

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências Básicas de Saúde

# Envolvimento das vias bioquímicas AMP<sub>c</sub>/PKA<sub>α</sub>/CREB e MAPK/ELK-1 na formação da memória

Lia Rejane Müller Bevilaqua  
Dissertação de Doutorado



Orientador: Prof. Dr. Iván Antonio Izquierdo  
Co-Orientador: Prof. Dr. Jorge H. Medina  
Porto Alegre - Buenos Aires  
Março/2000

*Aos meus pais, **PEDRO** e **IUSARA**, e à  
minha irmã, **DANIELA**, pela presença  
constante e apoio incondicional em todos os  
momentos de minha vida.*

*e*

*Ao **MARTÍN**,  
Pelo amor e companheirismo de todos os  
momentos!*

**Giovana, Tadeu, Evelyn, Mônica, Márcia, João, Liane, Elke, Fernanda, Cléia, Sandra, Rafael, Nadja**, enfim, a todas as pessoas que, de uma maneira ou de outra, contribuíram pelos bons momentos vividos neste período, agradeço pelo carinho e atenção que sempre demonstraram.

Aos colegas e amigos de Buenos Aires, **Miguelina, Haydée, Mariana, Gustavo, Edgar, Diana, Cláudia** ("in memorian"), **Ramón, Melina, Germán**, e a todas as pessoas com as quais comparti bons momentos, muito obrigada!

À CAPES, ao PRONEX e à Fundação VITAE, por tornar economicamente possível e viável a realização de todos os experimentos apresentados nesta Tese de Doutorado.

A handwritten signature in black ink, written in a cursive style, reading 'Lia Rejane Müller Bevilaqua'. The signature is positioned above a solid horizontal line.

Lia Rejane Müller Bevilaqua

## ÍNDICE

*Dedicatórias*

*Agradecimentos*

*Siglas e Abreviaturas*

*Índice de Figuras*

Introdução	página 1
Materiais e Métodos	página 14
Vias bioquímicas AMPc/PKA/pCREB e MAPK/ELK1	página 29
CREB em Mitocôndrias Cerebrais	página 81
Resumo	página 105
Conclusões	página 107
Referências Bibliográficas	página 108

*Artigos Científicos Publicados*

As seguintes abreviaturas e siglas foram utilizadas, com o objetivo

## SIGLAS

de simplificar a escritura desta tese:

<b>e</b>		
<b>A</b>	AC	adenilato ciclase
<b>BRE</b>	ACs	adenilatos ciclases
<b>VIA</b>	AMPA	" $\alpha$ -amino 3 hidroxy 5 methyl isoxazole propionate"
<b>TU</b>	APV	"2-amino-5-phosphonopentanoic acid"
<b>RAS</b>	CBP	"CREB binding protein"
	CRE	"cAMP responsive element"
	CREB	"cAMP responsive element binding protein"
	DMSO	"dimethyl sulfoxide"
	DTT	"DL-dithiothreitol"
	EDTA	"ethylenediaminetetraacetic acid"
	EGTA	"ethylene glycol-bis( $\beta$ -aminoethyl ether)-N,N,N',N'- tetraacetic acid"
	EMSA	"eletroforetic mobility shift assay"
	ERK	"extracellular signal-regulated kinase"
	GEF	"guanine nucleotide exchange factor"
	GNRF	"guanine nucleotide release factor"
	GRF	"guanine releasing factor"

IBMX	"3-isobutyl-1-methylxantine"
JNK	"Jun N-terminal kinase"
MAPK	"mitogen-associated protein kinase"
MAPKs	"mitogen-associated protein kinases"
MEK	"mitogen-activated/extracellular receptor-regulated kse"
NMDA	N-methyl-D-aspartate"
P-BOX	"phosphorilation box"
PDE	"phosphodiesterase"
PMSF	"phenylmethylsulfonyl fluoride"
PP1	"protein phosphatase 1"
PP2B	calcineurina
PP2A	"protein phosphatase 2 A"
PVDF	"polyvinylidene fluoride"
Raf	"Ras associated factor"
Rap	"Ras associated protein"
RSK	"ribosomal S6 kinase"
SAP	"SRE associated protein"
SOS	"Son of sevenless"
SRE	"serum response element"
SRF	"serum response factor"
STAT	"signal transducer and activator of transcription"

TCF "ternary complex factor"

**Índice de Figuras**

- Figura 1:* Tipos de memórias e regiões cerebrais envolvidas com a formação das mesmas. pg **4**
- Figura 2:* Caixa de Esquiva Inibitória. pg **14**
- Figura 3:* Estereotáxico utilizado para a implantação das cânulas na região CA1 do hipocampo dorsal. pg **16**
- Figura 4:* Fracionamento subcelular. pg **21**
- Figura 5:* Efeito da administração de 8-Br-AMPC na região CA1 do hipocampo dorsal 0, 3, 6 e 9 horas após o treino. pg **37**
- Figura 6:* Níveis endógenos de AMPc no hipocampo 0, 0.5, 3, 6 e 9 horas após o treino. pg **38**
- Figura 7:* Atividade da enzima fosfodiesterase no hipocampo 0, 3, 6 e 9 horas após o treino.
- Figura 8:* Efeito da administração de forskolina na região CA1 hipocampal 0, 3, 6 e 9 horas após o treino. pg **40**
- Figura 9:* Efeito da administração de KT 5720 na região CA1 do hipocampo dorsal 0, 3, 6 e 9 horas após o treino. pg **42**
- Figura 10:* Atividade da enzima PKA no hipocampo de animais treinados e sacrificados imediatamente, 0.5, 3, 6 e 9 horas após o treino. pg **43**
- Figura 11:* Efeito da administração intra-hipocampal do agonista dopaminérgico SKF 38393 0, 3, 6 e 9 horas após o treino. pg **45**



**Figura 12:** Efeito da administração intra-hipocampal do antagonista dopaminérgico SCH 23390 0, 3, 6 e 9 horas após o treino. **pg 45**

**Figura 13:** União de <sup>3</sup>H-SCH 23390 aos receptores dopaminérgicos hipocampais 0, 1, 3, 6 e 9 horas após o treino na tarefa de esquivas inibitória. **pg 47**

**Figura 14:** Efeito da administração intra-hipocampal do agonista noradrenérgico noradrenalina e do antagonista adrenérgico timolol 0, 1.5, 3, 6 e 9 horas após o treino. **pg 48**

**Figura 15:** Efeito da administração intra-hipocampal do agonista serotoninérgico 8-OH-DPAT e do antagonista serotoninérgico NAN-190 0, 1.5, 3, 6 e 9 horas após o treino. **pg 49**

**Figura 16:** Ensaio de mobilidade eletroforética e “supershift” em extratos nucleares provenientes do hipocampo de animais treinados e sacrificados duas horas após. **pg 51**

**Figura 17:** Imunorreatividade para a forma fosforilada de CREB em extratos nucleares hipocampais de animais controles e animais treinados e sacrificados 120 min após. **pg 54**

**Figura 18:** Imunorreatividade para CREB, independentemente do seu estado de fosforilação, em extratos nucleares hipocampais de animais controles e animais treinados e sacrificados 120 min após. **pg 55**

**Figura 19:** Atividade de CAMKs em frações nucleares provenientes do hipocampo de animais controles e animais treinados e sacrificados imediatamente ou duas horas após.

pg 56

**Figura 20:** Imunorreatividade para a subunidade catalítica da enzima PKA em preparações nucleares provenientes do hipocampo de animais controles, treinados ou choqueados e sacrificados 2 hs após.

pg 57

**Figura 21:** Imunorreatividade para a proteína fosfatase PP2B em extratos nucleares provenientes do hipocampo de animais controles, animais treinados e sacrificados imediatamente ou 2 horas após e animais que receberam apenas choque e foram sacrificados 2 hs após.

pg 58

**Figura 22:** Representação das cascatas bioquímicas que envolvem a participação das MAPKs.

pg 64

**Figura 23:** Imunorreatividade para p42 e p44 em frações nucleares provenientes do hipocampo de animais controle absoluto, treinados e injetados com salina ou treinados e injetados com APV e sacrificados 2 hs após.

pg 69

**Figura 24:** Análise densitométrica dos resultados representados na Figura 23.

pg 70

**Figura 25:** Verificação da atividade enzimática de fosfo p42 e fosfo p44 nas frações nucleares hipocampais de animais controle e animais treinados e injetados com salina ou APV e sacrificados 2 hs após.

pg 71

**Figura 26:** Imunorreatividade para Elk1 em frações nucleares provenientes do hipocampo de animais controle absoluto, treinados e injetados com salina ou treinados e injetados com APV e sacrificados 2 hs após. pg 72

**Figura 27:** Imunorreatividade para c-Fos em extratos nucleares provenientes do hipocampo de animais controle absoluto, treinados e injetados com salina ou treinados e injetados com APV e sacrificados 2 hs após. pg 74

**Figura 28:** Análise densitométrica dos resultados apresentados na Figura 27. pg 75

**Figura 29:** Imunorreatividade para Fra-2 em extratos nucleares provenientes do hipocampo de animais controle absoluto, treinados e injetados com salina ou treinados e injetados com APV e sacrificados 2 hs após. pg 76

**Figura 30:** Imunorreatividade para c-Jun em extratos nucleares provenientes do hipocampo de animais controle absoluto, treinados e injetados com salina ou treinados e injetados com APV e sacrificados 2 hs após. pg 76

**Figura 31:** Esquema representativo do promotor para o gen de c-fos. pg 79

**Figura 32:** Imunorreatividade para CREB total em sinaptossomas, citosol, núcleos, mitocôndrias não sinápticas e mitocôndrias sinápticas. pg 83

**Figura 33:** Imunorreatividade para a forma fosforilada de CREB, pCREB, em sinaptossomas, citosol, núcleos, mitocôndrias não sinápticas e mitocôndrias sinápticas, utilizando um anticorpo gerado contra os aminoácidos 129-137 de fosfo-CREB.

pg 84

**Figura 34:** Imunorreatividade para a forma fosforilada de CREB em mitocôndrias não sinápticas, mitocôndrias sinápticas, membranas sinaptossomais e sinaptossomas, utilizando um anticorpo gerado contra os aminoácidos 123-126 de fosfo-CREB.

pg **85**

**Figura 35:** Presença de CREB em preparações mitocondriais provenientes de coração, fígado, rins e adrenais de ratas.

pg **85**

**Figura 36:** Microscopia eletrônica das preparações mitocondriais utilizadas. pg **86**

**Figura 37:** Imunorreatividade para proteínas que apresentam localização tipicamente nuclear (cFos, NF- $\kappa$ B) ou encontram-se tipicamente associadas com a reigião sináptica (NMDAR2B, GluR2/3, CaMKII, GAP-43) em frações nucleares, mitocôndrias sinápticas, densidades pós-sinápticas e membranas sinaptossomais.

pg **87**

**Figura 38:** Ensaio de alteração da mobilidade eletroforética (EMSA) em extratos mitocondriais e nucleares, utilizando distintas concentrações proteicas.

pg **88**

**Figura 39:** Ensaio da alteração da mobilidade eletroforética (EMSA) em extratos provenientes de mitocôndrias sinápticas e núcleos.

pg **90**

**Figura 40:** Fosforilação e defosforilação do CREB presente em extratos mitocondriais.

pg **92**

**Figura 41:** presença da subunidade catalítica da PKA em núcleos, mitocôndrias sinápticas e não sinápticas.

pg **93**

**Figura 42:** Tratamento das frações de mitocôndrias sinápticas com NaCl 1M, KSCN 0.5M e Triton 0.5%.

pg **93**

- Figura 43:** Imunocolocalização de CREB em frações mitocondriais cruas. pg **94**
- Figura 44:** Presença de CREB, pCREB, CREB-2 e CREM-1 em mitocôndrias sinápticas e não sinápticas. pg **95**
- Figura 45:** Imunorreatividade para pCREB em amostras provenientes de mitocôndrias sinápticas hipocâmpais, 2 horas após o treino ou choque. pg **98**
- Figura 46:** Imunorreatividade para CREB total em amostras provenientes de mitocôndrias sinápticas hipocâmpais, 2 horas após o treino ou choque. pg **99**
- Figura 47:** Imunorreatividade para pCREB em amostras provenientes de mitocôndrias não sinápticas hipocâmpais, 2 horas após o treino ou choque. pg **100**
- Figura 48:** Imunorreatividade para CREM1 em amostras provenientes de mitocôndrias sinápticas hipocâmpais, 2 horas após o treino ou choque. pg **101**
- Figura 49:** Imunorreatividade para CREB-2 em amostras provenientes de mitocôndrias sinápticas hipocâmpais, 2 horas após o treino ou choque. pg **102**

# IN TRO DU ÇÃO

Esta tese trata de um dos assuntos mais fascinantes que envolve e seduz os seres humanos, assunto este que diz respeito a cada ser vivo neste planeta que tenha a capacidade de poder adquirir e reter informações.

Nossa vida cotidiana depende de nossas lembranças acerca de experiências vividas e da nossa capacidade de recordá-las. Qualquer ato, qualquer decisão, envolve o uso de nossa memória. Que faríamos se não pudéssemos, por exemplo, dirigir o carro que acabamos de comprar, lembrar onde guardamos as chaves da casa, pagar as contas na data do vencimento?

Além da memória para fatos cotidianos relacionadas ao indivíduo como ser único, existe também o que poderíamos chamar de “memória social ou coletiva”, a qual refere-se às lembranças compartilhadas entre grupos de pessoas e que são veiculadas através dos meios de comunicação em massa, fato este, tão sabiamente explorado por Steven Rose, em seu livro “The making of memory”, onde diz: “*os seres humanos, suas mentes e seus cérebros, não são sistemas fechados, mas sim, sistemas abertos*”. Isto quer dizer basicamente que, muito mais do que subjetivas, nossas memórias contém um grandíssimo componente específico da sociedade humana como tal e, sendo assim, grande

parte do conhecimento que possuímos é adquirido através da interação com outras pessoas.

Assim como os seres humanos, os outros animais também vivem de acordo com o que aprendem e recordam de suas experiências. Aprender e recordar parecem ser duas ações indissolavelmente unidas, já que o que recordamos são experiências passadas e as memórias que temos das mesmas é o que nos permite aprender. Esse conjunto de informações adquiridas é o que denominamos memórias e o processo responsável pela sua formação é o que chamamos aprendizagem.

Fica claro, então, que não somos outra coisa mais que memórias. No entanto, é óbvio que todas estas não são iguais. Talvez, a maneira mais clara de distinguir entre distintos tipos de memória, seja aquela que diferencia as mesmas de acordo ao tempo que perduram.

Segundo este critério, as memórias são classificadas em memórias de curta (STM, "short-term memory") e longa (LTM, "long-term memory") duração. As primeiras são aquelas que permanecem armazenadas durante um breve período de tempo (segundos ou minutos), enquanto que as de longa duração caracterizam-se por perdurar durante dias, meses e até mesmo durante toda a vida.

A classificação mencionada no parágrafo anterior pode parecer óbvia e, até mesmo, simplista, mas existem outros tipos de classificações que, ainda que não pareçam tão simples e óbvias, demonstraram ser de extrema utilidade. Existem, por exemplo, memórias que podem ser relatadas ou explicitadas, enquanto que outras não

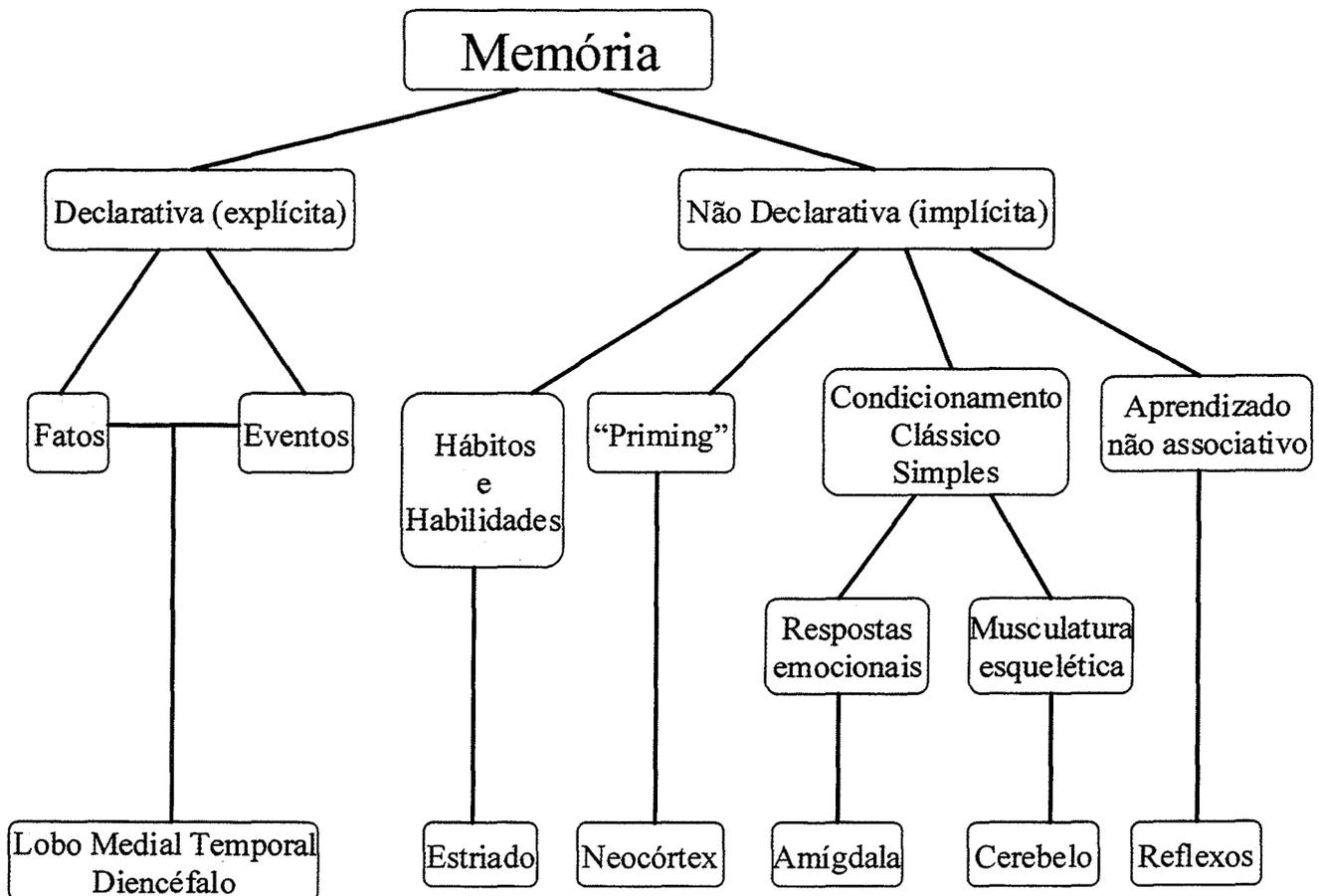
podem ser declaradas conscientemente. As primeiras são as memórias denominadas declarativas, as quais normalmente nos referimos quando usamos termos como “memória” e “lembrar”. Este tipo de memórias incluem as lembranças de fatos, eventos, palavras, objetos, cenas, rostos e dados autobiográficos e são chamadas declarativas porque podem ser acessadas conscientemente e o seu conteúdo pode ser fácil e rapidamente “declarado”, comentado e explicado (Squire, 1992). Quando fazemos comentários como *“o ano passado, nesta mesma época, eu estava na praia”* ou *“o azeite não se mistura com a água, porque são substâncias com propriedades químicas muito distintas”* estamos acessando a nossa memória declarativa, recordando eventos passados ou fatos conhecidos e “declarando” conscientemente à respeito deles.

Os outros tipos de memórias que, como mencionado acima, não podem ser declaradas conscientemente, são denominadas implícitas ou procedurais e referem-se a um conjunto de habilidades que não podem ser explicitadas. Sob esta denominação encontram-se todos aqueles tipos de memória que não tem conexão direta com a consciência e que, normalmente, não podem ser expressas através de palavras. Estes tipos de memórias apresentam características automáticas e reflexivas e são adquiridas, basicamente, através de treinos sucessivos em uma determinada tarefa.

A Figura 1 apresenta um esquema das subdivisões existentes para as duas categorias de armazenamento de informação mencionadas anteriormente.



Figura 1: Tipos de memórias e regiões cerebrais envolvidas na formação das mesmas.



Como pode ser visto no esquema apresentado acima, esta classificação parece possuir um correlato biológico certo, como fica demonstrado pelo fato de que as estruturas participantes no armazenamento de cada um dos diferentes subtipos de memórias não são idênticas. Apesar disto, pareceria ser que os processos bioquímicos envolvidos na transmissão da informação desde o momento em que é percebida pelo animal até o momento no qual é armazenada, são semelhantes.

Desta maneira, o processo de aprendizagem é dividido em três etapas: aquisição, consolidação e evocação.

A aquisição é o processo que, cotidianamente, denominamos aprendizagem. Durante a aquisição de memórias ocorre a formação de relações entre distintos estímulos ou entre estímulos e respostas. Este processo, que pode ser associativo ou não, é muito forte no período inicial. Devido a isto, as experiências recentes são recordadas com muita nitidez, nitidez que decai com o passar do tempo, concomitantemente com o aumento da força e resistência das memórias formadas.

