All procedures followed the Brazilian ethical guidelines for animal research set by the National Council of the Control of Experimental Animal Research (CONCEA).

2.2. Stereotaxic surgery and cannulae implantation

Rats were anesthetized by intraperitoneal injection with ketamine (75 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and secured in a Kopf stereotaxic apparatus. Bilateral guide cannulae were targeted for placement directly above the CA1 region of the dorsal hippocampus (AP -4.0 mm (from bregma), LL \pm 3.0 mm, DV -1.6 mm). We used meloxicam (analgesic and nonsteroidal

anti-inflammatory; 1 mg/kg; via subcutaneous) 20 min before surgery, as well as once a day in the following two days. Animals were allowed 5–7 days to recover before experimentation. Following the appropriate behavioral task, animals were euthanized, and their brains were collected to ensure accurate cannula placement. Animals with inaccurate cannula position were excluded from statistical analysis.

2.3. Drugs and microinfusion

2-APB (2-aminoethyl diphenylborinate, Sigma-Aldrich), a IP₃ receptor antagonist (50 or 500 μM, dissolved in 10% DMSO) or its vehicle (DMSO 10%) were infused bilaterally into the CA1 region of the dorsal hippocampus. At the time of infusion, a 27-gauge needle was fitted into the 22-gauge guide cannula, with its tip protruding 1.0 mm beyond the guide cannula. All the infusions were delivered at a rate of 0.5 μL/side (2-APB or DMSO 10%) over 60 s and 30 additional seconds were waited before removing the infusion needle. A total volume of 1 μL of 2-APB or vehicle was injected into the hippocampus.

2.4. Contextual fear conditioning

The conditioning chamber (context) consisted of an illuminated Plexiglas box (33 x 22 x 22 cm), with grid floor of parallel 0.1 cm caliber stainless steel bars spaced 1 cm apart and walls that were vertically striped in black and white. Rats were initially placed in the conditioning chamber for 5 min for habituation. One day later, in the conditioning session (training), rats were placed in the conditioning chamber for 3 min before receiving two 2 s, 0.3 mA foot-shocks separated by a 30 s interval; they were kept in the conditioning chamber for an additional 30 s before returning to their home cage. Rats were then reexposed to the context in different sessions, depending on the experiment performed.

Test session: Two days after training or one day after the extinction session, rats were reexposed to the context, without foot-shocks, for 4 min to assess memory retention.

Retest session: One day after the test session, rats were reexposed to the context, without foot-shocks, for 4 min to reassess memory retention.

Extinction session: Two days after training, rats were reexposed to the context, without foot-shocks, for 30 min to induce memory extinction.

2.5. 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 cessation of all movements except those required for respiration (Blanchard & Blanchard, 1969).

2.6. Statistical analysis

Data are expressed as mean + SEM. Statistical analyses were performed using one or two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's or Bonferroni's post hoc tests, when necessary. All data used confidence level of 95% and values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

3.1. *IP₃R blockade impairs contextual fear memory consolidation*

We first examined whether IP₃R blockade would impair contextual fear memory consolidation in rats. The IP₃R antagonist 2-APB (50 or 500 μ M) or its vehicle were bilaterally infused into the hippocampus of rats immediately after training. Freezing behavior was assessed 48 h after training (Fig. 1A).

One-way ANOVA revealed a significant effect of treatment (Fig. 1B; one-way ANOVA: $F(2,23) = 4.701$, $P = 0.0194$). Tukey's post hoc analysis showed that the group treated with 500 μ M expressed lower freezing levels compared to the vehicle group ($P = 0.015$), while the 50 μ M group did not ($P = 0.2571$). Thus, we used the 500 μ M dose in the following experiments. These results show that hippocampal IP₃R inhibition with 2-APB immediately after training disrupts contextual fear memory consolidation.

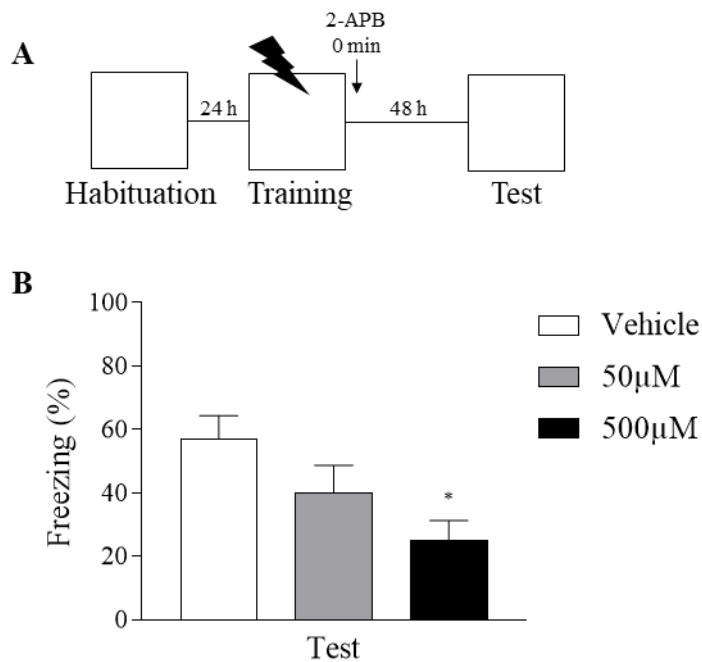


Figure 1. IP3R blockade impairs contextual fear memory consolidation. (A) Experimental design: animals were injected with either vehicle (DMSO 10%) or 2-APB (50 or 500 μ M) into the hippocampus immediately after the training session and tested 2 days later. (B) During the test session, animals infused with 2-APB at 500 μ M, but not at 50 μ M, expressed lower freezing levels when compared to the vehicle group (vehicle, $n = 10$; 2-APB 50 μ M, $n = 8$; 2-APB 500 μ M, $n = 8$). Data are shown in mean \pm SEM. * represents $P < 0.05$.

3.2. Consolidation impairment by 2-APB is time-dependent

Memory consolidation is not a single event phenomenon. It occurs through several hours and molecular processes, which may take place in distinct critical periods of kinase activation and protein synthesis (Bernabeu et al., 1997; Bourtchouladze et al., 1998; Schafe et al., 2000). Therefore, we aimed to investigate whether IP₃R inhibition would still impair consolidation if conducted 90 min after training (Fig. 2A). We also examined the effect of 2-APB infusion 6 h after training (Fig. 2A), a time point at which the memory trace is believed to have become impervious to interferences (McGaugh, 2000). Two-way ANOVA revealed a significant effect of time \times treatment interaction ($F(1,25) = 14.77$, $P = 0.0007$). Bonferroni's post hoc analysis showed that 2-APB administration 90 min after training reduced freezing levels compared to the vehicle group (Fig. 2B; $P = 0.002$). Infusion 6 h after training, however, caused no difference

between groups (Fig. 2B; $P = 0.2434$). These findings suggest that calcium release through IP_3Rs is necessary at different time points during, but not after, the consolidation time window.

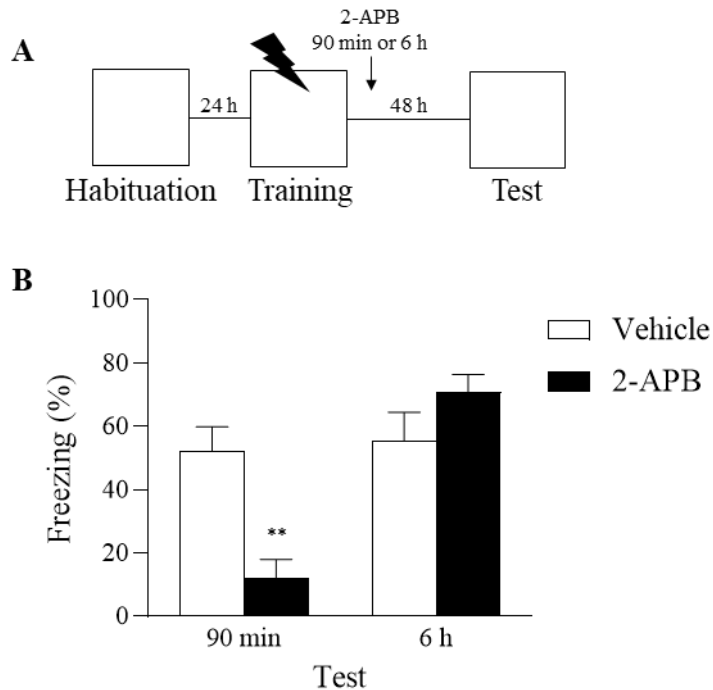


Figure 2. Consolidation impairment by 2-APB is time-dependent. (A) Experimental design: animals were injected with either vehicle (DMSO 10%) or 2-APB (500 μ M) into the hippocampus 90 min or 6 h after the training session and tested 2 days later. (B) During the test session, animals infused with 2-APB 90 min after the training session ($n = 6$) expressed lower freezing levels when compared to the vehicle group ($n = 7$). There was no difference, however, in freezing behavior between groups infused 6 h after the training session (vehicle, $n = 7$; 2-APB, $n = 9$). Data are shown in mean \pm SEM. ** represents $P < 0.01$.