É óbvio que não lembramos de todas as coisas que nos acontecem e, daquelas poucas coisas que lembramos, somente possuímos alguns detalhes. Pareceria ser, então, que a informação inicialmente adquirida sofre um processo progressivo de filtração e fixação, o qual conduz ao armazenamento daqueles traços mnemônicos que contém a informação necessária e suficiente para permitir-nos recordar. Este processo de filtração e fixação recebe o nome de consolidação e é durante este período que as memórias são mais susceptíveis de serem moduladas e/ou associadas com outras memórias.

Já consolidadas, é necessário que estas memórias sejam guardadas de tal forma que possam ser mantidas durante um determinado tempo permitindo, por sua vez, o fácil acesso às informações armazenadas, no momento no qual um dado estímulo ambiental assim o requera.

Atualmente, o (s) lugar (es) onde as memórias armazenadas são guardadas não é (são) conhecido(s). Parece ser que, dependendo do tipo de memória, os locais de armazenamento podem encontrar-se em regiões cerebrais específicas ou ainda, localizar-se de maneira difusa e indefinida. Mas, independentemente de nosso desconhecimento à

respeito do lugar onde guardamos nossas memórias, é indiscutivelmente certo que dependemos de nossas memórias antigas para formar novas lembranças. Portanto, as memórias somente servem se podem ser lembradas, fato este que recebe o nome de evocação. Pouco se sabe à respeito da bioquímica da evocação, em parte, devido a dificuldade que existe em separar experimentalmente esta, do processo de consolidação mencionado anteriormente\*.

Apesar disto, a evocação parece ser um evento independente dos demais. Estudos com pacientes que apresentavam lesões cerebrais, e que podiam evocar lembranças, mas não apresentavam a capacidade de formar novas memórias, sugeriram que os processos relacionados com a evocação de eventos já armazenados utilizavam outros sistemas cerebrais distintos daqueles utilizados nos períodos iniciais do armazenamento e consolidação das informações (Milner e cols., 1998).

Como já mencionado anteriormente, a formação de memórias constitui um aprendizado. Estes, podem ser classificados de diferentes maneiras. Um aprendizado é considerado associativo quando, durante a sua formação, o indivíduo relaciona estímulos ou estímulos e respostas entre si, enquanto que um aprendizado não-associativo não requer nenhuma relação específica.

Como exemplo de aprendizados não-associativos poderíamos mencionar a habituação e a sensibilização. Durante a habituação, o animal modifica sua resposta

---

\* Nota do autor: gostaria de destacar que os paradigmas experimentais de aprendizagem que requerem apenas uma sessão de treino, como o utilizado para a realização desta tese, são ideais para dissecar os processos bioquímicos específicos de cada etapa envolvida durante a formação de memórias.

(geralmente, diminuindo-a) em relação a um determinado estímulo inócuo, após a apresentação constante do mesmo. Ao contrário do que ocorre durante a habituação, um animal está sensibilizado quando responde de maneira exacerbada a um estímulo nocivo.

Como pode ser deduzido do seu nome, durante os aprendizados associativos, o indivíduo aprende através do relacionamento seqüencial e ordenado de fatos, com concomitante avaliação do êxito da resposta comportamental emitida.

O exemplo paradigmático dos aprendizados associativos é o condicionamento clássico (Pavlov, 1927). Este paradigma consiste em apresentar o animal a um estímulo incapaz de provocar, por si só, uma resposta comportamental detectável (estímulo condicionado). A apresentação repetida do estímulo condicionado é acompanhada, sucessiva e repetidamente, pela apresentação de outro estímulo, denominado incondicionado, o qual é capaz de gerar uma resposta quantificável. Após a apresentação pareada dos estímulos condicionado e incondicionado, o animal aprende a emitir a resposta incondicionada ante a apresentação única do estímulo condicionante.

O condicionamento clássico não é o único tipo de condicionamento existente. Existem também os conhecidos como condicionamentos instrumentais. Neste tipos de condicionamentos, o animal utiliza a informação aprendida para evitar receber um castigo ou para obter uma recompensa. Os condicionamentos instrumentais incluem os condicionamentos operantes e os condicionamentos de "prova-erro". Os primeiros referem-se aqueles paradigmas experimentais nos quais o animal é motivado, através de um estímulo desagradável (por exemplo, o medo de determinada situação desconhecida)

a explorar exacerbadamente um determinado ambiente, realizando uma série de atividades motoras, uma das quais será pareada com um estímulo que pode ser negativo ou positivo. Após repetir o treino um determinado número de vezes, o animal aprende a atuar para obter uma recompensa ou evitar um castigo. Já nos condicionamentos de prova-erro, os animais aprendem a executar uma rotina de complexidade variável, durante as quais recebem uma recompensa, no caso de um acerto, ou um castigo, quando erram.

Os condicionamentos instrumentais podem ser ativos ou passivos. São ativos quando o animal emite uma resposta aprendida para evitar ou buscar o estímulo incondicionado; são passivos quando o sujeito experimental aprende a inibir um comportamento inato, com o objetivo de evitar receber um estímulo doloroso ou para receber uma recompensa.

O paradigma experimental de esQUIVA INIBITÓRIA utilizado para a realização dos experimentos desta tese encontra-se classificado dentro deste tipo de condicionamentos.

As áreas das neurociências que contribuíram enormemente para a elucidarções dos processos mnemônicos, são a neurofarmacologia, a neuroanatomia e a neuroquímica. Desta maneira, foi demonstrado que o hipocampo, a amígdala e o córtex associado a estas estruturas, apresentam um papel fundamental no processo de consolidação de memórias, principalmente as do tipo aversivo. O hipocampo é responsável pelo processamento das informações do tipo espacial e contextual (Izquierdo e cols., 1997; Eichenbaum, 1996), enquanto que a amígdala faz o mesmo com a informação emocional

(Izquierdo e cols., 1997). O córtex entorrinal é o encarregado de promover a integração das informações provenientes do hipocampo e da amígdala (Willner e cols., 1993).

Dadas as propriedades apresentadas pelas estruturas mencionadas, não é de estranhar que a potenciação de longa duração (LTP, "long-term potentiation") fosse descrita, pela primeira vez, no hipocampo. Da mesma maneira, as primeiras hipóteses relacionando este fenômeno eletrofisiológico com a formação de memórias, foram referidas a esta estrutura (Cho e cols., 1998).

A LTP é um mecanismo de potenciação sináptica, que depende da atividade. Ocorre rapidamente (milissegundos) e pode durar várias horas ou até mesmo dias (Silva e cols., 1992). Esta potenciação expressa-se como um aumento nos potenciais pós-sinápticos excitatórios, o qual pode registrar-se tanto em populações neuronais como em neurônios individuais. Várias formas de induzir LTP foram descritas, mas a mais clássica delas é a que utiliza um estímulo tetânico na via de interesse.

O sinal para a indução da LTP (pelo menos na região CA1 hipocampal) é dado pela entrada massiva de cálcio, principalmente através dos receptores NMDA (Harvey e Collingridge, 1992). A despolarização necessária para liberar o  $Mg^{2+}$  que bloqueia os receptores NMDA é fornecida pela ação do glutamato ao atuar sobre os receptores AMPA, podendo ser modulada pela ação de outros neurotransmissores que atuem sobre receptores do tipo metabotrópicos.

Após sua indução, a LTP deve ser mantida durante um certo período de tempo. Os primeiros estágios deste processo requerem a participação de diferentes sistemas de

proteínas quinases (PKA, MAPKK, PKC e CaMKII), as quais atuariam modificando o estado de fosforilação de proteínas localizadas no terminal sináptico [receptores AMPA (Cammara e cols.,1998), canais iônicos, fosfolipases, etc.]. Devido à natureza transiente deste tipo de modificação covalente, a manutenção da LTP durante períodos temporais prolongados, parece necessitar alterações mais duradouras. Foi demonstrado que a manutenção da LTP por longos períodos requer a síntese de novas proteínas (Frey e cols., 1988; Otani e cols., 1989; Izquierdo e cols., 1993) e, conseqüentemente, da ativação das vias de transdução de sinais, cuja estimulação conduza a expressão gênica.

Desta forma, foi demonstrado o requerimento das vias ativadas por AMPc e Ras (English e Sweatt, 1997), as quais conduzem a modulação do estado de fosforilação dos fatores de transcrição CREB e ELK1, após a indução de LTP.

Distintas linhas de evidências sugerem fortemente que a LTP é, por si mesma, um claro exemplo de memória (Izquierdo, 1993), ainda que expressada em um nível sináptico-celular, mais que comportamental.

As semelhanças entre a LTP e a memória são várias; em primeiro lugar, a LTP e alguns tipos de memória são associativos (Hawkins, 1993). Além disso, ambas apresentam um período lábil, no qual sua ocorrência pode ser bloqueada (indução e pós-indução para a LTP e consolidação para a formação de memórias; Izquierdo, 1993). Outra importante característica em comum é o longo período temporal durante o qual podem ser mantidas, sem que para isso seja necessária sua expressão (Lynch e Granger, 1992).

Foi também demonstrado que, durante o aprendizado de uma tarefa de discriminação olfativa, ocorre LTP no trato olfativo lateral, estrutura que intervém na formação deste tipo de memórias (Roman, 1987) e que, camundongos mutantes com defeitos enzimáticos específicos, apresentam déficits tanto em sua capacidade de realizar LTP como de formar memórias que dependam da integridade hipocampal (Grant e Silva, 1994).

Da mesma maneira, foi descrito que a infusão intra-hipocampal de APV, um antagonista dos receptores NMDA, em doses que bloqueiam a indução da LTP, também impede o aprendizado de tarefas que requerem a participação do hipocampo (Izquierdo e cols., 1993, 1997).

A hipótese de que a LTP participa nos processos de formação de memórias é reforçada pelo fato de que, em ambos processos, parecem atuar os mesmos sistemas de transdução de sinais, durante lapsos temporais similares.

Devido ao exposto anteriormente, o Centro de Memória do Departamento de Bioquímica da Universidade do Rio Grande do Sul, dirigido pelo Prof. Dr. Iván Izquierdo, iniciou, já há muitos anos atrás, um projeto que tem como objetivo último, elucidar os mecanismos envolvidos na formação de memórias, apresentando como uma das hipóteses de trabalho, a participação da LTP nos processos mnemônicos.



Esta tese de doutorado está incluída no projeto acima mencionado, apresentando como objetivos<sup>ξ</sup>:

1. Avaliar a participação da via bioquímica AMPc/PKA/pCREB durante a fase de consolidação de uma memória do tipo aversivo, priorizando a análise do envolvimento dos sistemas de neuroreceptores dopaminérgicos, serotoninérgicos e adrenérgicos hipocampais, em distintos tempos após o treino em esQUIVA inibitória de apenas uma sessão, utilizando para isto, estudos farmacológicos, bioquímicos e moleculares para determinar o estado de ativação de cada um dos componentes desta cascata bioquímica;
2. Avaliar a participação da via bioquímica MAPK/ELK1 no período de consolidação da memória acima mencionada, centrando-se no estudo do estado de ativação desta cascata em extratos obtidos a partir de núcleos provenientes do hipocampo, com o intuito de relacionar as possíveis alterações decorrentes do aprendizado, com a indução da expressão gênica;
3. Estudar a possível presença do fator de transcrição CREB, especificamente no terminal sináptico, tratando de definir sua localização ultraestrutural no sinaptossoma;

---

<sup>ξ</sup> Introduções referentes a cada um dos assuntos abordados serão apresentadas nos capítulos correspondentes.

4. Relacionar as informações obtidas a partir do mencionado no item 3 com os processos de formação de memórias para a tarefa experimental em questão.

## TREINO E EXPERIMENTOS FARMACOLÓGICOS

### **Materiais e Métodos**

Para os estudos apresentados nesta tese, utilizamos ratos "Wistar" machos de aproximadamente 180 – 210 g de peso corporal. Os animais foram submetidos a um paradigma de aprendizagem conhecido como Esquiva Inibitória (Cammarota e cols., 1995; Bevilaqua e cols., 1997; Bernabeu e cols., 1997; Izquierdo e Medina., 1997).

Com o objetivo de treinar estes animais, utilizamos uma caixa de madeira com a parte frontal de acrílico, com medidas de 50 X 25 X 25 cm, cujo piso consiste de barras metálicas com calibre de 0,1 cm, dispostas paralelamente uma em relação a outra, as quais estão conectadas a uma fonte de energia. Esta caixa, representada na Figura 2, apresenta no seu interior, uma plataforma de 2,5 cm de altura e 7 cm de largura.

Figura 2: Caixa de Esquiva Inibitória.



A sessão de treino consiste em colocar o animal sobre a plataforma mencionada, deixando que explore a mesma livremente; o animal apresenta a tendência de descer da plataforma para explorar todo o ambiente. No momento em que o animal apóia suas quatro patas sobre a grade metálica (ver Figura 1), recebe um choque elétrico de 0,3 mA, durante 3s.

Este paradigma caracteriza-se por permitir, em apenas uma sessão de treino, a formação de uma memória do tipo aversiva. Desta maneira, a partir de uma experiência desagradável, receber um choque ao descer de uma plataforma, o animal aprende a evitar um comportamento inato – o de explorar o ambiente onde se encontra – associando o descer de uma plataforma com o recebimento de um choque elétrico.

Para determinar a especificidade das alterações bioquímicas a serem medidas ou dos agentes farmacológicos a serem testados, planejamos os seguintes grupos controle:

#### Grupo Naive ou Controle absoluto

Consiste de animais que são retirados do biotério e sacrificados imediatamente.

#### Grupo Controle de choque

Consiste de animais que são colocados diretamente sobre a grade metálica da caixa de esquiava inibitória.

Estes animais receberam um choque de igual intensidade e duração que o recebido pelos animais treinados. O objetivo de utilizar este grupo controle foi o de verificar se o choque, por si só, provocava alguma alteração nos parâmetros bioquímicos a serem estudados.

No caso dos experimentos realizados para verificar o efeito de drogas sobre a formação de memórias, as mesmas foram infundidas através de cânulas implantadas na região CA1 do hipocampo dorsal, mediante a utilização de um estereotáxico e de acordo com as coordenadas ( $A - 4.3, L \pm 4.0, V 3.4$ ) de Paxinos e Watson (1986), como está representado na Figura 3.

Figura 3: Estereotáxico utilizado para a implantação das cânulas na região CA1 do hipocampo dorsal.



Após a cirurgia os animais permaneceram entre 4 – 5 dias em período de recuperação, após o qual, foram treinados na tarefa de esQUIVA inibitória mencionada anteriormente.

O efeito das drogas sobre a formação da memória foi verificado em uma sessão de teste, realizada 24 horas após o treino. A diferença entre o tempo que o animal permanece sobre a plataforma na sessão de treino (latência do treino) e o tempo que

permanece sobre a mesma no dia do teste (latência do teste) é o valor utilizado como medida da aprendizagem.

O controle de localização das cânulas foi realizado através da infusão de um corante, azul de metileno, através das mesmas, imediatamente antes do sacrifício. Somente os resultados provenientes de animais que apresentaram uma correta localização das cânulas foram utilizados para a análise estatística.

Drogas infundidas na região CA1 do hipocampo dorsal<sup>φ</sup>:

◆ 8-Br-AMPC	1,25 µg/lado
◆ SKF 38393	7,5 µg/lado
◆ SCH 23390	0,5 µg/lado
◆ Forskolina	0,5 µg/lado
◆ KT 5720	0,5 µg/lado
◆ Noradrenalina	0,3 µg/lado
◆ Timolol	0,3 µg/lado
◆ 8-OH-DPAT	2,5 µg/lado
◆ NAN-190	2,5 µg/lado

---

<sup>φ</sup> O efeito principal das drogas utilizadas nesta tese é apresentado nos capítulos correspondentes a utilização das mesmas.

As drogas foram dissolvidas em salina ou em DMSO 20%. O volume de infusão foi de 0,5 µl/lado. Os controles receberam apenas a infusão de salina ou veículo, dependendo do solvente utilizado para dissolver a droga utilizada para determinado grupo experimental.

## AUTO-RADIOGRAFIA

Os animais foram sacrificados por decapitação, os cérebros removidos e congelados à -70°C. A partir destes cérebros, obtivemos cortes sagitais de 12µM de espessura, os quais foram armados sobre lâminas gelatinizadas. Para analisar a união específica de <sup>3</sup>H-SCH 23390, os cortes foram incubados em tampão Tris-HCl 50 mM contendo <sup>3</sup>H-SCH 23390 4 nM (72,5 Ci/mmol), pH 7,4. Após incubação durante 1 hora à temperatura ambiente, as reações foram interrompidas através de 3 lavagens com tampão 50 mM Tris-HCl, seguidas de duas lavagens com água destilada. Após as lavagens, os cortes foram secados e expostos a um filme sensível ao Trítio durante 13 dias à 4°C.

Os auto-radiogramas obtidos foram analisados mediante a utilização de um densitômetro computadorizado (MCID 5.02 Imaging Research, Toronto, Canadá).

A união inespecífica foi determinada a partir da inclusão, na mistura de reação, de 1 mM SCH 23390.

## DOSAGEM DOS NÍVEIS DE AMPc

Os cérebros foram rapidamente dissecados e submersos em tampão (acetato de sódio 0,5 mM e IBMX 50  $\mu$ M) durante 1 minuto, à 60°C. Logo após, os hipocampus foram isolados, homogeneizados e centrifugados à 12500 rpm durante 10 minutos. O "pellet" foi descartado e os níveis de AMPc foram medidos no sobrenadante, utilizando a técnica de radioimunoensaio descrita por Domino e cols. (1987).

## DOSAGEM DA ATIVIDADE DA FOSFODIESTERASE DEPENDENTE DE AMPc

A atividade da fosfodiesterase dependente de AMPc foi medida através da técnica de Thompson e cols. (1974). As amostras de hipocampo provenientes de animais controles, treinados e expostos ao choque foram incubadas em tampão Tris 80 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 16 mM, AMP 2 mM, AMPc 200  $\mu$ M, contendo 70000 cpm de <sup>3</sup>H-AMPc, durante 10 minutos à 37°C. Após incubação as amostras permaneceram 1 minuto à 100°C e 1ml de uma mistura de resina Dowex W50/ metanol (1/3) foi adicionada à reação. As amostras foram, então, centrifugadas à 3000 rpm durante 15 minutos. Os "pellets" foram descartados e os sobrenadantes utilizados para contagem em um contador de cintilação.



## DOSAGEM DA ATIVIDADE DE PKA

A atividade da enzima dependente de AMPc, foi medida de acordo com o método de Roskoski (1983), utilizando Kemptide como substrato.

Para tal, o hipocampo foi homogeneizado em tampão Tris-HCl 20 mM (pH 7,4), contendo IBMX 0,5 mM, DTT 10 mM, NaF 5 mM, EDTA 10 mM, EGTA 10 mM e uma mistura de inibidores de proteases.

Após a centrifugação à 2800 rpm durante 10 minutos, os "pellets" foram descartados. 10 µl do sobrenadante (2 mg de proteína/ ml) foram incubados à 30°C durante 5 minutos no tampão descrito anteriormente, incluindo Kemptide 30 µM, AMPc 10 mM e [ $\gamma^{32}\text{P}$ ]ATP 200 µM (300 cpm/mmol). As reações foram paradas pipetando alíquotas desta mistura em papéis de fosfocelulose e lavando (3X, 15 minutos cada) estes papéis com ácido fosfórico 75 mM. Os filtros foram secados e contados por cintilação líquida.

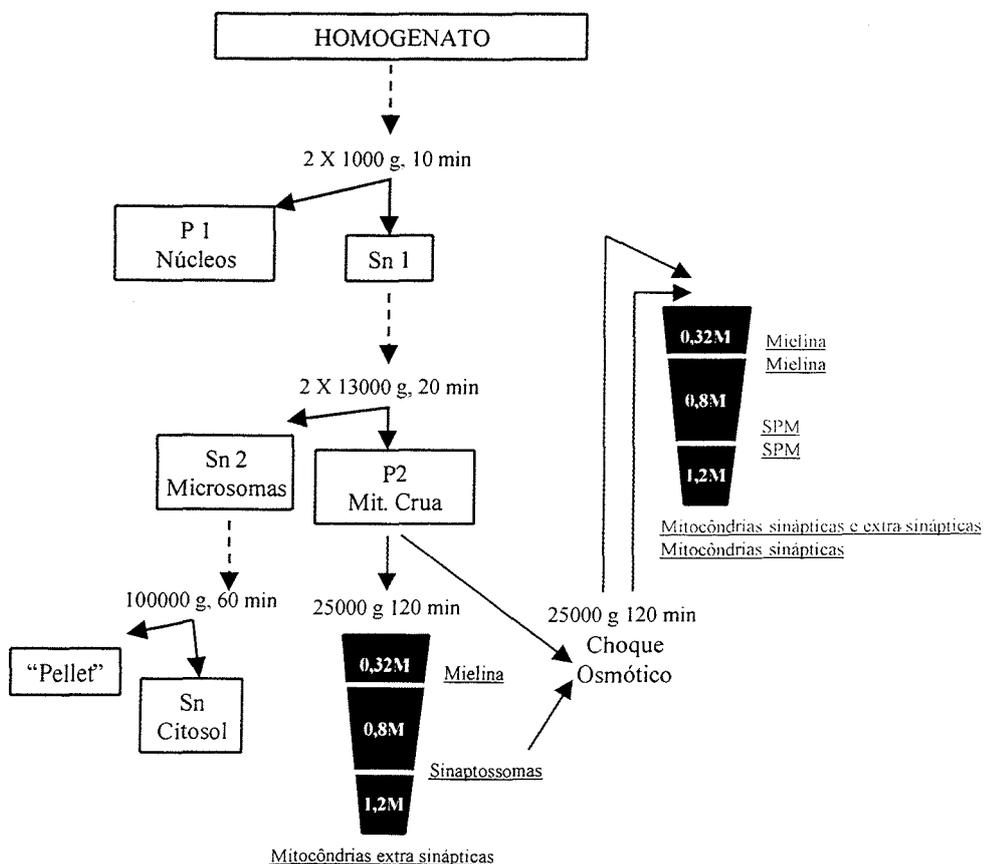
## FRACIONAMENTO SUBCELULAR

Após a dissecação, os hipocampos foram homogeneizados em um tampão composto de sacarose 0,32 M, EDTA 1 mM,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1 mM, PMSF 1 mM, EGTA 1mM, NaF 50 mM, Tris.HCl 20 mM (pH7,4). O homogenato foi centrifugado à 2000g durante 10 minutos. Após esta primeira centrifugação, obtivemos duas frações, uma nuclear crua, correspondente ao "pellet" 1 (P1) e outra solúvel, correspondente ao

sobrenadante 1 (Sn1). O "pellet" 1 foi devidamente congelado para uso posterior e o sobrenadante 1 foi centrifugado à 13000g durante 20 minutos. Após este passo de centrifugação, obtivemos um "pellet" 2 (P2; denominado fração mitocondrial crua) e um sobrenadante 2 (Sn2; denominado fração microsomal), o qual foi congelado (-70°C) para análise posterior.