3.3. IP_3R blockade impairs contextual fear memory retrieval

We next addressed whether IP_3R blockade affects memory retrieval. Rats received intra-hippocampal infusion of 2-APB or vehicle 20 min before the test session (Fig. 3A). Furthermore, a retest session was conducted 24 h after the test session to see if any effect caused by 2-APB administration would be specific to retrieval under the effect of the drug (Fig. 3A). Two-way repeated measures (RM) ANOVA revealed a significant effect of time \times treatment interaction ($F(1,14) = 4.915$, $P = 0.0437$). Bonferroni's post hoc analysis showed that 2-APB

administration 20 min before the test reduced freezing levels compared to the vehicle group (Fig. 3B; $P = 0.0334$). No difference was found between groups in the retest 24 h later (Fig. 3B; $P = 0.7941$). These findings indicate that IP_3 Rs play an important role in memory retrieval.

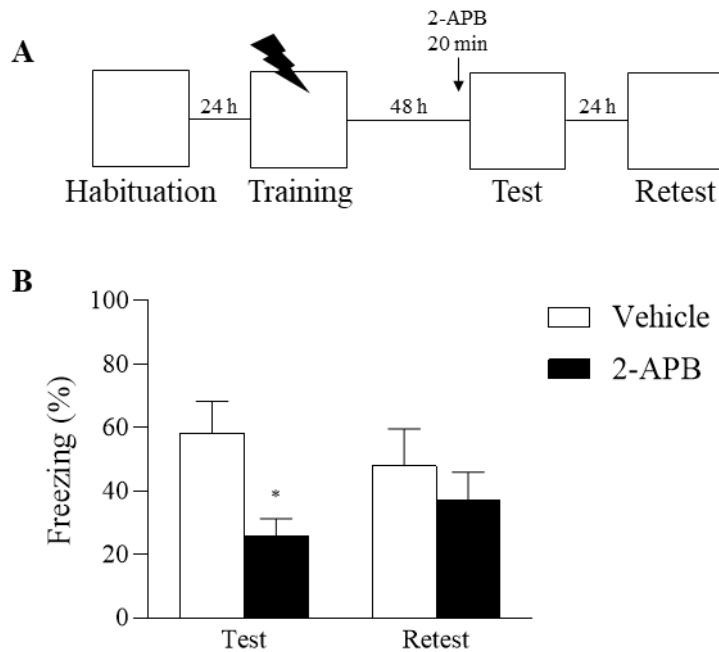


Figure 3. IP_3 R blockade impairs contextual fear memory retrieval. (A) Experimental design: animals were injected with either vehicle (DMSO 10%) or 2-APB (500 μ M) into the hippocampus 20 min before the retrieval session and tested 24 h later. (B) During the retrieval session, animals infused with 2-APB expressed lower freezing levels when compared to the vehicle group. There was no difference, however, in freezing behavior between groups in the test session 24 h later (vehicle, $n = 7$; 2-APB, $n = 9$). Data are shown in mean \pm SEM. * represents $P < 0.05$.

3.4. 2-APB has no effect on reconsolidation or extinction

Lastly, we examined whether IP_3 R blockade would affect two memory processes capable of altering the expression of already consolidated memories: reconsolidation and extinction. Previous experiments from our lab demonstrated that a reexposure session with a duration similar to the one used here was able to turn memory susceptible to modifications via reconsolidation (Lunardi et al., 2018; Popik, Crestani, Silva, Quillfeldt, & de Oliveira Alvares, 2018; Redondo et al., 2020). Animals were infused with 2-APB or vehicle into the hippocampus

immediately after the test session and retested 24 h later (Fig. 4A). Two-way RM ANOVA revealed no significant effect of time \times treatment interaction (Fig. 4B; $F(1,11) = 1.322$, $P = 0.2746$).

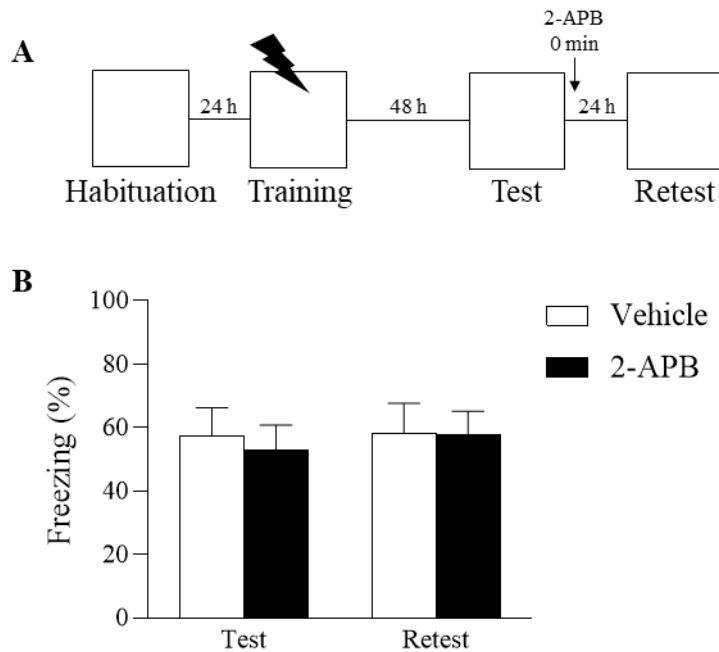


Figure 4. 2-APB has no effect on reconsolidation. (A) Experimental design: animals were injected with either vehicle (DMSO 10%) or 2-APB (500 μ M) into the hippocampus immediately after the retrieval session and tested 24 h later. (B) There was no difference in freezing behavior between groups in the retrieval or test sessions (vehicle, $n = 7$; 2-APB, $n = 6$). Data are shown in mean \pm SEM.

In the process of fear memory extinction, a new memory is formed and competes with the original fear memory for expression (Quirk & Mueller, 2008). We thus evaluated the involvement of IP_3 R in the consolidation of extinction memory. 2-APB or vehicle were infused into the hippocampus immediately after the extinction session, and the persistence of extinction memory was assessed in the test 24 h later (Fig. 5A). Between the first and last 5 min of the extinction session, two-way RM ANOVA revealed a significant effect of time ($F(1,15) = 192.3$, $P < 0.0001$). Bonferroni's post hoc analysis showed that both groups had their freezing expression decreased during the extinction session (Fig. 5B; $P < 0.0001$). Between the first 5 min of the extinction session and test, two-way RM ANOVA revealed a significant effect of

time ($F(1,15) = 179.8$, $P < 0.0001$), but not treatment ($F(1,15) = 0.4946$, $P = 0.4927$) nor a time \times treatment interaction ($F(1,15) = 1.955$, $P = 0.1824$). Bonferroni's post hoc analysis showed that both groups had their freezing expression reduced between the first 5 min of the extinction session and test ($P < 0.0001$). More importantly, there was no difference between groups in the test (Fig. 5B; $P > 0.9999$). These results suggest that 2-APB has no effect on memory reconsolidation or extinction.