A partir deste estágio, se o objetivo fosse o de obter sinaptossomas e mitocôndrias sinápticas, prosseguíamos o processo de fracionamento mediante um esquema de duplo gradiente de sacarose; ao contrário, se necessitávamos unicamente a obtenção de membranas sinaptossomais (Spm), o protocolo incluía a passagem do material por apenas um gradiente de sacarose (ver esquema representado na Figura 4).

Figura 4: Fracionamento subcelular.



Para obter a fração subcelular correspondente às densidades pós-sinápticas (Psd), alíquotas de membranas sinápticas (Spm) foram incubadas com Triton X-100 0,5% v/v durante 30 minutos e, após, centrifugadas durante 40 minutos à 100000g. O sobrenadante obtido foi desprezado e o "pellet" utilizado para posterior análise.

A fração citosólica foi obtida a partir do sobrenadante 2 (fração microsomal), através de sua centrifugação à 100000 g durante 1 hora.

Com o objetivo de obter núcleos de maior pureza, o "pellet" 1 (fração nuclear crua) foi ressuspendido em sacarose 0,32 M e centrifugado à 100000 g durante 1 hora através de um colchão de sacarose 2 M, resgatando o "pellet" obtido após a etapa de centrifugação.

Os extratos nucleares e mitocondriais solúveis foram preparados a partir de alíquotas de frações nucleares e mitocondriais. O equivalente a 1 mg de proteínas foi incubado com tampão de extração 2 X (Tris 20 mM, glicerol 24%, NaCl 400 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, DTT 2 mM, PMSF 2 mM, EDTA 0,4 mM, Igepal 1%, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM, NaF 40 mM, pH 7,9) durante 30 minutos e, após, centrifugado 20 minutos à 14000g. Após dializados, os sobrenadantes obtidos foram alíquotados para estudo posterior.

A fração mitocondrial de tecidos como fígado, coração, rins e adrenais foi obtida de acordo com as técnicas de Guerra (1974) e Antkiewicz-Michaluk e cols. (1988).

As concentrações protéicas das frações celulares foram determinadas pelo método de Bradford.

## "SDS-PAGE" E "WESTERN BLOT"

A separação eletroforética das proteínas foi realizada através de técnicas convencionais.

A detecção imunológica das proteínas eletrotransferidas à membranas de PVDF (Cammarota e cols., 1998) foi realizada usando anticorpos específicos para as proteínas a serem detectadas e o sistema de revelação quimioluminescente ECL (Amersham).

Os anticorpos utilizados são apresentados a seguir:

- ◆ anti-CREB (BioLabs): anticorpo que reconhece CREB independentemente do seu estado de fosforilação. Este anticorpo foi produzido contra os aminoácidos 123 –127 de CREB; 1:1,000.
- ◆ anti-pCREB (BioLabs): anticorpo que reconhece especificamente a forma fosforilada em serina 133 de CREB, produzido contra os aminoácidos 129 – 137; 1:1,000.
- ◆ anti-pCREB (gentilmente fornecido por D. Ginty): produzido contra os aminoácidos 123 – 136, também reconhece especificamente CREB fosforilado na serina 133; 1:1,000.
- ◆ anti-NF- $\kappa$ B (p65) (Santa Cruz); 1:1,000.
- ◆ anti-GAP-43 (gentilmente fornecido por B. Oestreicher); 1:10,000.
- ◆ anti- $\alpha$ CAMKII (Chemicon); 1:5,000.
- ◆ anti-NMDAR2B (Chemicon); 1:5,000.
- ◆ anti-GluR2/3 (Chemicon); 1:1,000.
- ◆ anti-CREB-2 (Santa Cruz); 1:10,000.
- ◆ anti-CREM-1 (Santa Cruz); 1:1,000.
- ◆ anti-ATF3 (Santa Cruz); 1:1,000.
- ◆ anti-CREM- $\tau$  (gentilmente fornecido por Sassoni-Corsi); 1:1,1000.

- ◆ anti-PP2B (SIGMA); 1:10,000.
- ◆ anti-PP1 (New England Biolabs); 1:1,000.
- ◆ anti- $\alpha$ PKA (New England Biolabs); 1:5,000.
- ◆ anti-ATF-2 (Santa Cruz); 1:1,000.
- ◆ anti-c-Jun (New England Biolabs); 1:1,000.
- ◆ anti-c-Fos (Santa Cruz); 1:5,000.
- ◆ anti-FRA-1 (Santa Cruz); 1:5,000.
- ◆ anti-FRA-2 (Santa Cruz); 1:5,000.
- ◆ anti-p44/p42 (New England Biolabs); 1:1,000.
- ◆ anti-fosfo p44/p42 (New England Biolabs); 1:1,000.
- ◆ anti-ELK1 (New England Biolabs); 1 ;1000.
- ◆ anti-fosfo ELK1 (New England Biolabs); 11000.

## ENSAIO DE RETARDO DA MOBILIDADE ELETROFORÉTICA (EMSA OU "GEL-SHIFT")

Os oligonucleotídeos utilizados foram:

- ◆ oligonucleotídeo contendo o sítio de ligação de CREB ao DNA: 5'-AGAGATTGCCT**TGACGTC**AGAGAGCTAG-3' (Promega). A sequência consenso está indicada em negrito.
- ◆ oligonucleotídeo contendo o sítio de ligação de CREB ao DNA mutado: 5'-TG**ACGTC**A-3' (Santa Cruz), no qual o par de bases AC foi substituído por TG (AC→TG).

- ♦ oligonucleotídeo correspondente ao sítio de ligação ao DNA do fator de transcrição AP1: 5'-CGCTTGATGAGTCAGCCGGAA-3' (Promega).
- ♦ oligonucleotídeo correspondente ao sítio de ligação ao DNA do fator de transcrição geral TFIID: 5'-GCAGAGCATATAAGGTGAGGTAGGA-3' (Promega).

Primeiramente, as sondas foram marcadas radioativamente com  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ : 2,75 pmoles de oligonucleotídeos foram incubados com 5 – 10 U da enzima T4 polinucleotídeo quinase em um volume de reação final de 10  $\mu\text{l}$  contendo Tris-HCl 70 mM (pH 7,6),  $\text{MgCl}_2$  10 mM, DTT 5mM e 3,33 pmoles de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  (3,000 Ci/mmol; 10 mCi/ml) durante 10 minutos à 37°C. As reações de fosforilação foram paradas com 1  $\mu\text{l}$  de EDTA 0,5 M e, às mesmas, adicionou-se um volume de 75  $\mu\text{l}$  de tampão contendo Tris-HCl 10 mM (pH 7,8) e EDTA 1 mM. Imediatamente após, as reações foram passadas através de uma coluna de poliacrilamida (Micro Bio-Spin, BioRad), para separar a sonda marcada dos demais componentes da reação.

As reações de união específica (reações de "binding") foram realizadas da maneira descrita a seguir: cada tubo de reação continha uma massa específica de proteína e entre 0.5-1 ng de sonda marcada, dissolvidas em um tampão contendo Tris-HCl 5 mM (pH 7,5), glicerol 4%,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, EDTA 0,5 mM, DTT 0,5 mM, NaCl 50 mM e 0,25 mg/ml poly (dI-dC)•(dI-dC) em um volume final de 10  $\mu\text{l}$ . Após incubação durante 20 minutos à temperatura ambiente, as amostras foram separadas eletroforéticamente em gel de poliacrilamida (6%) não-desnaturante em tampão TGE [Tris-Glicina 50 mM (pH

7,5), EDTA 1 mM]. Após o término da corrida eletroforética, o gel foi secado e exposto durante 12 – 36 horas a filme sensível (AGFA).

Nos ensaios para verificar a especificidade da reação de ligação ao DNA, um excesso de sonda CRE ou CRE mutada, não marcada (25 – 30 ng), foi adicionado à reação de união específica, 10 minutos antes da adição da sonda marcada.

### EXPERIMENTOS DE SUPER-DESPLAÇAMENTO (“SUPERSHIFT”)

A técnica de EMSA permite, além de identificar a atividade de proteínas que unem-se a determinadas regiões do DNA, identificar qual (ou quais) proteína (s) está (ão) ligando-se a uma determinada seqüência em particular. A variação da técnica de EMSA, denominada "supershift", é realizada mediante a incubação de um anticorpo juntamente com a reação de união específica descrita anteriormente. Neste caso, se alguma das proteínas presentes no complexo proteína/DNA é reconhecida pelo anticorpo adicionado, um retardo na mobilidade deste complexo será observado após separação eletroforética. Se a proteína reconhecida pelo anticorpo não está presente no complexo proteína/DNA, a adição do anticorpo à reação não apresentará nenhum efeito na mobilidade eletroforética do complexo.

Os experimentos de “supershift” foram realizados a partir da pré-incubação da reação de “binding” com 1 – 1,5 µl de anticorpo durante 30 minutos à temperatura ambiente, seguidas da adição da sonda marcada e posterior incubação e eletroforese em gel de poli-acrilamida não desnaturante.

## DOSAGEM DA ATIVIDADE DE CaMKs (QUINASES DEPENDENTES DE Ca<sup>2+</sup>/CALMODULINA)

Os ensaios foram realizados em extratos nucleares de hipocampo (5 µg de proteína/reação), utilizando Syntide-2 como substrato. A mistura de reação continha, em um volume final de 25 µl, Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), acetato de Magnésio 10 mM, PKI (inibidor da PKA) 4 µM, PKC<sub>19-36</sub> (inibidor da PKC) 5 µM, Albumina 1 mg/ml, NaF 20 mM, [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]ATP 60 µM (3500 cpm/pmol) e Syntide-2, 40 µM.

Com o objetivo de determinar a atividade total das CaMKs, adicionamos CaCl<sub>2</sub> 1 mM e Calmodulina 5 µM à mistura de reação; para medir a atividade Ca<sup>2+</sup> independente, adicionamos EGTA 5 mM à mistura mencionada. Após 2 minutos de incubação à 30°C as reações foram detidas através da retirada de 10µl da amostra, os quais foram pipetados sobre filtros de fosfocelulose. Estes filtros foram lavados (3X de 15 minutos cada) com ácido fosfórico 75 mM e, após, secados e contados utilizando cintilação líquida.

## DOSAGEM DA ATIVIDADE DAS MAPKs

A atividade das MAPKs foi medida em extratos nucleares obtidos a partir do hipocampo. Com esse objetivo, imunoprecipitamos as MAPKs ativadas, presentes nas nossas amostras (50µg de proteína), com um anticorpo específico acoplado à agarose



(New England Biolabs; diluição 1:1,000). Após lavar os imunoprecipitados, os mesmos foram ressuspensos em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) contendo ATP 100  $\mu$ M e 200 ng da proteína ELK1 recombinante. Após 15 minutos de fosforilação à 30°C, as reações foram paradas e seu produto analisado por SDS-PAGE, seguido de "Western Blot" com um anticorpo capaz de detectar especificamente a forma fosforilada em serina 383 de ELK1.

## ELETROMICROSCOPIA E IMUNOELETROMICROSCOPIA

A análise eletromicroscópica das diferentes frações subcelulares obtidas a partir do hipocampo de ratos foi realizada como descrito por De Robertis e cols. (1962). Para isto, utilizamos um microscópio eletrônico Zeiss EM 10 C. A imunoeletromicroscopia foi realizada de acordo com Liu e Jones (1996).

**Envolvimento  
das vias  
bioquímicas**

**AMPc/  
PKA/  
pCREB**

e

**MAPK/  
ELK1**

**durante o  
aprendizado  
para a tarefa  
de esquivar  
inibitória**

Os eucariotos desenvolveram um elaborado sistema de transmissão de sinais intracelulares, através dos quais, estímulos extracelulares (representados por íons, hormônios e outras moléculas sinalizadoras) são convertidos na informação necessária para regular os processos celulares internos. Os mecanismos envolvidos na transdução de sinais incluem cascatas bioquímicas de fosforilação (nas quais proteínas quinases são ativadas ou desativadas por meio de fosforilação e/ou desfosforilação), cascatas bioquímicas proteolíticas (nas quais moléculas biologicamente ativas são formadas a partir de precursores inativos) e sistemas baseados em segundos mensageiros não protéicos, como é o caso dos fosfolipídeos, do  $Ca^{2+}$  e de alguns nucleotídeos cíclicos.

A via bioquímica AMPc/PKA/pCREB é um paradigma das vias de transdução de sinais. O AMPc é um segundo mensageiro intracelular responsável pela propagação de inúmeros sinais iniciados por hormônios, fatores de crescimento e neurotransmissores e apresenta um papel central na regulação de vários aspectos da transmissão sináptica. O AMPc regula, entre outros eventos intracelulares, o estado metabólico geral dos neurônios, a organização do citoesqueleto, o crescimento/diferenciação neuronal e a expressão gênica.

A maioria dos componentes desta via de transdução de sinais são conhecidos e bem caracterizados. A ligação de neurotransmissores, hormônios e fatores de crescimento aos seus receptores específicos, localizados nas membranas plasmáticas celulares, provoca a ativação de proteínas G ("GTP binding proteins") acopladas a esses receptores. As proteínas G, por sua vez, estimulam a ativação da enzima adenil ciclase (AC), responsável pela síntese do AMPc. O AMPc ativa uma proteína quinase dependente de AMPc, PKA, a qual atua fosforilando substratos específicos.

A sinalização mediada pelo AMPc é transitória. A finalização do sinal pode ser efetuada através da regulação negativa dos receptores associados ao agonista (mecanismos de dessensibilização, Chuang e cols., 1996) ou através da ação de fosfodiesterases (PDE; enzimas que degradam o AMPc), inibidores da PKA ou fosfatases.

A enzima PDE provoca a diminuição dos níveis de AMPc intracelulares através da hidrólise do AMPc, originando o composto 5'-fosfato de adenosina, biologicamente inativo. Várias isoformas desta enzima foram descritas, inclusive subtipos originados a partir de "splicing" alternativo. A atividade destas proteínas pode ser regulada por AMPc e GMPc (Conti e cols., 1995) e está intimamente relacionada com a modulação de sinais iniciados pelo AMPc em tecidos nos quais uma alta atividade basal de ACs foi observada (Houslay e Milligan, 1997).

Classicamente, os receptores acoplados a proteínas G apresentam um domínio N-terminal extracelular, sete domínios que atravessam a membrana plasmática (conectados

por três alças polipeptídicas extra e intracelulares) e um domínio C-terminal intracitoplasmático (Samama e cols., 1993). A ligação de um agonista a um receptor acoplado à proteína G promove a estabilização do receptor em uma conformação ativa que, por sua vez, promove a dissociação das proteínas G em subunidades  $\alpha$  e  $\beta\gamma$ . Estas subunidades são responsáveis pela modulação da atividade de moléculas efetoras, como por exemplo, ACs, fosfolipases, PDEs e canais iônicos para  $\text{Ca}^{++}$  ou  $\text{K}^+$ . A atividade destas enzimas efetoras e canais iônicos regula a concentração intracelular de segundos mensageiros, responsáveis pela resposta celular ao agonista.

As ACs são ativadas por subunidades  $G\alpha$  estimulatórias ( $G\alpha_s$ ), liberadas após a ligação do agonista ao receptor acoplado a uma proteína G. Até a presente data foram descritas nove isoformas de enzimas ACs, cada qual sendo produto de um gene específico (Iyengar, 1993).

As ACs expressam-se de maneira diferencial, o que pode influenciar a quantidade de AMPc sintetizada nos diferentes tecidos como consequência de estímulos específicos, permitindo uma grande variedade de respostas celulares (Houslay e Milligan, 1997).

O AMPc, por sua vez, liga-se à proteína quinase dependente de AMPc (PKA), ativando-a. A enzima PKA, passo fundamental desta via bioquímica, é uma serina/treonina quinase que está composta, na sua forma inativa, de duas subunidades catalíticas (C) e duas regulatórias (R). O AMPc liga-se às subunidades R, liberando e ativando as subunidades C. A PKA apresenta inúmeros substratos intracelulares (canais

iônicos, elementos do citoesqueleto e enzimas; Habener, 1995) e entre eles encontra-se o fator de transcrição CREB ("cyclic AMP responsive element binding protein").

A proteína CREB participa de eventos de sinalização intracelular que regulam uma grande variedade de funções biológicas, incluindo a proliferação pituitária (Struthers e cols., 1991), regulação dos ritmos circadianos (Ginty e cols., 1993) e formação de memórias (Silva e cols., 1998). Localiza-se principalmente no núcleo celular, onde atua promovendo a transcrição de genes que apresentam uma sequência que responde ao estímulo por AMPc (CRE; "cyclic AMP responsive element"; TGACGTCA) nos seus promotores.

Aumentos nas concentrações de AMPc ou de  $Ca^{2+}$  podem dar início a eventos que culminam com a fosforilação de CREB na sua serina 133, passo fundamental para a ativação deste fator de transcrição. Por exemplo, a ativação da enzima AC por receptores serotoninérgicos e/ou dopaminérgicos do tipo D1 e D5, pode provocar um aumento nos níveis de AMPc; este, por sua vez, ativa a enzima PKA, possibilitando a translocação nuclear das subunidades C, as quais atuam fosforilando CREB na serina 133 (Gonzalez e Montminy, 1989).

O CREB pertence a uma família de fatores de transcrição denominada CREB/ATF, a qual está representada por, no mínimo, 10 produtos gênicos distintos. Este grupo de proteínas apresenta muitas variações funcionais e estruturais entre si e são encontradas em muitas linhagens celulares e tecidos animais (Landschulz e cols., 1988).

A ativação transcricional mediada por CREB depende da presença de uma proteína nuclear denominada CBP ("CREB binding protein"). CBP liga-se especificamente à forma fosforilada de CREB, permitindo o início da transcrição (Chrivia e cols., 1993). A desfosforilação de CREB por fosfatases, como as enzimas PP1 e PP2A (Bito e cols., 1996), bem como a fosforilação da serina 142 de CREB pela enzima CaMKII consistem em mecanismos que regulam negativamente a atividade de CREB (Ghosh e Greenberg, 1995).

As proteínas pertencentes a família de fatores de transcrição CREB/ATF apresentam, em sua estrutura, domínios para ativação da transcrição e regiões básicas que permitem a dimerização e a ligação ao DNA, as quais são responsáveis pela ligação com a seqüência CRE. Estas seqüências existem em um grande número de promotores gênicos, incluindo os genes para os fatores de transcrição c-fos (Sassoni-Corsi e cols., 1988) e zif 268 (Sakamoto e cols., 1991), para sinapsina I (Sauerwald e cols., 1990), para um canal de K<sup>+</sup> (Mori e cols., 1993) e para a subunidade  $\alpha$  da enzima CaMK II (Olson e cols., 1995). Nos neurônios hipocâmpais, a expressão de vários destes genes é modificada pela atividade neuronal.

O domínio relacionado com a ativação transcricional contém regiões ricas em glutamina, as quais encontram-se localizadas em ambos lados de um domínio de fosforilação ("P-Box"). Este domínio contém sítios consenso para várias quinases (entre elas PKA, RSK2, PKC, caseína quinases, CaMKs, glicogênio sintetase 3, p34<sup>cdc2</sup> e

p70<sup>s6k</sup>; Brindle e cols., 1993; Sassone-Corsi, 1995) e é o responsável pela modulação da atividade de CREB.

Várias evidências demonstraram o envolvimento do fator de transcrição CREB na formação de memórias de longa duração. Os primeiros estudos realizados para decifrar o papel desta proteína na formação de memórias foram realizados em *Aplysia*. Primeiramente, oligonucleotídeos contendo seqüências CRE foram injetados nos neurônios pré-sinápticos de um cultivo neuronal deste molusco (Dash e cols., 1990). Esta preparação é utilizada para estudar a modulação sináptica responsável pela sensibilização dos reflexos motores neste animal (Dash e cols., 1990; Alberini e cols., 1994). A injeção de oligonucleotídeos no núcleo pré-sináptico bloqueou especificamente a sensibilização de longa duração (LTF; "long term facilitation"), mas não apresentou nenhum efeito sobre a sensibilização de curta duração (STF; "short term facilitation") para este paradigma experimental.