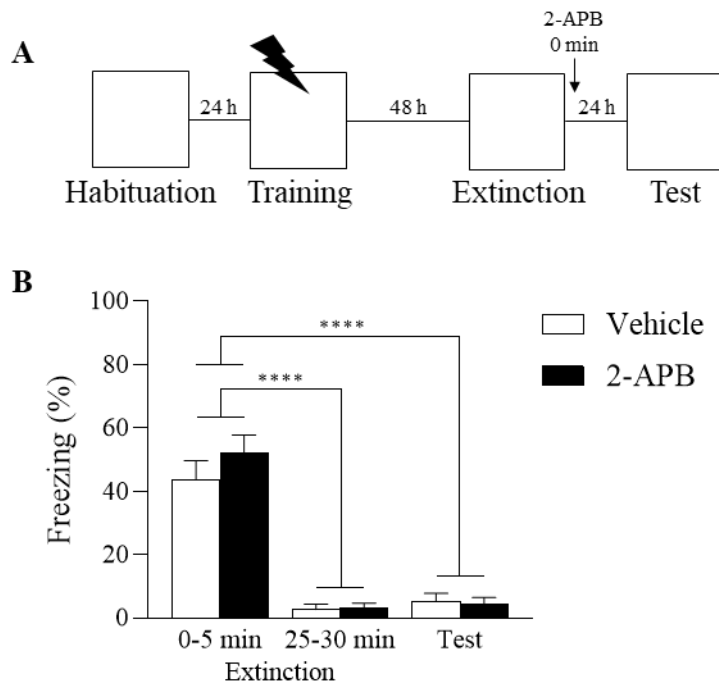


Figure 5. 2-APB has no effect on extinction. (A) Experimental design: animals were injected with either vehicle (DMSO 10%) or 2-APB (500 μ M) into the hippocampus immediately after the extinction session and tested 24 h later. (B) Both groups expressed lower freezing levels during the last 5 min of the extinction session and during the test session when compared to the first 5 min of the extinction session. Furthermore, there was no difference in freezing behavior between groups in the test session (vehicle, $n = 8$; 2-APB, $n = 9$). Data are shown in mean \pm SEM. **** represents $P < 0.0001$.

4. Discussion

We investigated the involvement of IP_3R in distinct memory processes by using the membrane permeable IP_3R antagonist 2-APB. Our findings demonstrate an important role for

IP₃ receptors in contextual fear memory consolidation and retrieval in rats. Reconsolidation and extinction, in contrast, appear to be immune to disruption through IP₃R blockade in the hippocampus. To our knowledge, this is the first study that evaluates the effect of hippocampal IP₃R inhibition on memory processes.

There is substantial evidence for a postsynaptic role for IP₃Rs in LTP in the hippocampus (Kapur, Yeckel, & Johnston, 2001; Kwon & Castillo, 2008; Sokolov et al., 2003). Following presynaptic glutamate release, the concurrent activation of group I mGluRs and NMDARs results in IP₃ and Ca²⁺ signals, respectively, which are necessary to activate IP₃Rs in the dendritic shaft (Berridge, Lipp, & Bootman, 2000; Foskett et al., 2007; Raymond & Redman, 2002). The resulting Ca²⁺-induced Ca²⁺ release (CICR) through IP₃Rs has been suggested as a required step in the mGluR-dependent local protein synthesis cascade underlying late LTP phases (Raymond et al., 2000; Raymond & Redman, 2002; Raymond, 2007). Indeed, blockade of IP₃Rs with specific antagonist Xestospongin C in CA1 pyramidal neurons in vitro inhibits LTP2, an intermediate phase of LTP that is dependent of local protein synthesis but does not require gene transcription (Raymond & Redman, 2002, 2006; Raymond, 2007). Moreover, post-training inhibition of IP₃Rs or mGluR1s in the intermediate medial mesopallium of day-old chicks resulted in persistent retention loss assessed 24 h after training in a discrimination avoidance task (Baker et al., 2008). Our finding that 2-APB was able to impair memory consolidation in rats is consistent with this evidence. We suggest that IP₃R inhibition may disrupt later phases of synaptic potentiation through local (dendritic) protein synthesis impairment.

The fact that 2-APB was still able to disrupt consolidation when infused 90 min after training further reinforces this hypothesis of a late-LTP role for IP₃Rs. A significant body of evidence supports the existence of distinct critical time points in the consolidation window that require protein synthesis and activity of key protein kinases. Bourtchouladze et al. (1998) found that the inhibition of protein synthesis or protein kinase A (PKA) in the mouse hippocampus impaired contextual fear memory consolidation when conducted immediately or 4 h, but not 1 h or 6 h after training. In rats, inhibitory avoidance learning required increased PKA levels and activity at 0, 3 or 6 h in the hippocampus; in the amygdala, extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase (ERK/MAPK) levels were increased at 60 min, but not 15, 30 or 180 min after auditory fear conditioning (Bernabeu et al., 1997; Schafe et al., 2000). It is well known that both ERK/MAPK and cyclic adenosine monophosphate (cAMP)/PKA pathways are essential regulators of memory formation (Impey, Obrietan, & Storm, 1999).

Furthermore, the persistent retention impairment found by Baker et al. (2008) after IP₃R inhibition in the day-old chick was observed from 90 min post-training. Therefore, we find it reasonable to assume that CICR through IP₃Rs may have an important role in the protein synthesis and kinase activation of late phases of memory consolidation.

Memory retrieval is also an active process. It requires ongoing protein synthesis and α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor (AMPA) trafficking (Lopez, Gamache, Schneider, & Nader, 2015). Moreover, pretest inhibition of PKA or the upstream activator of MAPK impairs retrieval of the hippocampus-dependent inhibitory avoidance memory (Szapiro et al., 2000). Importantly, the same effect on retrieval was found by blocking mGluR, the primary activator of IP₃R and a major trigger for dendritic protein synthesis (Sutton & Schuman, 2005; Szapiro et al., 2000). IP₃R-mediated Ca²⁺ release may also be involved in activating protein kinase C (PKC), an enzyme shown to be important not only for late-LTP, downstream of mGluR activation, but also for inhibitory avoidance memory retrieval (Reymann & Frey, 2007; Vianna et al., 2000). Our results corroborate these findings, suggesting that memory retrieval is an active and protein synthesis-dependent process and relies on the mGluR-dependent IP₃R activity.

Infusion of 2-APB immediately after retrieval did not impair memory expression assessed 24 h later. Considering that similar protocols rendered memory susceptible to modifications through reconsolidation in previous experiments in our lab (Lunardi et al., 2018; Popik et al., 2018; Redondo et al., 2020), we hypothesize that either (1) the increase in intracellular calcium levels through IP₃R is not necessary for contextual fear memory reconsolidation or (2) IP₃R inhibition blocked the memory trace destabilization that normally occurs after retrieval (J. L. C. Lee, 2008; Rudy, 2008). Since trace destabilization has been shown to depend on the increase in calcium levels through NMDAR or VGCCs to activate the ubiquitin proteasome system and the degradation of key scaffolding proteins (Ben Mamou, Gamache, & Nader, 2006; Jarome, Werner, Kwapis, & Helmstetter, 2011; Kaang & Choi, 2012; Suzuki, Mukawa, Tsukagoshi, Frankland, & Kida, 2008), we favor the second hypothesis. Accordingly, proteasome activity inhibition in both the hippocampus or the amygdala prevented the loss of contextual fear memory caused by the protein synthesis inhibitor anisomycin after retrieval (Jarome et al., 2011; S.-H. Lee et al., 2008). Further experiments such as coinfecting 2-APB and anisomycin immediately after retrieval would be needed to support this proposition.

The brain regions which have been most implicated in fear memory extinction are the medial prefrontal cortex (mPFC), amygdala and hippocampus (Myers & Davis, 2007). However, as extinction is considered new learning, it occurs in different phases, such as acquisition, consolidation and retrieval, and the specific role of each brain structure in the different phases of extinction learning is still unclear (Baldi & Bucherelli, 2015; Quirk & Mueller, 2008). Since the hippocampus is believed to be the storage of contextual information, it is possible it does not have the same pivotal role in extinction memory consolidation as it does in its acquisition or retrieval. According to this hypothesis, since contextual information is already stored during fear memory consolidation, its unimpeded prolonged retrieval would be sufficient to induce the consolidation of the new extinction memory in the other brain structures. Supporting this view, a previous study reported that protein synthesis inhibitor anisomycin impaired contextual fear extinction if infused immediately after the extinction session in the amygdala or the mPFC, but not in the dorsal hippocampus (Mamiya et al., 2009). In addition, dorsal hippocampus infusion of the GABAergic agonist muscimol at the same time point did not block extinction memory consolidation, nor attenuated the extinction memory enhancing effects of norepinephrine infused into the amygdala (Berlau & McGaugh, 2006). Other studies, however, have shown otherwise (de Carvalho Myskiw, Furini, Benetti, & Izquierdo, 2014; Fiorenza, Rosa, Izquierdo, & Myskiw, 2012; Szapiro, Vianna, McGaugh, Medina, & Izquierdo, 2003). Therefore, we do not rule out the possibility that IP₃R-mediated calcium signaling in the dorsal hippocampus may play a role in extinction consolidation. Future experiments with different training intensities, duration of context exposure or drug dosage should help elucidating this question.

The results presented here confirm, in rats, what had already been suggested in previous works with chicks and in hippocampal slices *in vitro*. IP₃Rs appear to be importantly involved in LTP and memory, with emphasis on late phases. Therefore, in conclusion, we propose that the increase in intracellular Ca²⁺ levels through IP₃Rs helps promoting memory processes such as consolidation and retrieval by triggering protein synthesis and key enzymes activation. Further experiments will be required to confirm these hypotheses.

Acknowledgements

This work was supported by fellowships and a grant from the Brazilian government agency CNPq (Universal 2018 – 405100/2018-3), who had no role in design, analysis or reporting of the study.

References

- Baker, K D, Edwards, T. M., & Rickard, N. S. (2008). Inhibition of mGluR1 and IP₃Rs impairs long-term memory formation in young chicks. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90(1), 269–274. doi:10.1016/j.nlm.2008.04.004
- Baker, Kathryn D, Edwards, T. M., & Rickard, N. S. (2013). The role of intracellular calcium stores in synaptic plasticity and memory consolidation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 37(7), 1211–1239. doi:10.1016/j.neubiorev.2013.04.011
- Baldi, E., & Bucherelli, C. (2015). Brain sites involved in fear memory reconsolidation and extinction of rodents. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 53, 160–190. doi:10.1016/j.neubiorev.2015.04.003
- Bauer, E. P., Schafe, G. E., & LeDoux, J. E. (2002). NMDA receptors and L-type voltage-gated calcium channels contribute to long-term potentiation and different components of fear memory formation in the lateral amygdala. *The Journal of Neuroscience*, 22(12), 5239–5249.
- Ben Mamou, C., Gamache, K., & Nader, K. (2006). NMDA receptors are critical for unleashing consolidated auditory fear memories. *Nature Neuroscience*, 9(10), 1237–1239. doi:10.1038/nn1778
- Berlau, D. J., & McGaugh, J. L. (2006). Enhancement of extinction memory consolidation: the role of the noradrenergic and GABAergic systems within the basolateral amygdala. *Neurobiology of Learning and Memory*, 86(2), 123–132. doi:10.1016/j.nlm.2005.12.008
- Bernabeu, R., Bevilacqua, L., Ardenghi, P., Bromberg, E., Schmitz, P., Bianchin, M., ... Medina, J. H. (1997). Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(13), 7041–7046. doi:10.1073/pnas.94.13.7041
- Berridge, M. J. (1998). Neuronal calcium signaling. *Neuron*, 21(1), 13–26. doi:10.1016/s0896-6273(00)80510-3
- Berridge, M. J., Lipp, P., & Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 1(1), 11–21. doi:10.1038/35036035
- 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. doi:10.1037/h0027676
- Bourtchouladze, R., Abel, T., Berman, N., Gordon, R., Lapidus, K., & Kandel, E. R. (1998). Different training procedures recruit either one or two critical periods for contextual memory consolidation, each of which requires protein synthesis and PKA. *Learning & Memory*, 5(4-5), 365–374.

- Brini, M., Calì, T., Ottolini, D., & Carafoli, E. (2014). Neuronal calcium signaling: function and dysfunction. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(15), 2787–2814. doi:10.1007/s00018-013-1550-7
- de Carvalho Myskiw, J., Furini, C. R. G., Benetti, F., & Izquierdo, I. (2014). Hippocampal molecular mechanisms involved in the enhancement of fear extinction caused by exposure to novelty. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(12), 4572–4577. doi:10.1073/pnas.1400423111
- Fiorenza, N. G., Rosa, J., Izquierdo, I., & Myskiw, J. C. (2012). Modulation of the extinction of two different fear-motivated tasks in three distinct brain areas. *Behavioural Brain Research*, 232(1), 210–216. doi:10.1016/j.bbr.2012.04.015
- Foskett, J. K., White, C., Cheung, K.-H., & Mak, D.-O. D. (2007). Inositol trisphosphate receptor Ca^{2+} release channels. *Physiological Reviews*, 87(2), 593–658. doi:10.1152/physrev.00035.2006
- Gibbs, M. E., & Ng, K. T. (1979). Behavioural stages in memory formation. *Neuroscience Letters*, 13(3), 279–283. doi:10.1016/0304-3940(79)91507-6
- Impey, S., Obrietan, K., & Storm, D. R. (1999). Making new connections: role of ERK/MAP kinase signaling in neuronal plasticity. *Neuron*, 23(1), 11–14. doi:10.1016/s0896-6273(00)80747-3
- Iwamura, E., Yamada, K., & Ichitani, Y. (2016). Involvement of hippocampal NMDA receptors in retrieval of spontaneous object recognition memory in rats. *Behavioural Brain Research*, 307, 92–99. doi:10.1016/j.bbr.2016.03.048
- Jarome, T. J., Werner, C. T., Kwapis, J. L., & Helmstetter, F. J. (2011). Activity dependent protein degradation is critical for the formation and stability of fear memory in the amygdala. *Plos One*, 6(9), e24349. doi:10.1371/journal.pone.0024349
- Kaang, B.-K., & Choi, J.-H. (2012). Synaptic protein degradation in memory reorganization. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 970, 221–240. doi:10.1007/978-3-7091-0932-8_10
- Kapur, A., Yeckel, M., & Johnston, D. (2001). Hippocampal mossy fiber activity evokes Ca^{2+} release in CA3 pyramidal neurons via a metabotropic glutamate receptor pathway. *Neuroscience*, 107(1), 59–69. doi:10.1016/s0306-4522(01)00293-7
- Kelleher, R. J., Govindarajan, A., & Tonegawa, S. (2004). Translational regulatory mechanisms in persistent forms of synaptic plasticity. *Neuron*, 44(1), 59–73. doi:10.1016/j.neuron.2004.09.013
- Kwon, H.-B., & Castillo, P. E. (2008). Long-term potentiation selectively expressed by NMDA receptors at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron*, 57(1), 108–120. doi:10.1016/j.neuron.2007.11.024
- Lee, J. L. C. (2008). Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nature Neuroscience*, 11(11), 1264–1266. doi:10.1038/nn.2205
- Lee, S.-H., Choi, J.-H., Lee, N., Lee, H.-R., Kim, J.-I., Yu, N.-K., ... Kaang, B.-K. (2008). Synaptic protein degradation underlies destabilization of retrieved fear memory. *Science*, 319(5867), 1253–1256. doi:10.1126/science.1150541