Também a partir de estudos realizados em *Aplysia*, Kaang e cols. (1993) demonstraram que a injeção de um gene, contendo em seu promotor uma seqüência CRE, nos neurônios sensoriais, permite a ativação deste gene após a indução experimental de LTF. Complementando e corroborando os resultados encontrados por Dash e cols. (1990) e Kaang e cols. (1993), Bartsch e colaboradores, em 1995, identificaram proteínas semelhantes à CREB no molusco *Aplysia*.

Estudos realizados com a mosca de frutas *Drosophila* também apontam um envolvimento de CREB durante a formação da memória de longa duração para um

aprendizado olfativo. Tully (1991) desenvolveu moscas deficientes para a atividade de duas enzimas fundamentais na via bioquímica de ativação de CREB: Duncce, moscas deficientes para a atividade da enzima AC e Rutabaga, moscas deficientes para a atividade da PDE. Em ambos casos, observou-se deficiências para o aprendizado olfativo de longa duração, quando as moscas eram treinadas e testadas 24 h depois, mas nenhum efeito foi observado poucas horas após o treino.

Em 1994, o grupo de Yin e colaboradores descreveu a inativação de CREB, após a expressão de um gene que codifica uma forma repressora da transcrição mediada por esta proteína (dCREB2-b). A indução do repressor de CREB antes do treinamento impossibilitou a formação de memória de longa duração, mas manteve intacta a memória de curta duração ou uma memória de duração intermediária, denominada memória resistente a anestesia (“anesthesia resistant memory”). Em ratos, diversas evidências associaram a função de CREB com alterações sinápticas de longa duração e, talvez, a mais impactante delas seja a relacionada com a obtenção de uma linhagem de animais mutantes para o gene CREB (CREB<sup>Δ</sup>; Hummler e cols., 1994). Estes animais foram testados (Bourchuladze e cols., 1994; Kogan e cols., 1996) em três paradigmas experimentais distintos, todos dependentes da função hipocampal: condicionamento ao medo (“contextual fear conditioning”; Dickinson & Mackintosh, 1978), teste do labirinto de Morris (“Water maze”; Morris, 1981) e transmissão social de preferências alimentares (“social transmission of food preferences”; Galef & Wigmore, 1983). Os mutantes apresentaram deficiência para a formação de memória de longa duração



quando foram treinados nos testes de aprendizagem citados, ao contrário do que aconteceu com a memória de curta duração, que permaneceu inalterada. As evidências provenientes de pelo menos três modelos animais distintos, as quais relacionam CREB com as alterações de longa duração que subjacem os processos de formação de memórias, sugerem uma participação central deste fator de transcrição na indução da síntese protéica associada a alterações estruturais de longa duração.

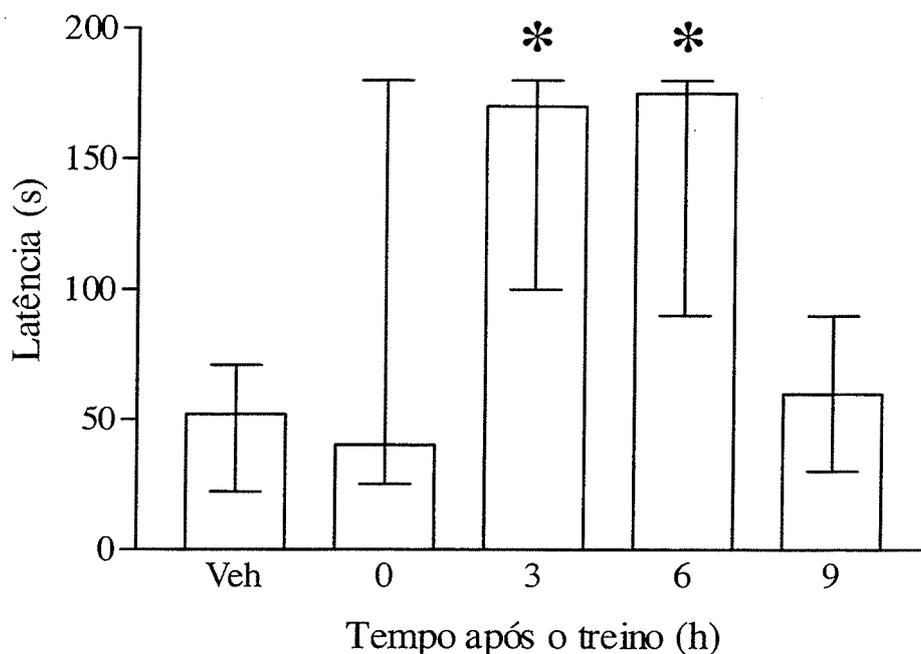
A primeira parte dos estudos apresentados neste capítulo tiveram como objetivo definir o papel que vários constituintes da via bioquímica AMPc/PKA/pCREB apresentam sobre a formação de uma memória aversiva.

Primeiramente, decidimos verificar se a administração de um análogo do AMPc, 8-Br-AMPc, injetado bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal, poderia exercer alguma ação sobre a fase de consolidação de uma memória aversiva. Para estes experimentos, utilizamos grupos de animais treinados na tarefa de esquiiva inibitória e grupos de animais controles. Os animais receberam a infusão da droga (1,25 µg/lado) ou de salina (veh) imediatamente (0), 3, 6 e 9 horas após o treino.

Como é possível observar na Figura 5, a administração de 8-Br-AMPc na região CA1 do hipocampo dorsal, facilita a aquisição da memória para a tarefa de esquiiva inibitória quando administrado 3 ou 6 horas após o treino (\* $p < 0,001$ ; Kruskal-Wallis seguido do teste de Mann-Whitney U;  $n=10-12$  animais por grupo experimental).

Nenhuma alteração na latência do teste foi observada quando a droga foi administrada imediatamente (0) ou 9 horas após o treino.

Figura 5: Efeito da administração de 8-Br-AMPC na região CA1 do hipocampo dorsal 0, 3, 6 e 9 horas após o treino. Veh=veículo; \*p<0,001.



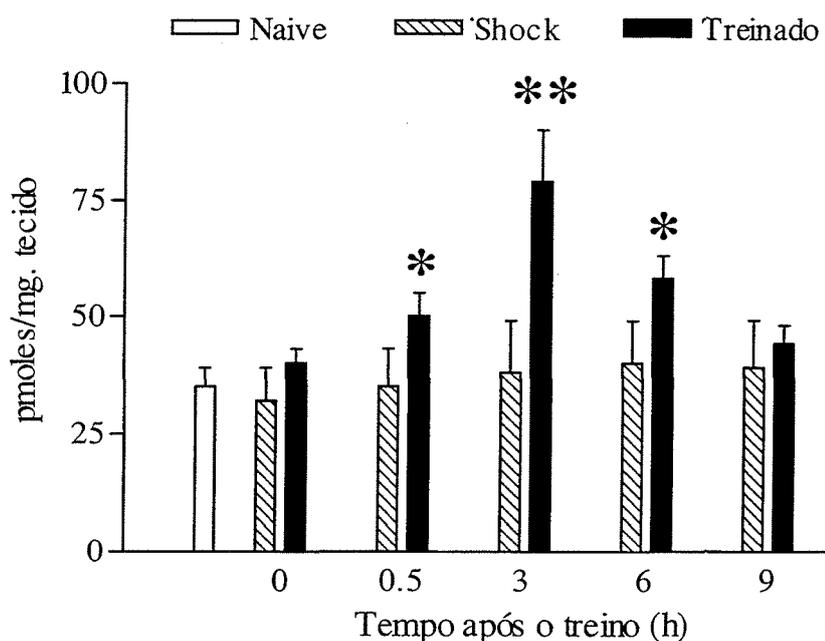
Estes resultados indicam que o AMPc hipocampal participa dos estágios tardios da consolidação da memória para esta tarefa, principalmente entre 3 e 6 horas após o treino dos animais em esquila inibitória.

O passo a seguir foi verificar os níveis endógenos de AMPc no hipocampo de animais treinados, quando comparados com animais controles e animais que receberam apenas choque.

A Figura 6 representa o efeito do treinamento ou do choque ("shock") sobre os níveis de AMPc hipocampais, quando comparados com os animais controles. Como pode ser observado, os níveis de AMPc encontram-se aumentados 30 min (41% de

aumento em relação ao controle), 3 horas (130%) e 6 horas após o treino (64%) após o treino, retornando aos níveis controles 9 horas após (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; ANOVA seguida do teste de Tukey-Kramer;  $n = 6-9$  animais por grupo experimental).

Figura 6: Níveis endógenos de AMPc no hipocampo 0, 0.5, 3, 6 e 9 horas após o treino. Naive=controle absoluto, "Shock"=controle de choque; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .



Os animais que receberam apenas choque não diferiram significativamente dos animais controle (Naive).

Estes resultados apresentam um curso temporal semelhante ao observado quando a droga 8-Br-AMPc foi administrada intra-hipocampalmente, sugerindo que a via bioquímica sinalizada pelo AMPc, no hipocampo, é importante para a fase tardia, mas não para a fase inicial, da consolidação da memória para esta tarefa.

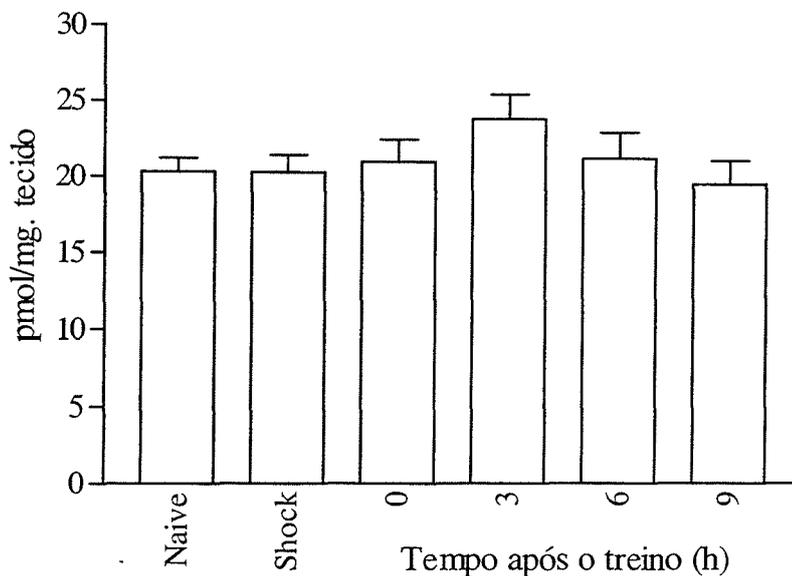
Para verificar se as alterações nos níveis hipocampais de AMPc estavam relacionadas com alterações na atividade da enzima PDE, a atividade desta enzima foi

medida tanto em animais treinados e sacrificados imediatamente (0), 3, 6 e 9 horas após o treino como em animais expostos apenas ao choque ("shock").

Como pode ser visto na Figura 7, a atividade da PDE não apresentou alterações significativas nos grupos experimentais analisados (n = 6-8 animais por grupo experimental).

Figura 7: Atividade da enzima fosfodiesterase no hipocampo 0, 3, 6 e 9 horas após o treino.

Naive=controle absoluto, "Shock"=controle de choque.



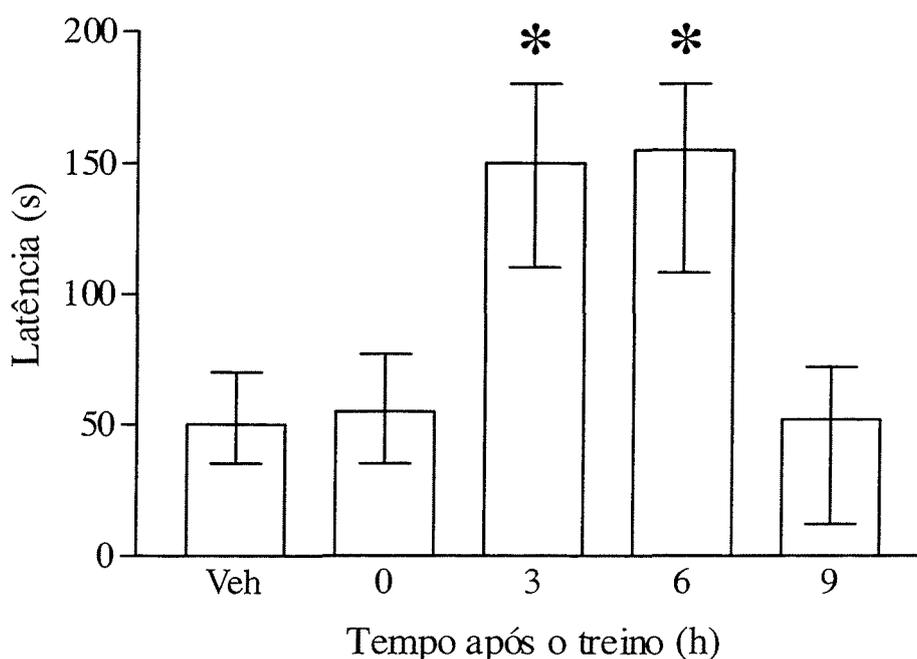
Estes resultados indicam que, pelo menos durante as primeiras 9 horas após o treino, na região CA1 hipocampal, não ocorre um aumento do catabolismo do AMPc devido a atividade da enzima PDE.

Para verificar se algum outro componente da via AMPc/PKA/pCREB participava da fase de consolidação da memória para esta tarefa, examinamos o efeito da droga

forskolina, um ativador da enzima AC, quando a mesma foi administrada bilateralmente na região CA1 do hipocampo, imediatamente (0), 3, 6 e 9 horas após o treino.

Como pode ser observado na Figura 8, a administração de forskolina (0,5 µg/lado) provocou facilitação da memória para esta tarefa quando infundida 3 e 6 horas após o treino (\* $p < 0,001$ ; Kruskal-Wallis seguido do teste de Mann-Whitney U;  $n = 9-12$  animais por grupo experimental). Nenhum efeito foi observado imediatamente ou 9 horas após o treino, quando os resultados foram comparados aos obtidos para os controles (veh).

Figura 8: Efeito da administração de forskolina na região CA1 hipocampal 0, 3, 6 e 9 horas após o treino. Veh=veículo; \* $p < 0,001$ .



O efeito da forskolina sobre a aquisição da memória apresentou um curso temporal bastante similar ao observado para o AMPc, reforçando a suposição de que mecanismos hipocampais regulados pelo AMPc são importantes para um aprendizado

aversivo. Como mencionado anteriormente, a estimulação da atividade da enzima AC provoca um aumento nos níveis do AMPc e, conseqüentemente, a ativação da enzima PKA.

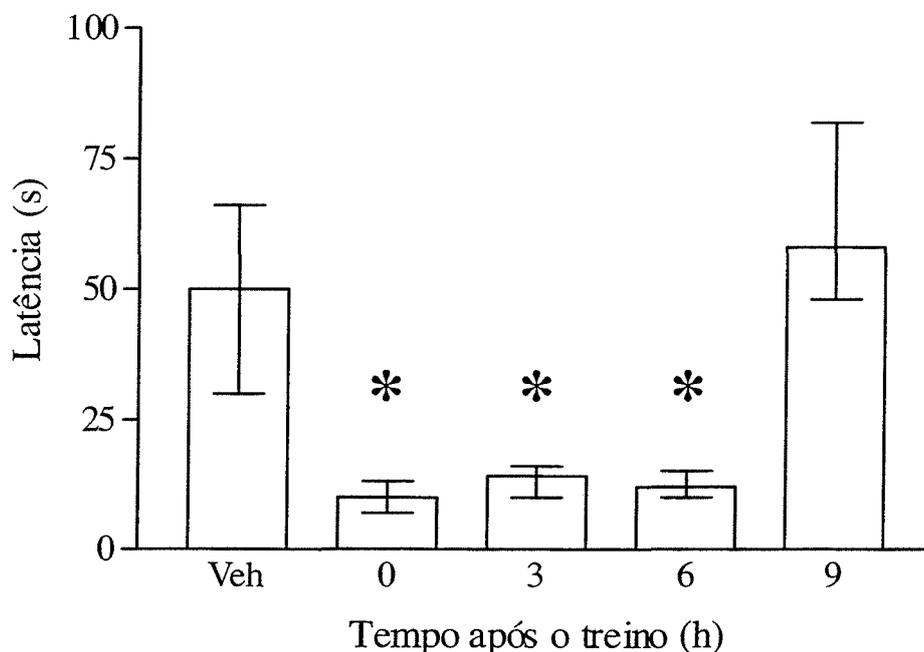
Para determinar de maneira mais direta o papel da PKA nos processos de formação de memórias, examinamos os efeitos produzidos por um inibidor específico da subunidade catalítica desta enzima, KT 5720, quando injetado na região CA1 do hipocampo dorsal a distintos tempos após o treino.

Como demonstrado na Figura 9, a infusão bilateral de KT 5720 (0,5 µg/lado) na região CA1 do hipocampo, provocou amnésia retrógrada quando administrada imediatamente (0), 3 ou 6 horas pós-treino (\* $p < 0,001$ ; Kruskal-Wallis seguido do teste de Mann-Whitney U;  $n=10-11$  animais por grupo experimental; veh=grupo controle). Nenhum efeito foi verificado quando a administração foi realizada 9 horas após o treino.

Os resultados acima mencionados são consistentes com os efeitos provocados pela administração de 8-Br-AMPc e forskolina na fase tardia da formação de memória para esta tarefa.

No entanto, parece ser que a ativação da PKA hipocampal também é necessária para a fase inicial da formação de memória para este aprendizado aversivo, já que o efeito amnésico também foi observado quando a atividade desta enzima foi inibida imediatamente após o treino.

Figura 9: Efeito da administração de KT5720 na região CA1 do hipocampo dorsal 0, 3, 6 e 9 horas após o treino. Veh=veículo; \*p<0,001.

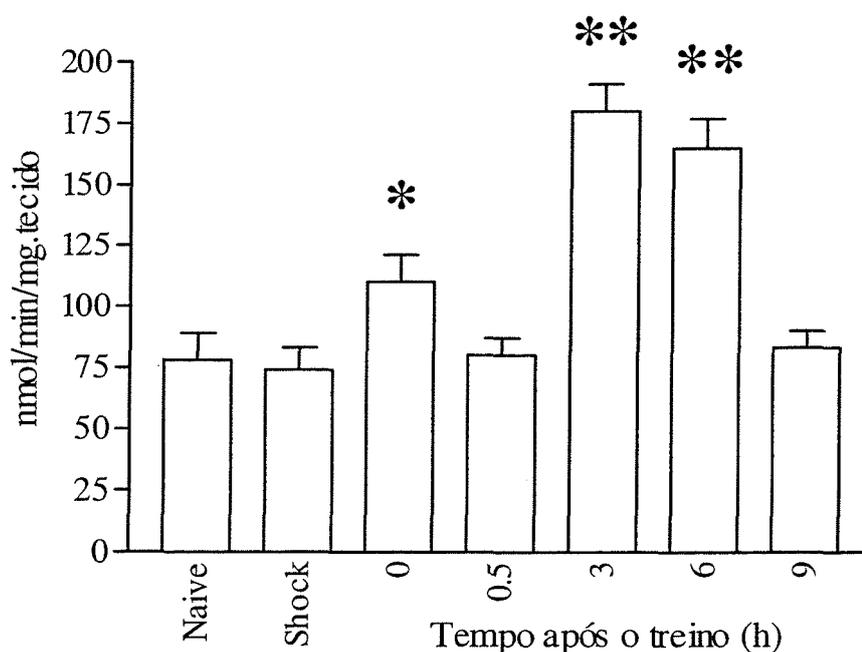


Se a ativação da PKA é realmente necessária para a consolidação da memória para esta tarefa aversiva, poderíamos esperar que animais treinados em esQUIVA inibitória apresentassem um incremento na atividade desta enzima. Para verificar esta hipótese, medimos a atividade da enzima PKA em preparações provenientes do hipocampo de animais controles, treinados e animais que receberam apenas choque. A Figura 10 representa os resultados obtidos quando os animais treinados ou expostos ao choque foram sacrificados imediatamente (0), 0,5, 3, 6 e 9 horas após o tratamento recebido.

Como demonstrado, a atividade de PKA encontra-se aumentada imediatamente (0), 3 e 6 horas após o treino em esQUIVA inibitória (\*p<0,01; \*\*p<0,001; ANOVA seguida do teste de Tukey-Kramer; n=7). Os valores apresentados pelo grupo controle

de choque não diferem significativamente dos valores obtidos para o grupo controle absoluto.

Figura 10: Atividade da enzima PKA no hipocampo de animais treinados e sacrificados imediatamente, 0,5, 3, 6 e 9 horas após o treino. Naive=controle absoluto, "Shock"=controle de choque. \* $p < 0,01$ ; \*\* $p < 0,001$ .



Estes resultados sugerem que o efeito observado nos animais treinados é específico do aprendizado associativo envolvido na aquisição de memória para esta tarefa, já que o choque, por si só, não provoca nenhuma alteração significativa na atividade enzimática da PKA.

O hipocampo é invadido por vias dopaminérgicas, serotoninérgicas e noradrenérgicas e, conseqüentemente, os receptores 5HT1A, D1 e  $\beta$ -adrenérgicos são encontrados nesta estrutura (Nieuwenhuys, 1985; Siegel e cols., 1994).