- Lopez, J., Gamache, K., Schneider, R., & Nader, K. (2015). Memory retrieval requires ongoing protein synthesis and NMDA receptor activity-mediated AMPA receptor trafficking. *The Journal of Neuroscience*, 35(6), 2465–2475. doi:10.1523/JNEUROSCI.0735-14.2015
- Lunardi, P., Sachser, R. M., Sierra, R. O., Pedraza, L. K., Medina, C., de la Fuente, V., ... de Oliveira Alvares, L. (2018). Effects of hippocampal LIMK inhibition on memory acquisition, consolidation, retrieval, reconsolidation, and extinction. *Molecular Neurobiology*, 55(2), 958–967. doi:10.1007/s12035-016-0361-x
- Malenka, R C, Lancaster, B., & Zucker, R. S. (1992). Temporal limits on the rise in postsynaptic calcium required for the induction of long-term potentiation. *Neuron*, 9(1), 121–128. doi:10.1016/0896-6273(92)90227-5
- Malenka, Robert C, & Bear, M. F. (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron*, 44(1), 5–21. doi:10.1016/j.neuron.2004.09.012
- Mamiya, N., Fukushima, H., Suzuki, A., Matsuyama, Z., Homma, S., Frankland, P. W., & Kida, S. (2009). Brain region-specific gene expression activation required for reconsolidation and extinction of contextual fear memory. *The Journal of Neuroscience*, 29(2), 402–413. doi:10.1523/JNEUROSCI.4639-08.2009
- McGaugh, J. L. (2000). Memory--a century of consolidation. *Science*, 287(5451), 248–251. doi:10.1126/science.287.5451.248
- Meldolesi, J. (2001). Rapidly exchanging Ca²⁺ stores in neurons: molecular, structural and functional properties. *Progress in Neurobiology*, 65(3), 309–338. doi:10.1016/s0301-0082(01)00004-1
- Myers, K. M., & Davis, M. (2007). Mechanisms of fear extinction. *Molecular Psychiatry*, 12(2), 120–150. doi:10.1038/sj.mp.4001939
- Popik, B., Crestani, A. P., Silva, M. O., Quillfeldt, J. A., & de Oliveira Alvares, L. (2018). Calpain modulates fear memory consolidation, retrieval and reconsolidation in the hippocampus. *Neurobiology of Learning and Memory*, 151, 53–58. doi:10.1016/j.nlm.2018.04.002
- Quirk, G. J., & Mueller, D. (2008). Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology*, 33(1), 56–72. doi:10.1038/sj.npp.1301555
- Raymond, C R, Thompson, V. L., Tate, W. P., & Abraham, W. C. (2000). Metabotropic glutamate receptors trigger homosynaptic protein synthesis to prolong long-term potentiation. *The Journal of Neuroscience*, 20(3), 969–976.
- Raymond, Clarke R. (2007). LTP forms 1, 2 and 3: different mechanisms for the “long” in long-term potentiation. *Trends in Neurosciences*, 30(4), 167–175. doi:10.1016/j.tins.2007.01.007
- Raymond, Clarke R, & Redman, S. J. (2002). Different calcium sources are narrowly tuned to the induction of different forms of LTP. *Journal of Neurophysiology*, 88(1), 249–255. doi:10.1152/jn.2002.88.1.249
- Raymond, Clarke R, & Redman, S. J. (2006). Spatial segregation of neuronal calcium signals encodes different forms of LTP in rat hippocampus. *The Journal of Physiology*, 570(Pt 1), 97–111. doi:10.1113/jphysiol.2005.098947
- Redondo, J., Popik, B., Casagrande, M., Silva, M. O., Quillfeldt, J. A., de Oliveira Alvares, L., & Mello E Souza, T. (2020). Hippocampal HECT E3 ligase inhibition facilitates consolidation,

retrieval, and reconsolidation, and inhibits extinction of contextual fear memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 167, 107135. doi:10.1016/j.nlm.2019.107135

Reymann, K. G., & Frey, J. U. (2007). The late maintenance of hippocampal LTP: requirements, phases, “synaptic tagging”, “late-associativity” and implications. *Neuropharmacology*, 52(1), 24–40. doi:10.1016/j.neuropharm.2006.07.026

Rudy, J. W. (2008). Destroying memories to strengthen them. *Nature Neuroscience*, 11(11), 1241–1242. doi:10.1038/nn1108-1241

Schafe, G. E., Atkins, C. M., Swank, M. W., Bauer, E. P., Sweatt, J. D., & LeDoux, J. E. (2000). Activation of ERK/MAP kinase in the amygdala is required for memory consolidation of pavlovian fear conditioning. *The Journal of Neuroscience*, 20(21), 8177–8187.

Sharp, A. H., McPherson, P. S., Dawson, T. M., Aoki, C., Campbell, K. P., & Snyder, S. H. (1993). Differential immunohistochemical localization of inositol 1,4,5-trisphosphate- and ryanodine-sensitive Ca^{2+} release channels in rat brain. *The Journal of Neuroscience*, 13(7), 3051–3063.

Shimizu, E., Tang, Y. P., Rampon, C., & Tsien, J. Z. (2000). NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation. *Science*, 290(5494), 1170–1174. doi:10.1126/science.290.5494.1170

Sokolov, M. V., Rossokhin, A. V., M Kasyanov, A., Gasparini, S., Berretta, N., Cherubini, E., & Voronin, L. L. (2003). Associative mossy fibre LTP induced by pairing presynaptic stimulation with postsynaptic hyperpolarization of CA3 neurons in rat hippocampal slice. *The European Journal of Neuroscience*, 17(7), 1425–1437. doi:10.1046/j.1460-9568.2003.02563.x

Spacek, J., & Harris, K. M. (1997). Three-dimensional organization of smooth endoplasmic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendritic spines of the immature and mature rat. *The Journal of Neuroscience*, 17(1), 190–203. doi:10.1523/JNEUROSCI.17-01-00190.1997

Steward, O., & Schuman, E. M. (2001). Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. *Annual Review of Neuroscience*, 24, 299–325. doi:10.1146/annurev.neuro.24.1.299

Sutton, M. A., & Schuman, E. M. (2005). Local translational control in dendrites and its role in long-term synaptic plasticity. *Journal of Neurobiology*, 64(1), 116–131. doi:10.1002/neu.20152

Suzuki, A., Josselyn, S. A., Frankland, P. W., Masushige, S., Silva, A. J., & Kida, S. (2004). Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *The Journal of Neuroscience*, 24(20), 4787–4795. doi:10.1523/JNEUROSCI.5491-03.2004

Suzuki, A., Mukawa, T., Tsukagoshi, A., Frankland, P. W., & Kida, S. (2008). Activation of LVGCCs and CB1 receptors required for destabilization of reactivated contextual fear memories. *Learning & Memory*, 15(6), 426–433. doi:10.1101/lm.888808

Szapiro, G, Izquierdo, L. A., Alonso, M., Barros, D., Paratcha, G., Ardenghi, P., ... Izquierdo, I. (2000). Participation of hippocampal metabotropic glutamate receptors, protein kinase A and mitogen-activated protein kinases in memory retrieval. *Neuroscience*, 99(1), 1–5. doi:10.1016/s0306-4522(00)00236-0

Szapiro, German, Vianna, M. R. M., McGaugh, J. L., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2003). The role of NMDA glutamate receptors, PKA, MAPK, and CAMKII in the hippocampus in extinction of conditioned fear. *Hippocampus*, 13(1), 53–58. doi:10.1002/hipo.10043

Vianna, M. R., Barros, D. M., Silva, T., Choi, H., Madche, C., Rodrigues, C., ... Izquierdo, I. (2000). Pharmacological demonstration of the differential involvement of protein kinase C isoforms in short- and long-term memory formation and retrieval of one-trial avoidance in rats. *Psychopharmacology*, 150(1), 77–84. doi:10.1007/s002130000396

4. DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi investigado o envolvimento dos receptores de IP₃ em diferentes processos de memória através do uso do antagonista de IP₃R 2-APB. Os achados aqui descritos sugerem um papel importante para os IP₃Rs na consolidação e na evocação da memória aversiva contextual em ratos. A reconsolidação e a extinção, por outro lado, se mostraram imunes ao prejuízo pelo bloqueio de IP₃R no hipocampo. Este foi o primeiro estudo que avaliou o efeito da inibição de IP₃R hipocampal em processos de memória.