Os receptores 5HT1A atuam através da inibição da enzima AC, enquanto que os receptores dopaminérgicos e  $\beta$ -adrenérgicos promovem sua ativação. Como visto no início deste capítulo, a enzima AC é um componente fundamental da via bioquímica mediada pelo AMPc. Devido ao importante efeito modulatório que estas vias e receptores apresentam sobre as emoções e o humor (Beninger e cols., 1996), decidimos estudar o efeito destes diferentes sistemas neuronais sobre o aprendizado de nossa tarefa aversiva.

Para verificar a participação dos receptores D1/D5 no processo de aquisição de memória para o nosso paradigma experimental, verificamos o efeito produzido por um agonista e um antagonista D1/D5 dopaminérgicos, quando administrados imediatamente (0), 3, 6 e 9 horas após o treino. O agonista D1/D5, SKF 38393 (7,5  $\mu$ g/lado) foi administrado bilateralmente na região CA1 do hipocampo, nos tempos mencionados acima.

A administração desta droga provocou facilitação da memória quando injetada 3 ou 6 horas após o treino (Figura 11; \* $p < 0,002$ ; Kruskal-Wallis seguido do teste de Mann-Whitney U;  $n=10-12$  animais por grupo experimental; veh=grupo controle), mas não apresentou nenhum efeito quando infundida imediatamente ou 9 horas após.

Ao contrário do efeito provocado pelo agonista, o antagonista dopaminérgico SCH 23390 (0,5  $\mu$ g/lado) provocou amnésia quando administrado 3 ou 6 horas após o treino em esQUIVA INIBITÓRIA (Figura 12; \* $p < 0,002$ ; Kruskal-Wallis seguido do teste de Mann-Whitney U;  $n=10-12$  animais por grupo experimental; veh=grupo controle).

A memória para esta tarefa aversiva não sofreu alterações quando o antagonista foi administrado imediatamente ou 9 horas após o treino.

Figura 11: Efeito da administração intra-hipocampal do agonista dopaminérgico SKF 38393 0, 3, 6 e 9 horas após o treino. Veh=veículo. \* $p < 0,002$ .

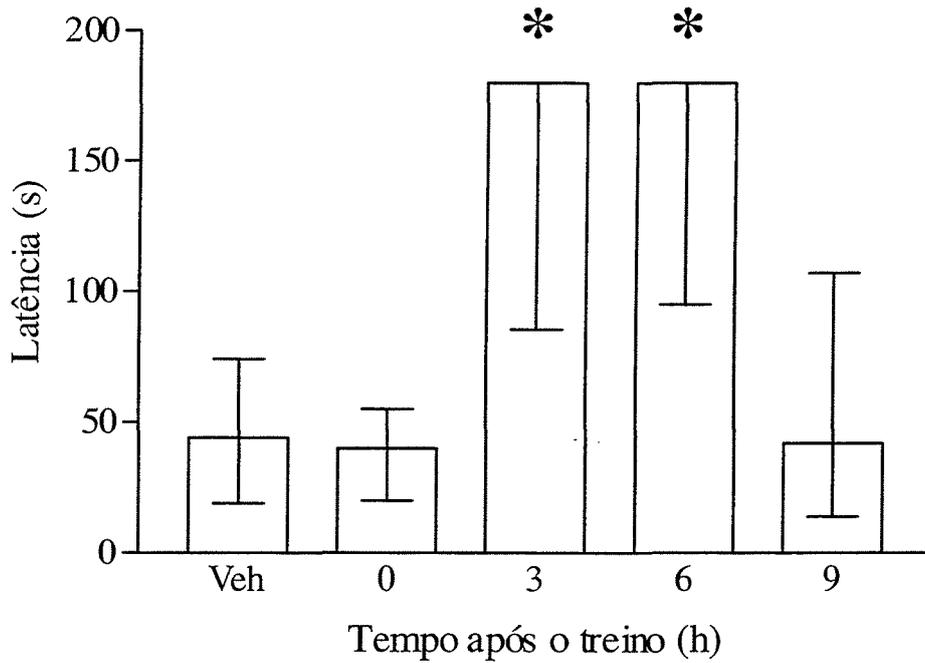
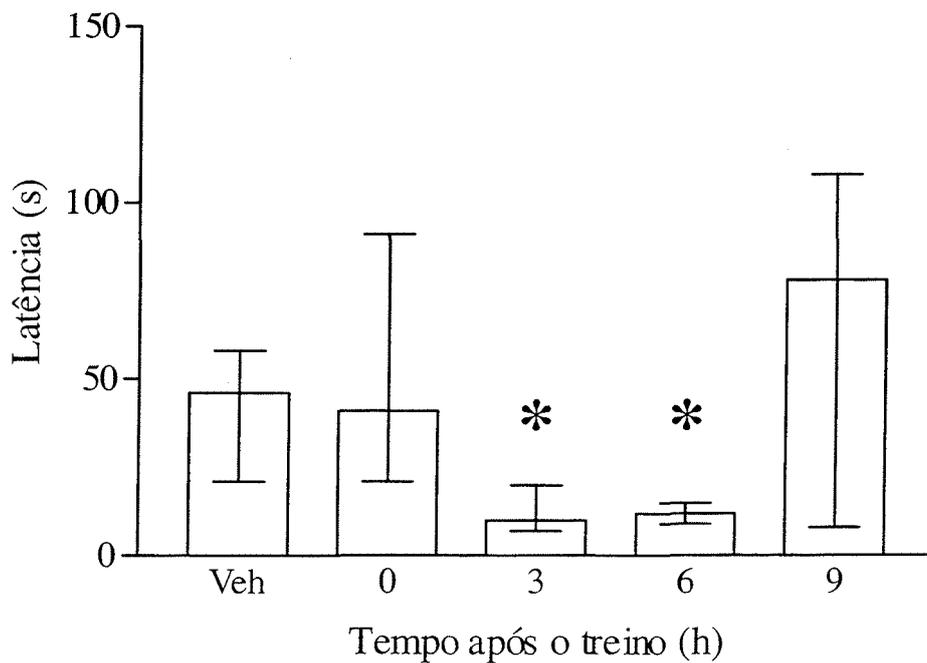


Figura 12: Efeito da administração intra-hipocampal do antagonista dopaminérgico SCH 23390 0, 3, 6 e 9 horas após o treino. Veh=veículo. \* $p < 0,002$ .



Estes resultados sugerem um envolvimento dos receptores dopaminérgicos hipocampais durante a fase de consolidação da memória para a tarefa de esQUIVA inibitória, no período compreendido entre 3 e 6 horas após o treino.

Com o intuito de corroborar e complementar os resultados encontrados, decidimos verificar se o aprendizado desta tarefa encontrava-se associado a alterações na capacidade de ligação dos receptores D1/D5 hipocampais.

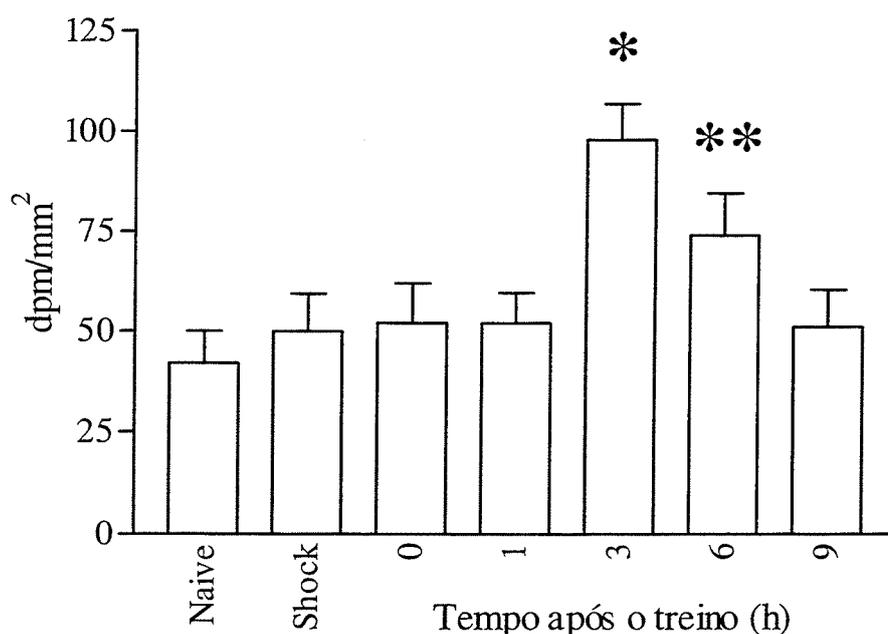
Com tal fim, quantificamos mediante estudos de auto-radiografia, a união específica do antagonista  $^3\text{H-SCH 23390}$  aos receptores dopaminérgicos hipocampais, em distintos tempos após o treino.

Como pode ser visto na Figura 13, o aprendizado aversivo para esQUIVA inibitória está associado com um aumento da união específica do antagonista  $^3\text{H-SCH 23390}$  aos mencionados receptores, 3 (90%;  $**p<0,01$ ) e 6 (47%;  $*p<0,05$ ) horas após o treino (ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls;  $n=6$  animais por grupo experimental). Não observamos alterações significativas em relação aos controles (Naive) quando as quantificações foram realizadas imediatamente (0), 1 e 9 horas após o treino. Os animais que receberam apenas choque ("shock") não apresentaram diferenças em relação aos animais controles, indicando que os resultados observados estão especificamente associados com o aprendizado desta tarefa aversiva.

O aumento da capacidade de união dos receptores D1/D5, observado entre 3 e 6 horas após o treino em esQUIVA inibitória, apresentou o mesmo curso temporal da ação

do agonista SKF 38393 e do efeito provocado pela administração do antagonista SCH 23390.

Figura 13: União de  $^3\text{H}$ -SCH 23390 aos receptores dopaminérgicos hipocampais 0, 1, 3, 6 e 9 horas após o treino na tarefa de esQUIVA inibitória. Naive=controle absoluto, "Shock"=controle de choque. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

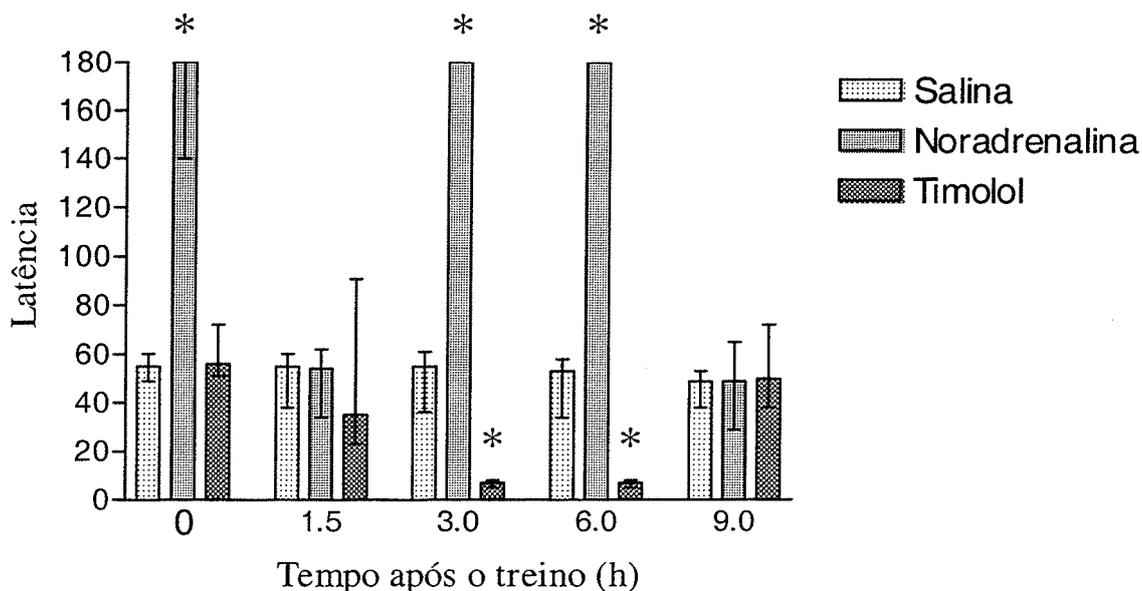


Estes resultados sugerem uma possível participação destes receptores na ativação da via bioquímica AMPc/PKA/pCREB, principalmente no período entre 3 e 6 horas após o aprendizado aversivo.

Decidimos, então, verificar a ação do sistema  $\beta$ -adrenérgico sobre o aprendizado desta tarefa comportamental. Para tanto, estudamos o efeito provocado pela administração tanto de um agonista (Noradrenalina; NE) como de um antagonista adrenérgicos (Timolol) durante a fase de consolidação da memória para o aprendizado

aversivo em questão. Como pode ser observado na Figura 14, a administração de NE (0,3 µg/lado) provoca facilitação da memória quando injetada, na região CA1 hipocampal imediatamente, 3 e 6 horas após o treino (\* $p < 0.002$ ; Kruskal-Wallis seguido do teste de Mann-Whitney U;  $n = 9-12$  animais por grupo experimental; salina=grupo controle). A administração de um antagonista destes receptores, Timolol (0,3 µg/lado), provocou amnésia retrógrada quando administrado 3 e 6 horas após o treino.

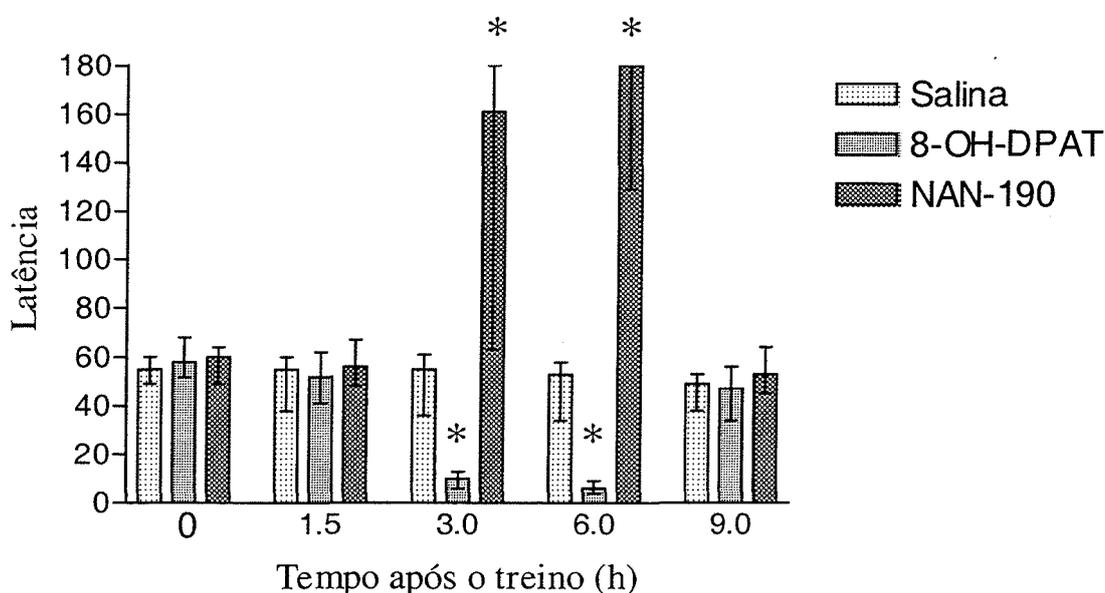
Figura 14: Efeito da administração intra-hipocampal do agonista noradrenérgico noradrenalina e do antagonista adrenérgico timolol 0, 1.5, 3, 6 e 9 horas após o treino. \* $p < 0,002$ .



Os resultados sugerem, claramente, a participação deste sistema de neurotransmissores durante a formação de uma memória aversiva. Curiosamente, a administração de um antagonista adrenérgico não produziu nenhum efeito imediatamente após o treino, período durante o qual estes receptores parecem ser necessários, como indicam os resultados obtidos a partir da administração de NE.

Investigamos também o envolvimento do sistema de neurotransmissores serotoninérgicos sobre a fase de consolidação da memória para nossa tarefa aversiva. A Figura 15 apresenta os resultados obtidos quando os animais receberam a infusão de um agonista (8-OH-DPAT; 2,5 µg/lado) ou antagonista (NAN-190; 2,5 µg/lado) serotoninérgico imediatamente (0), 1.5, 3, 6 e 9 horas após o treino.

Figura 15: Efeito da administração intra-hipocampal do agonista serotoninérgico 8-OH-DPAT e do antagonista serotoninérgico NAN-190 0, 1.5, 3, 6 e 9 horas após o treino. \* $p < 0,002$ .



Os resultados sugerem que os receptores serotoninérgicos 5HT1A podem atuar durante a fase de consolidação da memória. A administração de 8-OH-DPAT provocou um efeito amnésico sobre o aprendizado, quando administrado 3 e 6 horas após o treino e a infusão de NAN-190 provocou um aumento na retenção da memória durante o mesmo período mencionado acima (\* $p < 0,002$ ; Kruskal-Wallis seguido do teste de Mann-Whitney U;  $n = 9-12$  animais por grupo experimental; salina=grupo controle).

Vimos, então, que vários passos da via bioquímica AMPc/PKA hipocampal estão relacionados com a formação de memória para a tarefa de esquiva inibitória e que a aquisição de memória para esta tarefa pode ser modulada, pelo menos, por três sistemas de neurotransmissores distintos.

Com base nas informações obtidas, decidimos estudar o efeito que um aprendizado aversivo causava sobre um importante substrato da enzima PKA. Como já mencionado anteriormente, entre os substratos desta enzima destaca-se a proteína CREB.

Em 1997, Bernabeu e cols. descreveram um aumento nos níveis de pCREB, a forma fosforilada (em serina 133) e ativa de CREB, na região CA1 do hipocampo de animais treinados em esquiva inibitória e sacrificados imediatamente (0h), 3 e 6 horas após o treino. Os autores sugeriram que o fator de transcrição CREB poderia estar participando nos processos de consolidação da memória para um aprendizado aversivo.

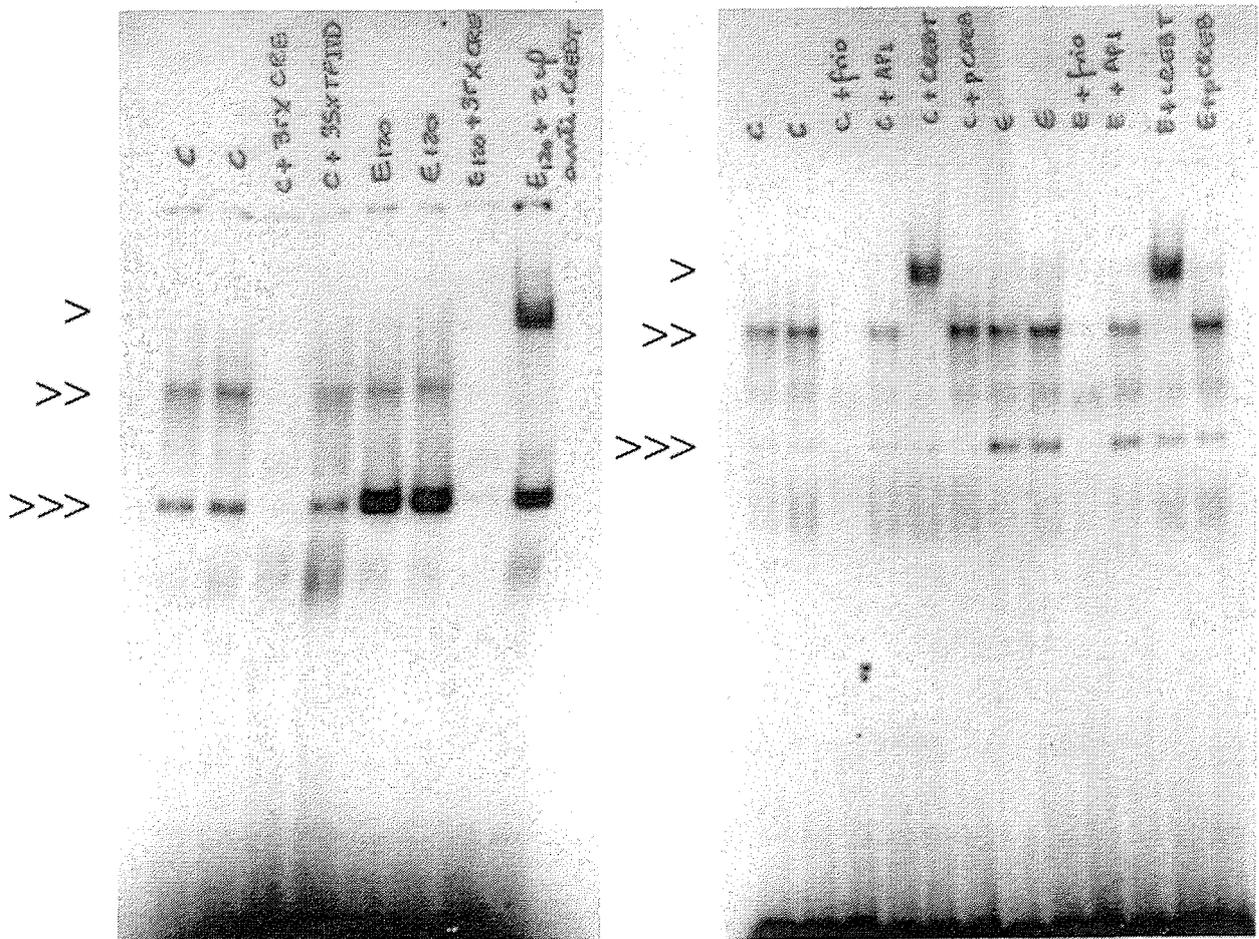
A partir dos dados mencionados acima e com a intenção de verificar se o aumento dos níveis de pCREB observados 3 e 6 horas após o treino, através da técnica de imunohistoquímica, já eram evidentes antes deste período, decidimos estudar o efeito produzido pelo treino sobre os níveis de CREB e pCREB, em animais sacrificados 2 horas após.