Existe um corpo significativo de evidências indicando um papel pós-sináptico para IP₃Rs na LTP no hipocampo (Kapur et al. 2001, Kwon & Castillo 2008, Sokolov et al. 2003). Após a liberação pré-sináptica de glutamato, a ativação concomitante de mGluRs de grupo I e NMDARs resulta em sinais de IP₃ e Ca²⁺, respectivamente, que são necessários para ativar IP₃Rs no eixo dendrítico (Berridge et al. 2000, Foskett et al. 2007, Raymond & Redman 2002). A consequente liberação de Ca²⁺ através de IP₃Rs (CICR) já foi sugerida como uma etapa essencial na cascata de síntese local de proteínas dependente de mGluR, que é necessária para as fases mais tardias da LTP (Raymond 2007, Raymond & Redman 2002, Raymond et al. 2000). De fato, o bloqueio de IP₃R com o antagonista específico xestospongina C em neurônios piramidais de CA1 *in vitro* inibe a LTP2, fase intermediária da LTP que é dependente de síntese local de proteínas mas não requer transcrição gênica (Raymond 2007, Raymond & Redman 2002, 2006). Além disso, a inibição pós-treino de IP₃Rs ou mGluR1s no mesopálio medial intermediário de galinhas resulta em perda persistente de retenção da memória, observada 24 h após o treino, em uma tarefa de esquiva discriminativa (Baker et al. 2008). As observações, descritas neste trabalho, de que o 2-APB foi capaz de prejudicar a consolidação da memória em ratos são consistentes com esses estudos. É possível que a inibição de IP₃Rs perturbe fases tardias da potenciação sináptica ao dificultar a síntese local (dendrítica) de proteínas.

O fato de que a infusão de 2-APB foi capaz de prejudicar a consolidação mesmo quando feita 90 min depois do treino reforça a hipótese de que os IP₃Rs tenham um papel na LTP tardia. Um conjunto importante de evidências aponta para a existência de distintos períodos críticos dentro da janela de consolidação que requerem síntese de proteínas e a atividade de proteínas cinases essenciais. Bourtchouladze et al. (1998) observaram que a inibição da síntese de proteínas ou da PKA no hipocampo de camundongos causou prejuízo na consolidação da memória aversiva contextual quando realizada imediatamente ou 4 h, mas não 1 ou 6 h, após o treino. Em ratos, o aprendizado na esquiva inibitória requer aumento em concentração e atividade de PKA 0, 3 ou 6 h após o treino no hipocampo; na amígdala, os níveis da cinase

regulada por sinal extracelular/proteína cinase ativada por mitógeno (ERK/MAPK) estão aumentados 60 min, mas não 15, 30 ou 180 min, após o treino no condicionamento aversivo ao tom (Bernabeu et al. 1997, Schafe et al. 2000). É sabido que tanto a via da ERK/MAPK quanto a do monofosfato cíclico de adenosina (cAMP)/PKA são reguladoras da formação da memória (Impey et al. 1999). Além disso, a perda persistente de retenção reportada por Baker et al. (2008) após inibição de IP₃Rs em galinhas foi observada a partir de 90 min após o treino. Portanto, é razoável assumir que a amplificação de sinais intracelulares de Ca²⁺ via IP₃Rs possa ter um papel importante na síntese de proteínas e na ativação de cinases durante fases tardias da consolidação da memória.

A evocação da memória também é um processo ativo. Ela requer síntese contínua de proteínas e tráfego de AMPARs (Lopez et al. 2015). Além disso, a inibição pré-teste da PKA ou do ativador à montante da MAPK prejudica a evocação da memória de esQUIVA INIBITÓRIA (Szapiro et al. 2000). O mesmo efeito, é importante destacar, foi encontrado com o bloqueio do mGluR, o principal ativador do IP₃R e um grande desencadeador de síntese dendrítica de proteínas (Sutton & Schuman 2005, Szapiro et al. 2000). A liberação de Ca²⁺ mediada por IP₃Rs também pode estar envolvida com a ativação da PKC, enzima cuja importância já foi demonstrada não só para a LTP tardia, à jusante da ativação do mGluR, mas também para a evocação da memória de esQUIVA INIBITÓRIA (Reymann & Frey 2007, Vianna et al. 2000). Os resultados obtidos neste trabalho corroboram esses dados, sugerindo que a evocação da memória é um processo ativo e dependente de síntese de proteínas e que está condicionado à atividade mGluR-dependente de IP₃Rs.

A infusão de 2-APB imediatamente após a evocação não causou prejuízo na expressão da memória observada 24 h depois. Considerando que, em experimentos anteriores neste laboratório, protocolos similares tornaram a memória suscetível a modificações através da reconsolidação (Lunardi et al. 2018, Popik et al. 2018, Redondo et al. 2020), duas hipóteses podem ser consideradas: (1) o aumento nos níveis intracelulares de Ca²⁺ através de IP₃Rs não é necessário para a reconsolidação da memória aversiva contextual ou (2) a inibição de IP₃Rs bloqueou a desestabilização do traço mnemônico que normalmente ocorre após a evocação (Lee 2008, Rudy 2008). Estudos que sugerem que a desestabilização do traço depende do aumento dos níveis de Ca²⁺ através de NMDARs e CCDVs para ativar o sistema ubiquitina-proteassoma e a degradação de proteínas *scaffold* (Ben Mamou et al. 2006, Jarome et al. 2011, Kaang & Choi 2012, Suzuki et al. 2008) fortalecem a segunda hipótese. De fato, a inibição da atividade de proteassomas tanto no hipocampo quanto na amígdala preveniram a perda de memória

aversiva contextual causada pelo inibidor de síntese proteica anisomicina após evocação (Jarome et al. 2011, Lee et al. 2008). Experimentos adicionais, como a coinfusão de 2-APB e anisomicina imediatamente após a evocação, seriam necessários para suportar essa proposição.

As regiões encefálicas mais associadas à extinção das memórias aversivas são o córtex pré-frontal medial (mPFC), a amígdala e o hipocampo (Myers & Davis 2007). Entretanto, como a extinção é considerada um novo aprendizado, ela ocorre em diferentes fases, como aquisição, consolidação e evocação, e o papel específico de cada estrutura encefálica nas diferentes fases da extinção ainda não foi muito esclarecido (Baldi & Bucherelli 2015, Quirk & Mueller 2008). Uma vez que o hipocampo é tido como o principal local de armazenamento de informação contextual, é possível que ele não tenha, na consolidação da memória de extinção, o mesmo papel fundamental que ele tem na sua aquisição ou evocação. De acordo com essa hipótese, como a informação contextual já teria sido armazenada no hipocampo durante a consolidação da memória aversiva, a prolongada (e desimpedida) evocação dessa memória seria suficiente para que fosse induzida a consolidação da nova memória de extinção nas outras estruturas encefálicas, sem que fosse necessário um novo processo de consolidação especificamente no hipocampo. Corroborando essa teoria, um estudo publicado por Mamiya et al. (2009) reportou que o inibidor de síntese proteica anisomicina prejudicou a extinção da memória aversiva contextual se infundido imediatamente após a sessão de extinção na amígdala ou no mPFC, mas não no hipocampo dorsal. Além disso, a infusão do agonista gabaérgico muscimol no hipocampo dorsal, também logo após a sessão de extinção, não bloqueou a consolidação da memória de extinção nem atenuou os efeitos potencializadores que a infusão de noradrenalina na amígdala tem na memória de extinção (Berlau & McGaugh 2006). Outros estudos, entretanto, obtiveram resultados contrastantes (de Carvalho Myskiw et al. 2014, Fiorenza et al. 2012, Szapiro et al. 2003). Dessa forma, apesar da extinção não ter sido perturbada pela infusão hipocampal de 2-APB após a sessão de extinção no presente trabalho, não se pode excluir a possibilidade de que a sinalização de Ca^{2+} mediada por IP_3Rs no hipocampo dorsal desempenhe um papel na consolidação da extinção. Experimentos futuros com diferentes intensidades de treino, durações de exposição ao contexto ou dosagens farmacológicas deverão ajudar a elucidar essa questão.