Com este fim, preparamos extratos nucleares a partir de hipocampos dos animais mencionados acima, para verificar a existência de proteínas pertencentes à família

CREB/ATF de fatores de transcrição que tivessem a capacidade de ligar-se especificamente a uma sequência CRE.

Realizamos os ensaios de EMSA, apresentados na Figura 16, com extratos provenientes de animais treinados e animais controles. Além disto, realizamos experimentos de "supershift", para identificar proteínas participantes dos complexos oligonucleotídeo/proteína observados.

Figura 16: Ensaio de mobilidade eletroforética e "supershift" em extratos nucleares provenientes do hipocampo de animais treinados e sacrificados duas horas após. >> e >>> indicam complexos específicos de ligação com a sonda de DNA. > representa o "supershift" provocado pelo anticorpo anti-CREBT quando incubado conjuntamente com as reações de ligação.





Verificamos que existe atividade de união específica ao oligonucleotídeo CRE nos extratos nucleares provenientes de animais treinados (linhas "E120"; "E") e animais controles (linhas "C").

Ao menos duas proteínas ligam-se especificamente à sonda de DNA (>> e >>>) e provocam um retardo da mobilidade eletroforética. Estes complexos foram especificamente abolidos quando incluímos um excesso da sonda não radioativa na reação (linhas "C + 35 X CRE"; "E120 + 35 X CRE"; "C + frio"; "E + frio").

A especificidade dos complexos formados também foi testada a partir da incubação de um excesso de sonda AP1 e TFIID, não radioativas, juntamente com as reações de "binding". Como pode ser observado, um excesso de sondas AP1 ou TFIID não prejudicou a formação dos complexos proteína/CRE (linhas "C + 35 X TFIID", "C + AP1", "E + AP1").

Também verificamos um aumento<sup>\*</sup> em um dos complexos formados com a sonda CRE, quando animais treinados foram comparados com animais controles (>>>; linhas "E120", "E"; +32%;  $p < 0,05$ ;  $n = 6$  experimentos independentes comparados através do teste t de Student).

Para verificar se os complexos proteína/CRE estavam compostos, pelo menos em parte, pela proteína CREB ou sua forma fosforilada pCREB, realizamos experimentos de "supershift" a partir da incubação de anticorpos específicos para ambas formas da

---

<sup>\*</sup> Os experimentos apresentados na figura 16 são representativos de 6 experimentos independentes.

proteína CREB juntamente com as reações de união específica. O anticorpo capaz de reconhecer tanto a forma fosforilada quanto a não fosforilada de CREB provocou um retardo ainda maior na mobilidade eletroforética do complexo representado por >> (>; linhas "E120 + 2 µl de anti-CREBT", "C + CREBT", "E+ CREBT").

A mobilidade do complexo representado por >>> também foi parcialmente retardada quando o anticorpo anti-CREBT foi incluído na reação de "binding", o que pode ser deduzido pela diminuição observada na intensidade da banda (linhas "E120 + 2 µl de anti-CREBT", "E+ CREBT").

Quando incubamos as reações com um anticorpo que reconhece especificamente a forma fosforilada de CREB, verificamos uma pequena redução na intensidade da banda representada por >>> (linha "E + pCREB"), mas não foi possível observar a banda corresponde ao "supershift" com este anticorpo.

Estes resultados demonstraram que a proteína CREB está presente em extratos nucleares provenientes de hipocampos de animais treinados e controles e que apresentou capacidade de união específica a uma sonda CRE (>>, >>>).

Também detectamos uma maior atividade de união à sonda, em animais treinados quando comparados aos controles, em relação ao complexo representado por >>>, indicando a existência de uma maior quantidade de proteínas que ligaram-se à sonda, 2 horas após o treino dos animais na tarefa de esquiva inibitória.

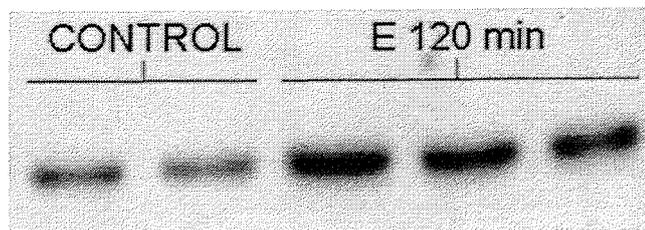
Este complexo (>>>) está formado, pelo menos em parte, pela forma fosforilada da proteína CREB, já que a presença do anticorpo anti-pCREB na reação de "binding" provocou uma diminuição na intensidade desta banda.

A partir destes resultados resolvemos verificar, através da técnica de "Western Blot", se os níveis de CREB e pCREB encontravam-se modificados nos extratos nucleares hipocampais de animais treinados e sacrificados 2 horas após o treino.

Verificamos que a imunoreatividade para a forma fosforilada de CREB está aumentada 2 horas após o treino na tarefa aversiva de esQUIVA inibitória (+40%;  $p < 0,005$ ;  $n=7$  experimentos independentes comparados através do teste t de Student).

A Figura 17 apresenta um "Western Blot" representativo dos resultados obtidos, no qual é evidente o aumento na imunoreatividade de pCREB como consequência do aprendizado desta tarefa aversiva.

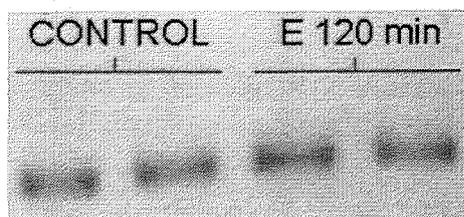
Figura 17: Imunorreatividade para a forma fosforilada de CREB em extratos nucleares hipocampais de animais controles ("control") e animais treinados e sacrificados 120 minutos após (E120 min).



Para verificar se o aumento observado estava acompanhado por um aumento na quantidade total da proteína CREB, realizamos experimentos de "Western Blot" com um anticorpo capaz de reconhecer tanto CREB como pCREB.

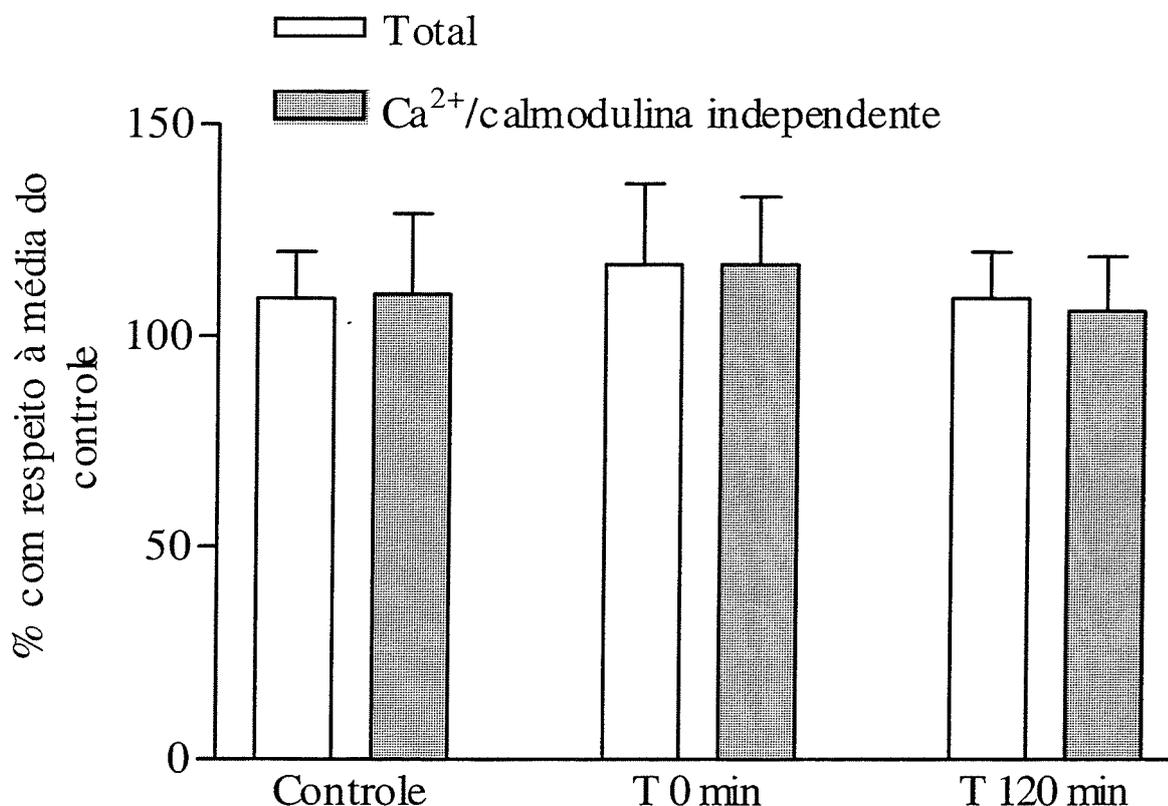
Como pode ser visto na Figura 18, o aumento nos níveis da proteína CREB fosforilada em serina 133, observado nos animais treinados e sacrificados 2 horas após, parece não estar associado a um aumento significativo na quantidade total da proteína CREB dentro do núcleo celular.

Figura 18: Imunoreatividade para CREB, independentemente do seu estado de fosforilação, em extratos nucleares hipocâmpais de animais controles (“control”) e animais treinados e sacrificados 120 minutos após (E120 min).



Os resultados sugerem um aumento da fosforilação da proteína CREB já existente no núcleo, o que poderia estar associado a ativação da transcrição de genes especificamente relacionados com as alterações de longa duração envolvidos com a formação da memória para esta tarefa aversiva. O aumento observado 2 horas após o treino parece não dever-se a um aumento da atividade das CaMKs (quinases dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  e calmodulina) nucleares. Como pode ser observado na Figura 19, a atividade destas enzimas, as quais atuam fosforilando CREB na serina 142, não encontra-se aumentada em núcleos provenientes de animais treinados e sacrificados imediatamente (T 0 min) e 2 horas (T 120 min) após o treino.

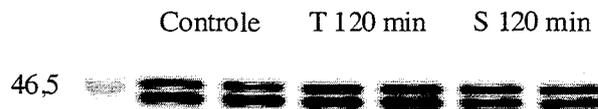
Figura 19: Atividade de CAMKs em frações nucleares hipocâmpais de animais controles e animais treinados e sacrificados imediatamente (T 0 min) ou duas horas após (T 120 min).



Decidimos, então, verificar os níveis nucleares da subunidade catalítica da enzima PKA. Como descrito anteriormente, após sua ativação no citoplasma celular, a subunidade catalítica da PKA migra ao núcleo celular, onde pode exercer sua ação fosforilando a serina 133 de CREB, possibilitando assim, a ativação transcricional mediada pela forma fosforilada desta proteína. Na Figura 20 estão representados os resultados obtidos quando medimos os níveis da subunidade catalítica da PKA em extratos nucleares provenientes do hipocampo de animais treinados (T 120 min) ou expostos ao choque (S 120 min) e sacrificados 2 horas após. Como pode ser visto,

encontramos, 2 horas após o treino, um pequeno e significativo incremento da quantidade da subunidade catalítica de PKA (+31%,  $p < 0,05$ ; ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls;  $n=5$ ). Este aumento parece ser específico do aprendizado envolvido nesta tarefa porque, a exposição ao choque, não produz nenhuma alteração detectável nos níveis nucleares da subunidade catalítica desta enzima.

Figura 20: Imunorreatividade para a subunidade catalítica da enzima PKA em preparações nucleares provenientes do hipocampo de animais controle, treinados (T 120 min) ou choqueados (S120 min) e sacrificados 2 hs após.

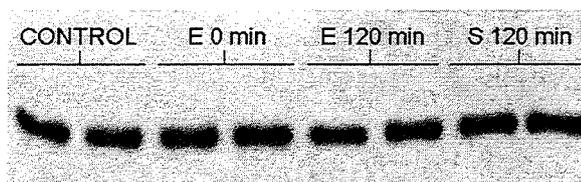


Estes resultados sugerem que o aumento observado para os níveis de pCREB, 2 horas após o treino, pode ser devido a um aumento da translocação da subunidade catalítica da PKA, com o conseqüente aumento da fosforilação da proteína CREB que já encontra-se no núcleo celular.

A atividade de pCREB, ao menos duas horas após o treino, parece não sofrer nenhuma regulação pela fosfatase PP2B. Como pode ser observado na Figura 21, experimentos realizados em extratos nucleares provenientes de animais sacrificados imediatamente (E 0 min) e 2 horas (E 120 min) após o treino, demonstraram que a quantidade desta enzima não apresenta nenhuma alteração significativa em relação aos animais controles ("Control"). Também não encontramos nenhuma alteração nos níveis

desta enzima, quando extratos nucleares provenientes de animais expostos ao choque e sacrificados 2 horas após, foram comparados com os controles.

Figura 21: Imunoreatividade para a proteína fosfatase PP2B em extratos nucleares provenientes do hipocampo de animais controle (“Control”), animais treinados e sacrificados imediatamente (E 0 min) ou 2 horas após (E 120 min) e animais que receberam apenas choque e foram sacrificados 2 horas após (S 120 min)



Considerados conjuntamente, os dados expostos indicam, claramente, a participação da via bioquímica AMPc/PKA/pCREB durante a fase de consolidação para uma memória aversiva de longa duração, em ratos.

Os resultados sugerem que, no período compreendido entre 3 e 6 horas após o aprendizado para a tarefa de esQUIVA inibitória, vários eventos bioquímicos hipocampais encontram-se ativados.

Primeiramente, verificamos que a administração de um análogo permeável do AMPc, na região CA1 do hipocampo dorsal, provocou facilitação da memória quando infundido 3 e 6 horas após o treino. De acordo com estes resultados e apresentando um curso temporal bastante similar, a quantificação dos níveis endógenos de AMPc demonstrou que este nucleotídeo encontra-se aumentando 0.5, 3 e 6 horas após o treino. Já a ativação da enzima AC, através da infusão intrahipocampal de forskolina, provocou

a facilitação da memória para o aprendizado em questão, quando a droga foi infundida 3 e 6 horas após o treino.

Além disto, a inibição da atividade da enzima PKA, através da infusão intra-hipocampal de KT5720, provocou amnésia quando o inibidor foi injetado imediatamente, 3 e 6 horas após o treino. Quando verificamos a atividade de PKA encontramos um incremento na atividade desta enzima imediatamente, 3 e 6 horas após o treino.

Resultados de Bernabeu e cols. (1997) demonstraram um aumento nos níveis do pCREB hipocampal imediatamente, 3 e 6 horas após o treino em esQUIVA INIBITÓRIA. Nossos resultados demonstraram que o aumento encontrado pelos autores, 3 e 6 horas após o treino, já é evidente duas horas após. Verificamos também que o aumento no estado de fosforilação de CREB, duas horas após o treino, parece não ser devido a um aumento da síntese protéica, já que os níveis nucleares totais desta proteína permaneceram inalterados.

Concomitantemente com estes achados, descrevemos que os níveis nucleares da subunidade catalítica da PKA encontram-se aumentados duas horas após o treino, sugerindo que, a este tempo, a PKA poderia estar atuando especificamente sobre o fator de transcrição nuclear CREB.

De acordo com nossos resultados, a fase de consolidação de memória para esta tarefa aversiva, poderia sofrer a ação modulatória de, ao menos, três sistemas neurotransmissores: dopaminérgico, serotoninérgico e adrenérgico. A ação das vias



dopaminérgicas e adrenérgicas provoca um efeito facilitatório no período compreendido entre 3 e 6 horas após o treino, enquanto que a estimulação dos receptores serotoninérgicos parece apresentar uma ação modulatória negativa sobre a aquisição desta memória aversiva.

Além da ativação de diversas etapas da via AMPc/PKA/pCREB no período compreendido entre 3 e 6 horas após o treino, verificamos um possível envolvimento da enzima PKA, do seu substrato pCREB e do sistema de neurotransmissores adrenérgicos, nos estágios iniciais do aprendizado para esta tarefa. Vale lembrar, também, que os níveis de AMPc já encontram-se aumentados meia hora após o treino.

Recentemente, Bourtchouladze e cols. (1998) descreveram dois períodos dependentes da atividade de PKA, quando submeteram ratos a um aprendizado aversivo de condicionamento ao medo. Este aprendizado apresenta um fator comum com o paradigma estudado pelos nossos laboratórios, em relação ao envolvimento da região hipocampal. Os autores verificaram que a infusão intraventricular de um inibidor de PKA, Rp-cAMPs, produziu amnésia quando administrado imediatamente ou 4 horas após o treino. Corroboraram os resultados encontrados, através do estudo de animais transgênicos deficientes para a atividade da enzima PKA, os quais também demonstraram que a atividade de PKA era fundamental para a aquisição de memória para a tarefa em questão, imediatamente e 4 horas após o treino.

Nesse mesmo ano, Müller and Carew estudaram a ativação da cascata bioquímica dependente de AMPc em *Aplysia*, através da administração de distintos pulsos de

serotonina (5HT). Os autores descreveram três fases de ativação de PKA, dependendo do protocolo experimental utilizado. Com uma administração de 5HT, verificaram uma ativação transitória da atividade desta enzima, que não durou mais de 5 minutos e não envolveu a síntese e tradução protéicas. Quando o estímulo consistiu de 4 a 5 pulsos de 5HT, a ativação persistiu por 3 horas e requereu a tradução protéica. A terceira fase foi observada quando uma aplicação continuada de serotonina foi administrada no neurônio sensorial da *Aplysia*. Esta última fase apresentou uma ativação de até 20 horas de duração e estava associada com a síntese e tradução protéicas.

Estas informações indicam a existência de, ao menos, dois períodos de ativação de PKA, necessários tanto para a aquisição de memória para uma tarefa de condicionamento ao medo como para a manifestação de distintas formas de plasticidade sináptica em *Aplysia*.

Os nossos resultados também parecem indicar que existem duas fases de atividade bioquímica dependentes da via AMPc/PKA/pCREB, relacionadas com o aprendizado da tarefa envolvida em nosso paradigma experimental. Uma delas, a que ativa-se logo após o treino, parece depender basicamente da atividade da enzima PKA. Esta fase inicial poderia sofrer modulação através do sistema adrenérgico de neurotransmissores.

A fase mais tardia poderia estar relacionada com a ativação de uma cascata bioquímica que culmina com a fosforilação do fator de transcrição CREB, 2 a 6 horas após o aprendizado, podendo ser modulada pelos sistemas dopaminérgico, serotoninérgico e adrenérgico.

Quando ocorre a codificação de uma experiência na forma de uma memória de longa duração, acredita-se que o conjunto de neurônios envolvidos com a experiência em questão sofra alterações específicas, as quais podem incluir tanto um reforço entre as interações sinápticas pré-existentes, como o crescimento de novas conexões entre as sinapses comprometidas.

Para que as alterações sinápticas ocorram e permaneçam, parece ser necessária a coordenação de vários processos celulares, os quais podem acontecer em distintos locais da célula, por exemplo, alterações estruturais na sinapse e alterações na expressão gênica nuclear.

Além da ocorrência de processos subcelulares específicos, é bastante provável que um aprendizado necessite da concomitante ativação de mais de uma via de transdução de sinais.

Considerando os resultados obtidos em relação à via bioquímica AMPc/PKA/pCREB, decidimos verificar o envolvimento de outra importante via de transdução de sinais, MAPK/ELK1, durante o aprendizado para o nosso paradigma experimental.

A cascata bioquímica das MAPKs ("mitogen-activated protein kinases") está classicamente associada com a transmissão de informações iniciadas pela união dos fatores de crescimento aos seus receptores específicos, as quais induzem a proliferação e diferenciação celulares (Cohen, 1992).

Esta via bioquímica ocorre através da ativação seqüencial de distintas moléculas efetoras, as quais podem estar localizadas tanto no citoplasma como no núcleo celular (Blumer e Johnson, 1994).

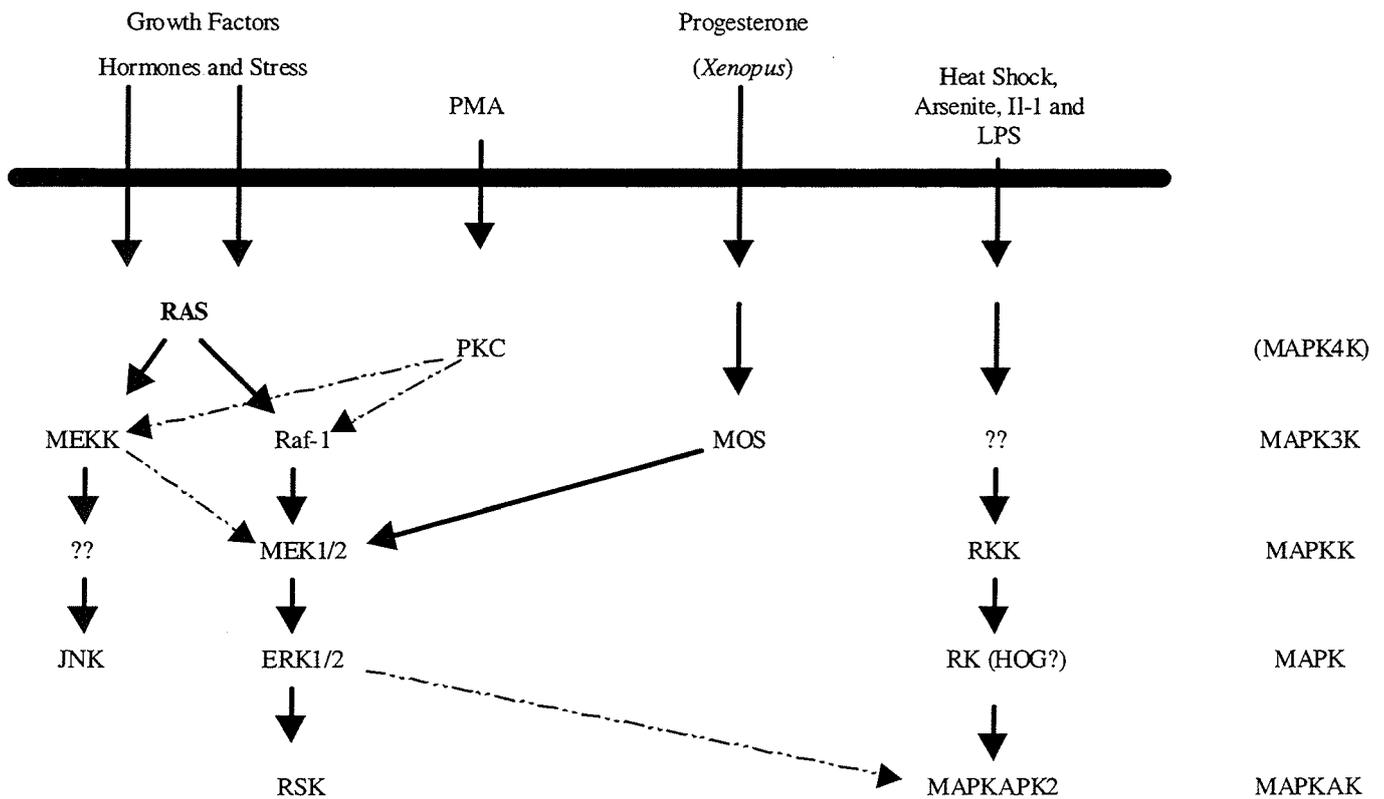
A cascata de ativação das MAPKs é iniciada a partir da estimulação de pequenas proteínas com capacidade de ligarem-se ao GTP, conhecidas como Ras, as quais, na sua forma inativa, encontram-se associadas à membrana plasmática (Finkbeiner e Greenberg, 1996). Estas proteínas ativam-se, após a união do primeiro mensageiro extracelular ao seu receptor ou após a elevação dos níveis intracelulares de  $Ca^{2+}$ , na presença de uma molécula adaptadora, Grb2 (Pawson, 1995), e de uma proteína que possibilita a troca de GDP por GTP, Sos ("son of sevenless"; Finkbeiner e Greenberg, 1996).

A ativação de Ras pode iniciar uma cascata de eventos de fosforilação, a qual, em última instância, atua sobre fatores de transcrição nucleares (Johnson e cols., 1997; Hodge e cols., 1998; Sgambato e cols., 1998), ativando-os. Estes últimos podem provocar alterações no fenótipo celular, entre as quais encontram-se o crescimento e a diferenciação celular (Lowy e Willumsen, 1993). Outros alvos das MAPKs incluem proteínas do citoesqueleto, as quais podem influenciar diretamente a estrutura celular (Brugg e Matus, 1991).

De maneira geral e devido a existência de uma grande quantidade de isoformas, as proteínas que participam da via bioquímica MAPK/ELK1 podem ser classificadas em MAPKKK (ou MAP3K ou "mitogen-activated protein kinase kinase kinase"), MAPKK

(ou MAP2K ou "mitogen-activated protein kinase kinase"), MAPK e MAPKAPK (MAPK-"activated protein kinase"; Seger e Krebs, 1995). A Figura 22 apresenta, de maneira resumida, os principais componentes desta via bioquímica em vertebrados.

Figura 22: Representação das cascatas bioquímicas que envolvem a participação das MAPKs (Seger e Krebs, 1995).



Como pode ser observado na Figura 22, existe uma grande interação entre os componentes desta via de transdução de sinais possibilitando, assim, a amplificação de sinais iniciados a nível da membrana plasmática e a convergência de informações, iniciadas através de mecanismos extracelulares distintos, para um mesmo ponto da cascata de eventos de fosforilação [como é o caso, por exemplo, das distintas MAPKKK (MEKK, Raf-1 e MOS) atuando especificamente sobre a mesma MAPKK].

Após a fosforilação e conseqüente ativação das enzimas ERK1/2, ocorre a translocação das mesmas ao núcleo celular, onde atuam sobre importantes fatores de transcrição, como por exemplo, a proteína ELK1 ("extracellular signal-regulated kinase"; Xing e cols., 1996).

Este fator de transcrição, após ativado, liga-se, juntamente com SRF ("serum response factor") a uma seqüência SRE ("serum response element"), a qual encontra-se presente nos promotores gênicos de vários IEGs ("immediate early genes"; Gille e cols., 1992), como é o caso dos genes para c-fos, junB e egr-1 (Hodge e cols., 1998).

Do exposto nos parágrafos anteriores, fica evidente a importância que a via bioquímica Ras-MAPKs apresenta para a regulação dos processos de divisão e diferenciação celular. Mas, além de encontrarem-se nas células em divisão, os componentes desta via de transdução de sinais são também expressados nos neurônios pós-mitóticos do SNC já desenvolvido (Boulton e cols., 1991).

O fato de que componentes desta via bioquímica estejam presentes em neurônios maduros sugere uma função especializada para a cascata das MAPKs nestas células.

Em 1996, English e Sweatt postularam uma possível função para os componentes da cascata das MAPKs depois de verificar que a enzima MAPK, especificamente p42 (também conhecida como ERK2), encontrava-se ativada na região CA1 hipocampal de ratos, após a indução de LTP.

No ano seguinte, os mesmos autores descreveram que a cascata das MAPKs era necessária para a indução da LTP hipocampal em ratos e que a inibição da atividade da

enzima MEK (MAPKK) bloqueava a ativação observada para esta via bioquímica, após a estimulação direta dos receptores NMDA (English e Sweatt, 1997).

Estudos realizados por Atkins e cols. (1998) também demonstraram o envolvimento desta via bioquímica durante o condicionamento ao medo, em ratos. Verificaram a ativação da cascata bioquímica das MAPKs após o treino dos animais na tarefa mencionada e a ativação observada foi especificamente abolida quando um inibidor da MEK foi administrado.

Um importante estudo em camundongos, realizado pelo grupo de Brambilla e cols. (1997) demonstrou a importância dos passos iniciais da via das MAPKs, durante o aprendizado de uma tarefa dependente da amígdala. Os autores demonstraram que animais mutantes para Ras-GRF apresentaram deficiência durante a fase de consolidação de memória para tarefas com um alto componente emocional. Também verificaram, através de medidas eletrofisiológicas, que a LTP encontrava-se anormal na amígdala basolateral dos animais mencionados. Os mutantes não apresentaram déficits de aprendizagem em tarefas espaciais dependentes do hipocampo, como é o caso da tarefa de "Water Maze".

Estudos realizados em *Aplysia* também indicaram um envolvimento das MAPKs durante a indução de LTF neste organismo. Martin e cols. (1997) verificaram que, durante a indução de LTF em uma preparação neuronal deste animal, ocorreu a translocação de MAPK para o núcleo do neurônio sensorial. Os autores também verificaram que a injeção de anticorpos anti-MAPK ou de inibidores da MAPK na célula

pré-sináptica impediu a indução de LTF, mas não acarretou nenhum efeito sobre a transmissão sináptica basal ou sobre a STF.

Resultados semelhantes aos mencionados no parágrafo anterior foram descritos por Michael e cols. (1998). Os autores descreveram a ativação de MAPK nos neurônios sensoriais da *Aplysia* após a indução de LTF.

Outra importante participação das MAPKs parece ser a que relaciona-se com a internalização de uma molécula de adesão celular em *Aplysia* (apCAM; "*Aplysia*-Cell adhesion molecule"), evento fundamental para que a indução de LTF possa ocorrer. Bailey e cols. (1997) descreveram que uma mutação da apCAM, no sítio sobre o qual atua MAPK, previne a internalização desta proteína, evitando assim, a indução da LTF.

Em 1998, Crow e cols. descreveram o envolvimento da via das MAPKs durante o condicionamento Pavloviano em *Hermissenda*. Os autores verificaram a ativação de ERK/MAPK após o paradigma experimental mencionado.

Todas estas informações sugerem um papel para a via de transdução de sinais das MAPKs durante os processos plásticos associados com o aprendizado em organismos tão distintos como ratos, *Aplysia* e *Hermissenda*.

Para estudar se a via MAPK/ELK1 estava envolvida com o aprendizado aversivo para a tarefa de esquiva inibitória, decidimos estudar os níveis de alguns componentes desta via bioquímica, após o treino nesta tarefa.

Decidimos verificar se os níveis das MAPKs ERK1 (p44)/ ERK2 (p42) encontravam-se alterados 2 horas após o treino em esquiva inibitória, em animais que



receberam a infusão de salina ["Trained" (sal)] ou APV ["Trained" (APV)], droga antagonista dos receptores NMDA, na região CA1 hipocampal. Este tratamento produz uma clara amnésia retrógrada (Izquierdo e cols., 1992). Os dois grupos experimentais mencionados foram comparados com animais canulados e injetados com salina [Naive (sal)]. Estes experimentos foram planejados com o objetivo de estudar se esta via de transdução de sinais encontrava-se ativada ao mesmo tempo que a cascata AMPc/PKA/pCREB, já que foi descrito que ambos sistemas são capazes de atuar sinergisticamente promovendo a transcrição de genes de expressão imediata.

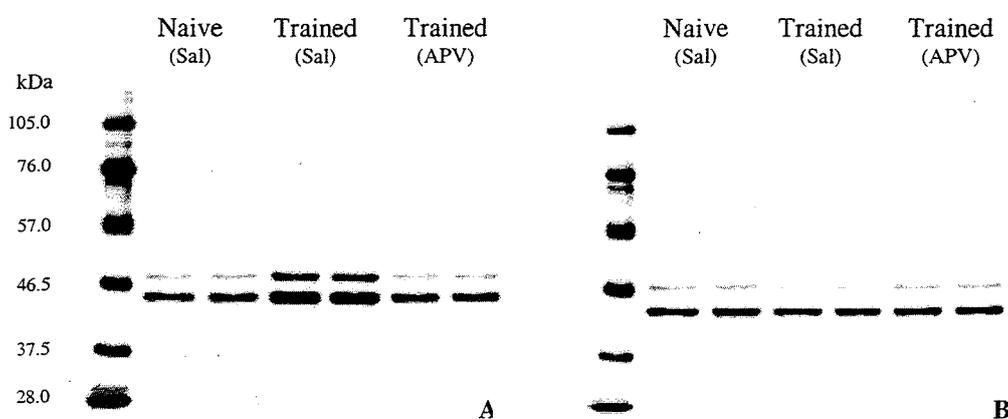
A Figura 23 representa os resultados obtidos. Como pode ser observado no painel A, duas horas após o treino do animal em esquiva inibitória, ocorre um grande aumento na imunoreatividade de ambas isoformas de MAPK em núcleos provenientes do hipocampo dos grupos experimentais mencionados acima. O aumento foi identificado através da utilização de um anticorpo que permite verificar o estado de fosforilação destas proteínas, quando fosforiladas na treonina 202 e na tirosina 204 e pode ser constatado pelo aumento da imunoreatividade nas bandas de aproximadamente 42 (p42) e 44 (p44) kDa [linhas "Trained" (sal)].

Com o objetivo de verificar se o aumento observado era devido a uma modificação no estado de fosforilação das MAPKs que já estavam no núcleo celular ou devido a um aumento na quantidade de MAPKs que, após ativadas, translocaram-se para o núcleo celular, retiramos o anticorpo anteriormente utilizado, através do processo de

"stripping" (Ginty e cols., 1993), e reincubamos as membranas com um anticorpo capaz de reconhecer p44 e p42 independentemente do seu estado de fosforilação.

Os resultados encontrados estão representados na Figura 23/painel B e, de acordo com o observado, os níveis intranucleares das proteínas mencionadas não encontram-se alterados duas horas após o treino em esquivas inibitórias.

Figura 23: Imunorreatividade para p42 e p44 em frações nucleares provenientes do hipocampo de animais controle absoluto (Naive; animais canulados e injetados com salina), treinados e injetados com salina ["Trained (sal)"] ou treinados e injetados com APV [Trained (APV)] e sacrificados 2 horas após. A) experimento realizado com anticorpo capaz de reconhecer as formas fosforiladas de p42 e p44; B) experimento realizado com anticorpo capaz de reconhecer p42 e p44 independentemente do seu estado de fosforilação.

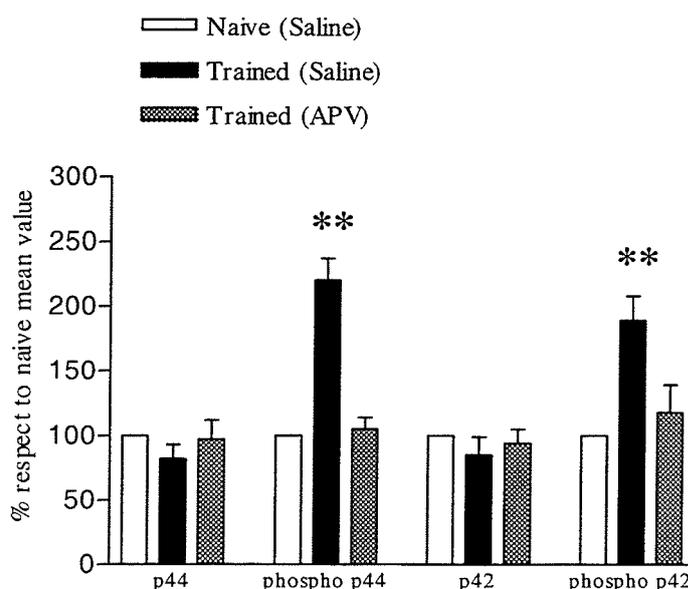


Como pode ser observado, quando comparamos o grupo de experimentos representados em A com os representados em B, podemos verificar a existência de um pequeno, mas detectável, retardo na mobilidade eletroforética das MAPKs, quando estas encontram-se fosforiladas.

Os nossos resultados demonstraram, também, que o aumento na fosforilação das MAPKs nucleares decorrente do aprendizado para a tarefa de esquiva inibitória, foi completamente abolido quando os animais receberam APV na região CA1 hipocampal [linhas "Trained" (APV)], demonstrando que este aumento requer a ativação dos receptores glutamatérgicos NMDA.

A Figura 24 representa a análise densitométrica dos resultados obtidos na Figura 23 A [ $**p < 0.01$ ; t de Student; "Trained" (sal) vs "Trained" (APV); n=5].

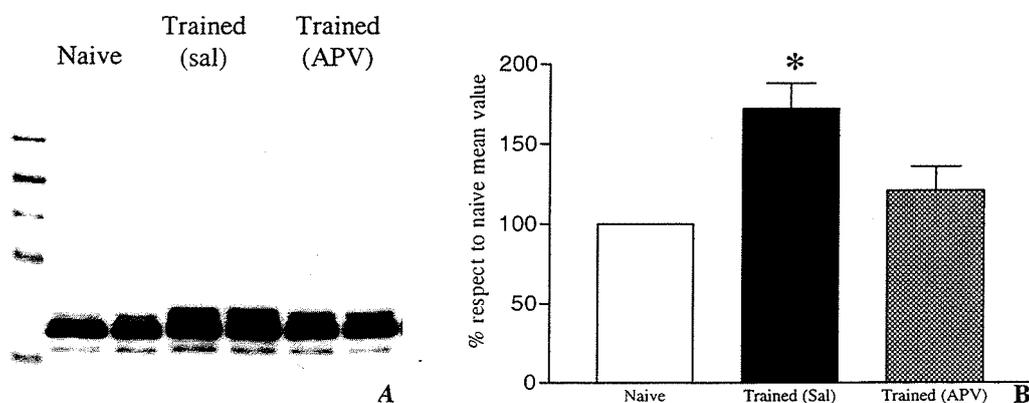
Figura 24: Análise densitométrica dos resultados apresentados na Figura 23.  $**p < 0,01$ .



Para corroborar os dados obtidos, imunoprecipitamos as proteínas MAPKs presentes nos núcleos provenientes dos animais estudados, através da utilização de um anticorpo capaz de reconhecer apenas a forma fosforilada destas proteínas, com conseqüente verificação da atividade das MAKs precipitadas sobre um substrato específico.

Como pode ser observado na Figura 25, a atividade das MAPKs encontra-se aumentada duas horas após o treino em esquivas inibitórias (\* $p < 0,05$ ; t de Student; "Trained" (sal) vs "Trained" (APV);  $n=4$ ), aumento bloqueado especificamente através da administração de APV na região CA1 hipocampal. O painel A apresenta um "Western Blot" representativo de 4 preparações independentes e o painel B representa a análise densitométrica dos resultados obtidos.

Figura 25: Verificação da atividade enzimática de fosfo p42 e fosfo p44 nas frações nucleares hipocámpais de animais controle (Naive; animais canulados e injetados com salina) e animais treinados e injetados com salina ["Trained" (sal)] ou APV ["Trained" (APV)] e sacrificados 2 horas após. A) Experimento representativo de 4 preparações independentes, utilizando um anticorpo anti-fosfo-ELK1 para detectar a proteína ELK1 recombinante, substrato específico de p42 e p44. B) Análise densitométrica dos resultados obtidos; \* $p < 0,05$ .



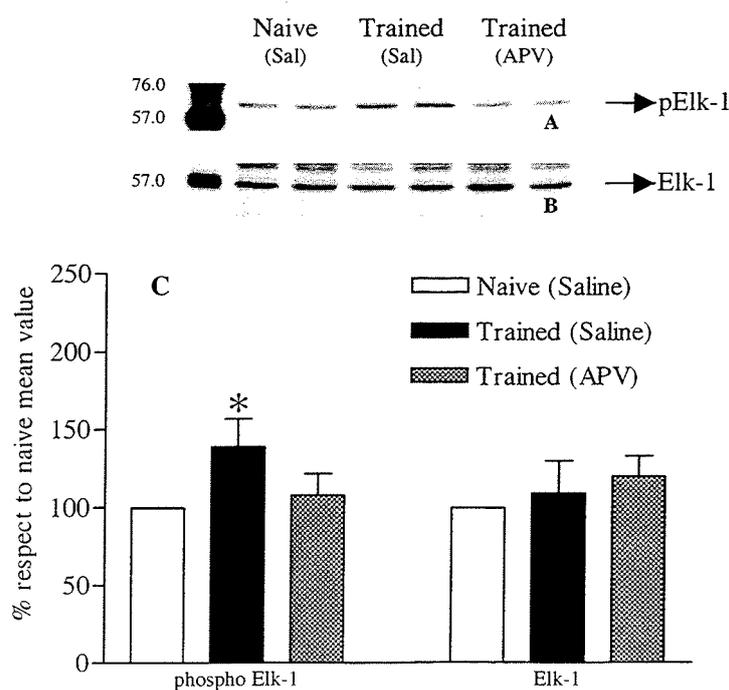
A partir das informações obtidas, decidimos verificar o estado de fosforilação de um fator de transcrição, substrato específico das MAPKs, ELK1.

Nossos estudos demonstraram um pequeno, mas significativo, aumento na imunoreatividade para a forma fosforilada deste fator de transcrição duas horas após o

treino em esquiiva inibitória [ $*p < 0,05$ ; t de Student; "Trained" (sal) vs "Trained" (APV);  $n=5$ ]. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 26/painel A, e também demonstram que o APV bloqueia especificamente o aumento de imunoreatividade observado.

Quando utilizamos um anticorpo capaz de reconhecer ELK1 independentemente do seu estado de fosforilação, não observamos nenhuma alteração na quantidade intranuclear deste fator de transcrição. Estes resultados podem ser observados no painel B da Figura 26.

Figura 26: Imunorreatividade para ELK1 em frações nucleares provenientes do hipocampo de animais controle absoluto (Naive; animais canulados e injetados com salina), treinados e injetados com salina ["Trained (sal)] ou treinados e injetados com APV [Trained (APV)] e sacrificados 2 horas após. A) experimento realizado com anticorpo capaz de reconhecer as formas fosforiladas de ELK1. B) experimento realizado com anticorpo capaz de reconhecer ELK1 independentemente do seu estado de fosforilação. C) Análise densitométrica dos resultados obtidos;  $*p < 0,05$ .



Como já mencionado anteriormente, a fosforilação de ELK1 pelas MAPKs provoca a ativação deste fator de transcrição. ELK1 atua promovendo a transcrição de genes que contenham em seu promotor uma seqüência SRE. Decidimos, então, verificar se a ativação de ELK1 acarretava algum efeito sobre os produtos de dois genes que contém, no seu promotor, uma seqüência para união de ELK1, c-fos e jun.