5. CONCLUSÃO

Os resultados aqui apresentados confirmam, em ratos, o que já havia sido sugerido em trabalhos anteriores com galinhas e em fatias hipocâmpais *in vitro*. Os IP₃Rs parecem estar intimamente envolvidos com LTP e memória, especialmente em fases tardias. Pode-se concluir, portanto, que o aumento nos níveis intracelulares de Ca²⁺ através dos IP₃Rs provavelmente colabora para o processamento da consolidação e da evocação da memória aversiva contextual ao induzir a síntese local de novas proteínas e a ativação de enzimas-chave. Experimentos futuros serão necessários para confirmar essas hipóteses e para investigar se os IP₃Rs são de alguma forma importantes para a reconsolidação e a extinção da memória.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abel T, Lattal KM. 2001. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11(2):180–187
- Baker KD, Edwards TM, Rickard NS. 2008. Inhibition of mGluR1 and IP3Rs impairs long-term memory formation in young chicks. *Neurobiol. Learn. Mem.* 90(1):269–274
- Baker KD, Edwards TM, Rickard NS. 2013. The role of intracellular calcium stores in synaptic plasticity and memory consolidation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 37(7):1211–1239
- Baldi E, Bucherelli C. 2015. Brain sites involved in fear memory reconsolidation and extinction of rodents. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 53:160–190
- Bell M, Bartol T, Sejnowski T, Rangamani P. 2019. Dendritic spine geometry and spine apparatus organization govern the spatiotemporal dynamics of calcium. *J. Gen. Physiol.* 151(8):1017–1034
- Ben Mamou C, Gamache K, Nader K. 2006. NMDA receptors are critical for unleashing consolidated auditory fear memories. *Nat. Neurosci.* 9(10):1237–1239
- Benke TA, Lüthi A, Isaac JT, Collingridge GL. 1998. Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity. *Nature.* 393(6687):793–797
- Berlau DJ, McGaugh JL. 2006. Enhancement of extinction memory consolidation: the role of the noradrenergic and GABAergic systems within the basolateral amygdala. *Neurobiol. Learn. Mem.* 86(2):123–132
- Bernabeu R, Bevilaqua L, Ardenghi P, Bromberg E, Schmitz P, et al. 1997. Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94(13):7041–7046
- Berridge MJ. 1998. Neuronal calcium signaling. *Neuron.* 21(1):13–26
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1(1):11–21
- Bliss TVP, Collingridge GL, Morris RGM, Reymann KG. 2018. Long-term potentiation in the hippocampus: discovery, mechanisms and function. *Neuroforum.* 24(3):A103–A120
- Bourtchouladze R, Abel T, Berman N, Gordon R, Lapidus K, Kandel ER. 1998. Different training procedures recruit either one or two critical periods for contextual memory consolidation, each of which requires protein synthesis and PKA. *Learn. Mem.* 5(4-5):365–374
- Bredt DS, Nicoll RA. 2003. AMPA receptor trafficking at excitatory synapses. *Neuron.* 40(2):361–379
- Brini M, Cali T, Ottolini D, Carafoli E. 2014. Neuronal calcium signaling: function and dysfunction. *Cell Mol. Life Sci.* 71(15):2787–2814

- Castellano C, Cestari V, Ciamei A. 2001. NMDA receptors and learning and memory processes. *Curr Drug Targets*. 2(3):273–283
- Citri A, Malenka RC. 2008. Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology*. 33(1):18–41
- Clapham DE. 2007. Calcium signaling. *Cell*. 131(6):1047–1058
- Colgan LA, Hu M, Misler JA, Parra-Bueno P, Moran CM, et al. 2018. PKC α integrates spatiotemporally distinct Ca $^{2+}$ and autocrine BDNF signaling to facilitate synaptic plasticity. *Nat. Neurosci*. 21(8):1027–1037
- Collingridge GL, Isaac JTR, Wang YT. 2004. Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci*. 5(12):952–962
- Collingridge GL, Kehl SJ, McLennan H. 1983. Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J. Physiol. (Lond.)*. 334:33–46
- Da Silva WC, Cardoso G, Bonini JS, Benetti F, Izquierdo I. 2013. Memory reconsolidation and its maintenance depend on L-voltage-dependent calcium channels and CaMKII functions regulating protein turnover in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 110(16):6566–6570
- de Carvalho Myskiw J, Furini CRG, Benetti F, Izquierdo I. 2014. Hippocampal molecular mechanisms involved in the enhancement of fear extinction caused by exposure to novelty. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 111(12):4572–4577
- Deller T, Korte M, Chabanis S, Drakew A, Schwegler H, et al. 2003. Synaptopodin-deficient mice lack a spine apparatus and show deficits in synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 100(18):10494–10499
- Dunwiddie T, Lynch G. 1978. Long-term potentiation and depression of synaptic responses in the rat hippocampus: localization and frequency dependency. *J. Physiol. (Lond.)*. 276:353–367
- Edwards TM, Rickard NS. 2006. Pharmacological evidence indicating a complex role for ryanodine receptor calcium release channels in memory processing for a passive avoidance task. *Neurobiol. Learn. Mem.* 86(1):1–8
- Fiorenza NG, Rosa J, Izquierdo I, Myskiw JC. 2012. Modulation of the extinction of two different fear-motivated tasks in three distinct brain areas. *Behav. Brain Res*. 232(1):210–216
- Foskett JK, White C, Cheung K-H, Mak D-OD. 2007. Inositol trisphosphate receptor Ca $^{2+}$ release channels. *Physiol. Rev*. 87(2):593–658
- Galeotti N, Quattrone A, Vivoli E, Norcini M, Bartolini A, Ghelardini C. 2008. Different involvement of type 1, 2, and 3 ryanodine receptors in memory processes. *Learn. Mem.* 15(5):315–323
- Gibbs ME. 2008. Memory systems in the chick: regional and temporal control by noradrenaline. *Brain Res. Bull.* 76(3):170–182

- Gray EG. 1959. Electron microscopy of synaptic contacts on dendrite spines of the cerebral cortex. *Nature*. 183(4675):1592–1593
- Impey S, Obrietan K, Storm DR. 1999. Making new connections: role of ERK/MAP kinase signaling in neuronal plasticity. *Neuron*. 23(1):11–14
- Jarome TJ, Werner CT, Kwapis JL, Helmstetter FJ. 2011. Activity dependent protein degradation is critical for the formation and stability of fear memory in the amygdala. *PLoS One*. 6(9):e24349
- Jedlicka P, Vlachos A, Schwarzacher SW, Deller T. 2008. A role for the spine apparatus in LTP and spatial learning. *Behav. Brain Res*. 192(1):12–19
- Kaang B-K, Choi J-H. 2012. Synaptic protein degradation in memory reorganization. *Adv. Exp. Med. Biol*. 970:221–240
- Kandel ER, Dudai Y, Mayford MR. 2014. The molecular and systems biology of memory. *Cell*. 157(1):163–186
- Kapur A, Yeckel M, Johnston D. 2001. Hippocampal mossy fiber activity evokes Ca²⁺ release in CA3 pyramidal neurons via a metabotropic glutamate receptor pathway. *Neuroscience*. 107(1):59–69
- Karagas NE, Venkatachalam K. 2019. Roles for the endoplasmic reticulum in regulation of neuronal calcium homeostasis. *Cells*. 8(10):
- Kwon H-B, Castillo PE. 2008. Long-term potentiation selectively expressed by NMDA receptors at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron*. 57(1):108–120
- Lalanne T, Oyrer J, Farrant M, Sjöström PJ. 2018. Synapse Type-Dependent Expression of Calcium-Permeable AMPA Receptors. *Front. Synaptic Neurosci*. 10:34
- LeDoux JE. 2000. Emotion circuits in the brain. *Annu. Rev. Neurosci*. 23:155–184
- Lee JLC. 2008. Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nat. Neurosci*. 11(11):1264–1266
- Lee S-H, Choi J-H, Lee N, Lee H-R, Kim J-I, et al. 2008. Synaptic protein degradation underlies destabilization of retrieved fear memory. *Science*. 319(5867):1253–1256
- Liu Y, Zhang J. 2000. Recent development in NMDA receptors. *Chin. Med. J*. 113(10):948–956
- Lledo PM, Hjelmstad GO, Mukherji S, Soderling TR, Malenka RC, Nicoll RA. 1995. Calcium/calmodulin-dependent kinase II and long-term potentiation enhance synaptic transmission by the same mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92(24):11175–11179
- Lopez J, Gamache K, Schneider R, Nader K. 2015. Memory retrieval requires ongoing protein synthesis and NMDA receptor activity-mediated AMPA receptor trafficking. *J. Neurosci*. 35(6):2465–2475

- Lunardi P, Sachser RM, Sierra RO, Pedraza LK, Medina C, et al. 2018. Effects of hippocampal LIMK inhibition on memory acquisition, consolidation, retrieval, reconsolidation, and extinction. *Mol. Neurobiol.* 55(2):958–967
- Makhinson M, Chotiner JK, Watson JB, O’Dell TJ. 1999. Adenylyl cyclase activation modulates activity-dependent changes in synaptic strength and Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II autophosphorylation. *J. Neurosci.* 19(7):2500–2510
- Mamiya N, Fukushima H, Suzuki A, Matsuyama Z, Homma S, et al. 2009. Brain region-specific gene expression activation required for reconsolidation and extinction of contextual fear memory. *J. Neurosci.* 29(2):402–413
- Mateos-Aparicio P, Rodríguez-Moreno A. 2020. Calcium dynamics and synaptic plasticity. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1131:965–984
- McGaugh JL. 2000. Memory--a century of consolidation. *Science.* 287(5451):248–251
- Murphy TH, Worley PF, Baraban JM. 1991. L-type voltage-sensitive calcium channels mediate synaptic activation of immediate early genes. *Neuron.* 7(4):625–635
- Myers KM, Davis M. 2007. Mechanisms of fear extinction. *Mol. Psychiatry.* 12(2):120–150
- Nabavi S, Fox R, Proulx CD, Lin JY, Tsien RY, Malinow R. 2014. Engineering a memory with LTD and LTP. *Nature.* 511(7509):348–352
- Nader K. 2015. Reconsolidation and the dynamic nature of memory. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7(10):a021782
- Park P, Kang H, Sanderson TM, Bortolotto ZA, Georgiou J, et al. 2018. The Role of Calcium-Permeable AMPARs in Long-Term Potentiation at Principal Neurons in the Rodent Hippocampus. *Front. Synaptic Neurosci.* 10:42
- Popik B, Crestani AP, Silva MO, Quillfeldt JA, de Oliveira Alvares L. 2018. Calcipain modulates fear memory consolidation, retrieval and reconsolidation in the hippocampus. *Neurobiol. Learn. Mem.* 151:53–58
- Quirk GJ, Mueller D. 2008. Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology.* 33(1):56–72
- Raymond CR. 2007. LTP forms 1, 2 and 3: different mechanisms for the “long” in long-term potentiation. *Trends Neurosci.* 30(4):167–175
- Raymond CR, Redman SJ. 2002. Different calcium sources are narrowly tuned to the induction of different forms of LTP. *J. Neurophysiol.* 88(1):249–255
- Raymond CR, Redman SJ. 2006. Spatial segregation of neuronal calcium signals encodes different forms of LTP in rat hippocampus. *J. Physiol. (Lond.).* 570(Pt 1):97–111
- Raymond CR, Thompson VL, Tate WP, Abraham WC. 2000. Metabotropic glutamate receptors trigger homosynaptic protein synthesis to prolong long-term potentiation. *J. Neurosci.* 20(3):969–976

- Redondo J, Popik B, Casagrande M, Silva MO, Quillfeldt JA, et al. 2020. Hippocampal HECT E3 ligase inhibition facilitates consolidation, retrieval, and reconsolidation, and inhibits extinction of contextual fear memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* 167:107135
- Reymann KG, Frey JU. 2007. The late maintenance of hippocampal LTP: requirements, phases, “synaptic tagging”, “late-associativity” and implications. *Neuropharmacology.* 52(1):24–40
- Rudy JW. 2008. Destroying memories to strengthen them. *Nat. Neurosci.* 11(11):1241–1242
- Schafe GE, Atkins CM, Swank MW, Bauer EP, Sweatt JD, LeDoux JE. 2000. Activation of ERK/MAP kinase in the amygdala is required for memory consolidation of pavlovian fear conditioning. *J. Neurosci.* 20(21):8177–8187
- Sharp AH, McPherson PS, Dawson TM, Aoki C, Campbell KP, Snyder SH. 1993. Differential immunohistochemical localization of inositol 1,4,5-trisphosphate- and ryanodine-sensitive Ca²⁺ release channels in rat brain. *J. Neurosci.* 13(7):3051–3063
- Simms BA, Zamponi GW. 2014. Neuronal voltage-gated calcium channels: structure, function, and dysfunction. *Neuron.* 82(1):24–45
- Sokolov MV, Rossokhin AV, M Kasyanov A, Gasparini S, Berretta N, et al. 2003. Associative mossy fibre LTP induced by pairing presynaptic stimulation with postsynaptic hyperpolarization of CA3 neurons in rat hippocampal slice. *Eur. J. Neurosci.* 17(7):1425–1437
- Sommer B, Köhler M, Sprengel R, Seeburg PH. 1991. RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell.* 67(1):11–19
- Squire LR, Zola-Morgan S. 1991. Memory, brain and memory systems. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7(3):a021667
- Squire LR, Zola SM. 1996. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93(24):13515–13522
- Squire LR, Zola-Morgan S. 1991. The medial temporal lobe memory system. *Science.* 253(5026):1380–1386
- Stevens CF. 1998. A million dollar question: does LTP = memory? *Neuron.* 20(1):1–2
- Sutton MA, Schuman EM. 2005. Local translational control in dendrites and its role in long-term synaptic plasticity. *J. Neurobiol.* 64(1):116–131
- Suzuki A, Mukawa T, Tsukagoshi A, Frankland PW, Kida S. 2008. Activation of LVGCCs and CB1 receptors required for destabilization of reactivated contextual fear memories. *Learn. Mem.* 15(6):426–433
- Szapiro G, Izquierdo LA, Alonso M, Barros D, Paratcha G, et al. 2000. Participation of hippocampal metabotropic glutamate receptors, protein kinase A and mitogen-activated protein kinases in memory retrieval. *Neuroscience.* 99(1):1–5
- Szapiro G, Vianna MRM, McGaugh JL, Medina JH, Izquierdo I. 2003. The role of NMDA glutamate receptors, PKA, MAPK, and CAMKII in the hippocampus in extinction of conditioned fear. *Hippocampus.* 13(1):53–58

- Terasaki M. 2018. Axonal endoplasmic reticulum is very narrow. *J. Cell Sci.* 131(4):
- Terasaki M, Shemesh T, Kasthuri N, Klemm RW, Schalek R, et al. 2013. Stacked endoplasmic reticulum sheets are connected by helicoidal membrane motifs. *Cell.* 154(2):285–296
- Toescu EC, Verkhratsky A, Landfield PW. 2004. Ca²⁺ regulation and gene expression in normal brain aging. *Trends Neurosci.* 27(10):614–620
- Torquatto KI, Menegolla AP, Popik B, Casagrande MA, de Oliveira Alvares L. 2019. Role of calcium-permeable AMPA receptors in memory consolidation, retrieval and updating. *Neuropharmacology.* 144:312–318
- Verdoorn TA, Burnashev N, Monyer H, Seeburg PH, Sakmann B. 1991. Structural determinants of ion flow through recombinant glutamate receptor channels. *Science.* 252(5013):1715–1718
- Vianna MR, Barros DM, Silva T, Choi H, Madche C, et al. 2000. Pharmacological demonstration of the differential involvement of protein kinase C isoforms in short- and long-term memory formation and retrieval of one-trial avoidance in rats. *Psychopharmacology.* 150(1):77–84
- Vierra NC, Kirmiz M, van der List D, Santana LF, Trimmer JS. 2019. Kv2.1 mediates spatial and functional coupling of L-type calcium channels and ryanodine receptors in mammalian neurons. *Elife.* 8:
- Vyklicky V, Korinek M, Smejkalova T, Balik A, Krausova B, et al. 2014. Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels. *Physiol. Res.* 63 Suppl 1:S191–203
- Wheeler DB, Randall A, Tsien RW. 1994. Roles of N-type and Q-type Ca²⁺ channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science.* 264(5155):107–111
- Wild AR, Sinnen BL, Dittmer PJ, Kennedy MJ, Sather WA, Dell'Acqua ML. 2019. Synapse-to-Nucleus Communication through NFAT Is Mediated by L-type Ca²⁺ Channel Ca²⁺ Spike Propagation to the Soma. *Cell Rep.* 26(13):3537–3550.e4
- Woodside BL, Borroni AM, Hammonds MD, Teyler TJ. 2004. NMDA receptors and voltage-dependent calcium channels mediate different aspects of acquisition and retention of a spatial memory task. *Neurobiol. Learn. Mem.* 81(2):105–114
- Yin HH, Knowlton BJ. 2006. The role of the basal ganglia in habit formation. *Nat. Rev. Neurosci.* 7(6):464–476