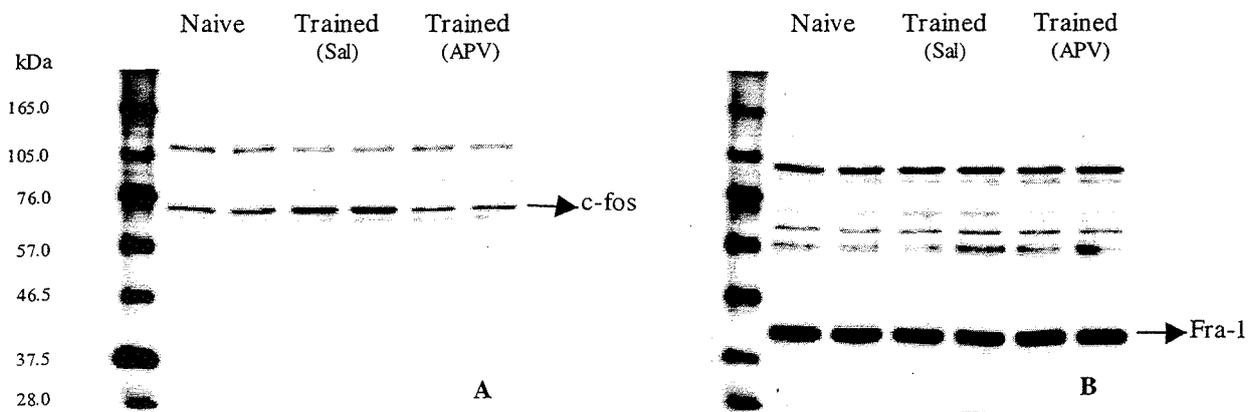
As proteínas Fos (c-Fos, Fos-B, FRA-1, FRA-2) e Jun (c-Jun, Jun-B, Jun-D) pertencem a uma família de fatores de transcrição que interatuam formando dímeros (Kaczmarek, 1993). Esta característica habilita estas proteínas para formar parte de um complexo ativador da transcrição denominado AP1 ("activator protein 1"). O complexo AP1 atua ativando a transcrição de genes cujos promotores contenham um sítio consenso GTGAGTc/aA (sítio AP1; "HeLa cell activator protein 1"), presente nos promotores de diversos genes eucarióticos (Sonnenberg e cols., 1989; Hengerer e cols., 1990).

Quando amostras provenientes dos grupos de animais treinados e infundidos com salina e sacrificados duas horas após o treino foram analisadas com um anticorpo anti-c-Fos, verificamos um aumento da quantidade da proteína Fos neste grupo experimental. Este aumento não foi observado nos animais treinados e infundidos com APV.

O painel A da Figura 27 apresenta um "Western Blot" representativo de 5 preparações independentes, onde pode ser observado claramente o aumento da imunoreatividade para esta proteína nos animais treinados e infundidos com salina [linhas "Trained" (sal)].

O experimento demonstrado em B foi realizado sobre a mesma membrana apresentada em A. Após a retirada do anticorpo primário anti-c-Fos, esta membrana foi reincubada com um anticorpo específico para FRA1 ("fos related antigen 1") e é representativa de 5 experimentos independentes. Como pode ser visto, as quantidades de Fra1 não encontram-se alteradas duas horas após o treino nos grupos experimentais estudados.

Figura 27: Imunorreatividade para c-Fos em extratos nucleares provenientes do hipocampo de animais controle absoluto (Naive; animais canulados e injetados com salina), treinados e injetados com salina ["Trained (sal)] ou treinados e injetados com APV [Trained (APV)] e sacrificados 2 horas após. A) experimento realizado com um anticorpo capaz de reconhecer o fator de transcrição c-fos. B) experimento realizado com um anticorpo capaz de reconhecer Fra-1.

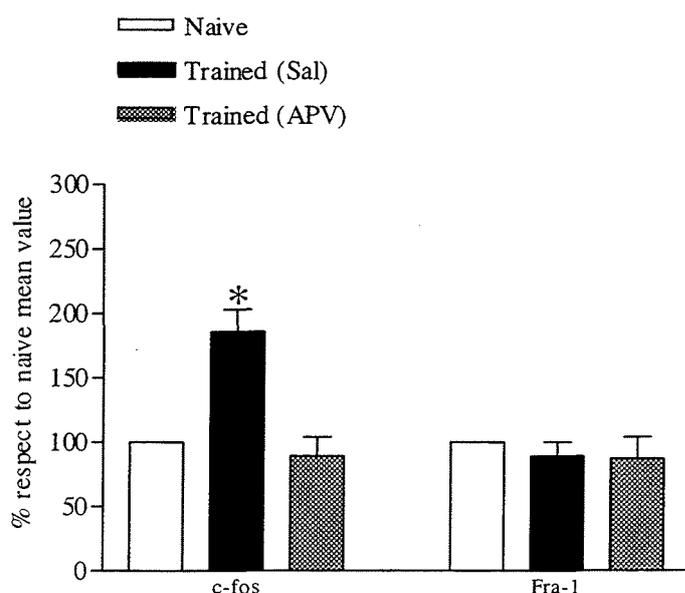


Como pode ser observado no painel A, o anticorpo anti-c-Fos reconhece duas bandas específicas e uma delas corresponde ao peso estimado de c-Fos, que é de aproximadamente 62 kDa. Curiosamente, no próprio experimento demonstrado em A, existe um controle interno da quantidade de proteína pipetada nos poços do gel,

representado pela banda que migra acima de c-Fos, a qual não apresenta nenhuma alteração relacionada com o aprendizado.

A Figura 28 representa as análises densitométricas dos experimentos realizados com os anticorpos anti-Fos e anti-Fra-1. Como pode ser visto, o aumento observado na imunoreatividade de Fos, através da técnica de "Western Blot", é significativo [ $*p < 0,05$ ; t de Student; "Trained" (sal) vs "Trained" (APV); n=5], enquanto que a imunoreatividade para a proteína Fra-1 não apresentou nenhuma alteração detectável duas horas após o treino em esquiva inibitória.

Figura 28: Análise densitométrica dos resultados apresentados na Figura 27.  $*p < 0,05$ .

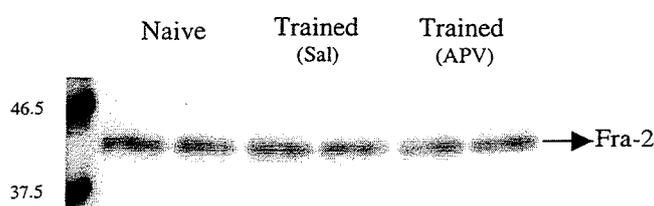


Estudos realizados com outros dois anticorpos, anti-Fra-2 e anti-Jun, representados nas Figuras 29 e 30 a seguir, demonstraram que os níveis destas proteínas não sofrem nenhuma alteração duas horas após o treino dos animais na nossa tarefa aversiva.



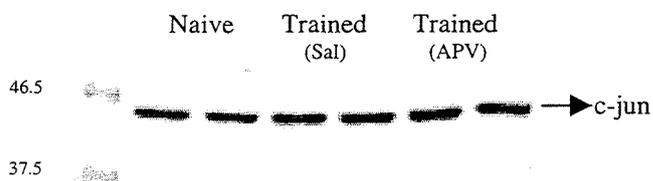
O "Western Blot" apresentado na Figura 29 é representativo de 4 preparações independentes, no qual podemos observar que, duas horas após o treino, não foram detectadas alterações relacionadas com o aprendizado nos níveis intranucleares de Fra-2.

Figura 29: Imunorreatividade para Fra-2 em extratos nucleares provenientes do hipocampo de animais controle absoluto (Naive; animais canulados e injetados com salina), treinados e injetados com salina ["Trained (sal)] ou treinados e injetados com APV [Trained (APV)] e sacrificados 2 horas após.



A Figura 30 apresenta os resultados representativos de 5 preparações independentes, quando utilizamos um anticorpo anti-c-Jun para analisar os extratos nucleares dos grupos experimentais estudados.

Figura 30: Imunorreatividade para c-Jun em extratos nucleares provenientes do hipocampo de animais controle absoluto (Naive; animais canulados e injetados com salina), treinados e injetados com salina ["Trained (sal)] ou treinados e injetados com APV [Trained (APV)] e sacrificados 2 horas após.



Além dos experimentos relacionados com a via MAPK/ELK1 apresentados nesta tese, também realizamos experimentos com um grupo controle relativo aos animais que receberam apenas choque, os quais não foram incluídos por motivo de restrição de espaço. O choque não provocou alteração, por si só, em nenhum dos parâmetros bioquímicos medidos.

Atualmente estamos concluindo a análise do curso temporal relacionado com as alterações observadas na via bioquímica MAPK/ELK1. Resultados preliminares indicam que não existem alterações significativas na imunoreatividade das proteínas ERK1/2, 30 minutos após o treino em esquivas inibitórias, ainda que tais alterações pareçam existir imediatamente depois do mesmo.

Iniciamos também o estudo do período compreendido entre 3 e 6 horas após o treino, com o objetivo de definir quando a ação destas quinases é fundamental para o processo de aquisição de memória para o aprendizado aversivo em questão.

Com base nos resultados obtidos, verificamos que duas horas após o treino existe um incremento da atividade das MAPKs no núcleo das células hipocâmpais dos animais estudados. Este incremento na atividade é dependente da funcionalidade dos receptores NMDA, pois a administração de um antagonista (APV) destes receptores previne o aparecimento da ativação observada para as quinases estudadas.

O aumento mencionado acima está associado com uma elevação na imunoreatividade de dois fatores de transcrição, ELK1 (na sua forma fosforilada) e Fos,

mas não está acompanhado de alterações na imunoreatividade para as proteínas Fra-1, Fra-2 e Jun.

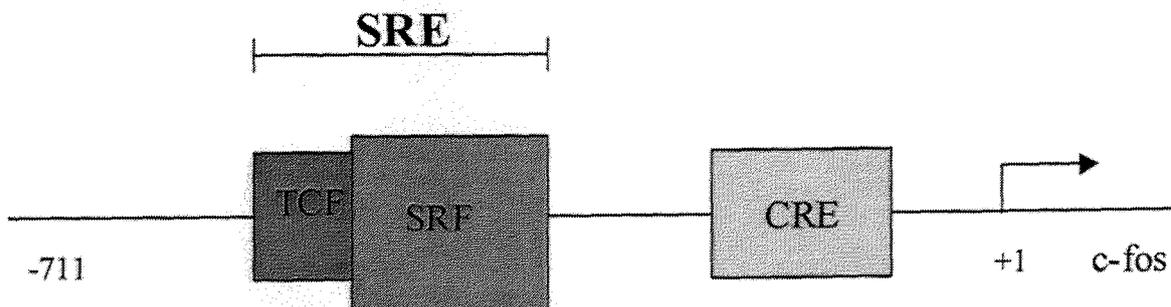
A ativação de ELK1 é capaz de promover o início da ativação de c-fos, através da formação de um complexo ternário no sítio SRE localizado no promotor do gene de c-fos (Shaw e cols., 1989). A ativação transcricional mediada por ELK1 parece ser dependente da entrada de  $Ca^{2+}$  via receptores NMDA. Em respeito a isto, Bading e Greenberg (1991) e Fiore e cols. (1993) descreveram a ativação de ERKs após o tratamento de cultivos celulares hipocâmpais e corticais com glutamato.

Os nossos resultados sugerem fortemente que a ativação da via das MAPKs estimula a expressão nuclear de Fos, duas horas após o treino em esquivas inibitórias. Além disto, as alterações observadas são dependentes da ativação dos receptores NMDA, já que são completamente bloqueadas pela administração intrahipocâmpal de APV.

Além disto, os resultados observados são específicos dos processos envolvidos no aprendizado desta tarefa, já que os animais que receberam apenas choque não apresentaram nenhuma alteração nos parâmetros avaliados.

Como pode ser observado no esquema apresentado na Figura 31, o promotor gênico de c-fos apresenta sítios de união para diversos fatores de transcrição, entre eles, ELK1 (liga-se ao sítio TCF), SRF (liga-se ao sítio SRF) e CREB (une-se à sequência consenso CRE).

Figura 31: Esquema representativo do promotor para o gen de c-fos.



A ativação da via MAP/ELK1, duas horas após o treino em esquiiva inibitória, correlaciona-se temporalmente com a ativação da cascata bioquímica AMPc/PKA/pCREB. Estas vias poderiam estar atuando conjuntamente no sentido de promover a transcrição de c-fos.

Com respeito a esta possibilidade, Fields e cols. (1997) descreveram que a regulação da expressão de c-fos, após a indução de breves potenciais de ação, requer tanto a ativação da via das MAPKs como a fosforilação de CREB em serina 133.

Além disto, existem evidências de que a ativação de CREB também possa ser mediada diretamente por mecanismos dependentes da via das MAPKs. Impey e cols. (1998) demonstraram que a translocação nuclear das proteínas ERK e RSK ("ribosomal S6 kinase"), esta última, capaz de fosforilar CREB em serina 133, dependem da ativação da enzima PKA.

O aprendizado aversivo envolvido no nosso paradigma experimental parece requerer a ativação destas duas vias bioquímicas de transdução de sinais, duas horas após o treino. Estas vias poderiam estar atuando separadamente, cada qual ativando um

conjunto de genes específicos relacionados com as alterações neuronais de longa duração que acredita-se, sejam as responsáveis pela formação e manutenção das memórias.

Por outro lado, estas duas vias poderiam estar atuando de maneira combinada, promovendo a transcrição de genes fundamentais tanto para processos envolvidos com a formação de memórias como naqueles verificados durante a indução de LTP em vários modelos animais.

Baseados nas informações geradas em nosso grupo de trabalho, poderíamos hipotetizar que a via das MAPKs, após ativada, atuaria promovendo a fosforilação e concomitante ativação das enzimas p44/p42, as quais, para serem translocadas ao núcleo e exercer sua função, poderiam depender da ativação da enzima PKA. As duas vias bioquímicas convergiriam no sentido de fornecer o meio bioquímico necessário para promover a transcrição de c-fos.

Os resultados obtidos e apresentados neste capítulo fornecem a primeira evidência da coativação de duas vias bioquímicas durante a fase de consolidação de uma memória, apresentando, desta maneira, uma grande importância para os futuros estudos dos mecanismos de plasticidade do SNC associados com o aprendizado.

**CREB**  
em  
Mitocôndrias  
Cerebrais  
Alterações  
relacionadas  
com o  
aprendizado

Como já ressaltado no capítulo anterior, o fator de transcrição CREB apresenta uma função muito importante ao nível da regulação da expressão gênica e é um terceiro mensageiro fundamental da via de sinalização intracelular AMPc/PKA.

Assim como CREB, outros fatores de transcrição são alvo de cascatas bioquímicas iniciadas pela união de um agonista ao seu receptor específico, como é o caso, por exemplo, do fator NF- $\kappa$ B. Este fator foi recentemente descrito em sinaptossomas provenientes do hipocampo e do córtex cerebral (Suzuki e cols, 1997), onde encontra-se intimamente associado com as densidades pós-sinápticas (PSDs).

Surpreendentemente, o fator de transcrição CREB também foi encontrado nas sinapses hipocâmpais. Crino e cols. (1998) descreveram a presença de CREB e de seu mRNA, bem como de Zif 268 (outro conhecido fator de transcrição) em dendritos e cones de crescimento do hipocampo. Os autores sugeriram que a presença e síntese destas proteínas, neste sítio inesperado, poderia fazer parte de um novo sistema de sinalização direta entre a sinapse e o núcleo celular, com a função de regular a transcrição gênica necessária para o crescimento neuronal.

Cabe ressaltar que muitas proteínas relacionadas com o crescimento e desenvolvimento neuronal são sintetizadas nos dendritos e cones de crescimento de neurônios hipocâmpais. Os mRNAs

normalmente encontrados nos sítios sinápticos incluem tanto mensageiros para elementos do citoesqueleto como para receptores de fatores neurotróficos, enzimas e algumas subunidades de receptores.

Através de estudos de "Southwestern" , Crino e cols. (1998) verificaram que a proteína CREB encontrada em dendritos apresenta a capacidade de ligar-se a uma sequência CRE e pode ser fosforilada em ser 133 de maneira independente do núcleo. Neste mesmo trabalho, demonstraram que o mRNA para CREB é traduzido nos dendritos. A proteína CREB presente nos sítios sinápticos parece não ser oriunda do núcleo, já que CREB microperfundida no soma celular não foi transportada até os dendritos. Ao contrário, CREB microperfundido nos dendritos foi rapidamente transportado ao núcleo celular.

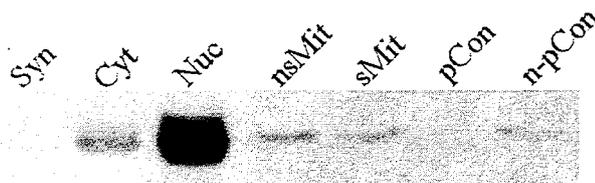
Estes interessantes resultados sugerem a existência de uma via bioquímica regulatória, na qual os fatores de transcrição sintetizados e modificados após a tradução nos dendritos, poderiam atuar regulando a expressão gênica de uma maneira completamente desconhecida.

De maneira alternativa e talvez complementar à hipótese apresentada acima, CREB (e outros fatores de transcrição localizados nas sinapses) poderia exercer sua ação de maneira local, atuando como sinal de ancoramento de mRNAs cuja tradução aconteça nas sinapses ou, ainda, poderia regular a transcrição nas próprias sinapses, modulando a expressão gênica mitocondrial.

Com o objetivo de comprovar nossa hipótese, decidimos investigar a presença de CREB nos compartimentos subsinápticos. Para tanto, obtivemos distintas frações subcelulares provenientes do hipocampo e córtex cerebral, utilizando o método de Lai and Clark, 1979.

Como pode ser observado na Figura 32, mediante a utilização de um anticorpo que reconhece tanto a forma fosforilada como a não fosforilada de CREB, detectamos imunoreatividade em diversas frações hipocâmpais. Esta série de experimentos corrobora a presença de CREB em citosol (Cyt), núcleo (Nuc) e sinaptossomas (Syn) e demonstra, surpreendentemente, a localização mitocondrial de CREB [mitocôndrias não sinápticas (nsMit), mitocôndrias sinápticas (sMit)]. Como controle foi utilizada uma linhagem celular SK-N-MC (n-pCon; BioLabs).

Figura 32: Imunorreatividade para CREB total em sinaptossomas (Syn), citosol (Cyt), núcleos (Nuc), mitocôndrias não sinápticas (nsMit), mitocôndrias sinápticas (sMit). pCon = controle para a forma fosforilada de CREB. N-pCon = controle da forma não fosforilada de CREB.

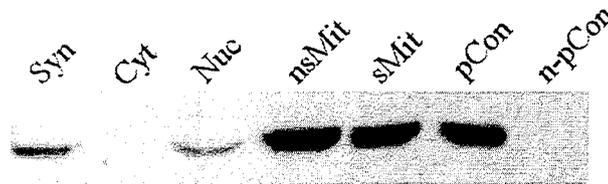


Para verificar a presença deste fator de transcrição na sua forma fosforilada em ser 133, em mitocôndrias, o conjunto de experimentos representados pela Figura 32 foi tratado com um tampão de “stripping” (Ginty e cols., 1993) durante 1 hora à 70°C (para retirar o anticorpo anti-CREB; Ginty e cols., 1993) e reincubado com um anticorpo que



reconhece especificamente a forma fosforilada de CREB, pCREB (BioLabs). Como pode ser visto na Figura 33, pCREB está presente em Syn, Nuc, nsMit e sMit. Neste caso, o controle positivo consistiu da linhagem celular SK-N-MC tratada com forskolina e FGF (pCon; BioLabs).

Figura 33: Imunorreatividade para a forma fosforilada de CREB, pCREB, em sinaptossomas (Syn), citosol (Cyt), núcleos (Nuc), mitocôndrias não sinápticas (nsMit) e mitocôndrias sinápticas (sMit), utilizando um anticorpo gerado contra os aminoácidos 129-137 de fosfo-CREB. pCon = controle para a forma fosforilada de CREB. N-pCon = controle da forma não fosforilada de CREB.



Com o objetivo de corroborar estes resultados e para verificar a presença de pCREB em membranas sinaptossomais (Spm), utilizamos outro anticorpo também específico para a forma fosforilada em ser 133 (Figura 34; Ginty e cols., 1993). Novamente, verificamos a presença de pCREB em nsMit, sMit e em Syn. Em Spm a imunoreatividade observada foi quase imperceptível.

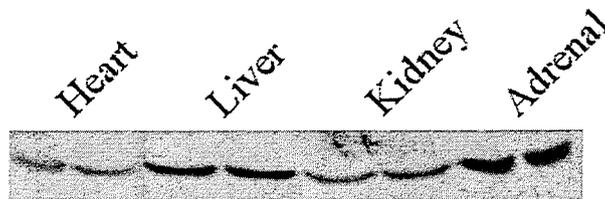
Os resultados parecem demonstrar que a maior parte da proteína CREB presente nos terminais sinápticos encontra-se associada às mitocôndrias contidas nesta estrutura.

Figura 34: Imunorreatividade para a forma fosforilada de CREB em mitocôndrias não sinápticas (nsMit), mitocôndrias sinápticas (sMit), membranas sinaptossomais (Spm) e sinaptossomas (Syn), utilizando um anticorpo gerado contra os aminoácidos 123-126 de fosfo-CREB. pCon = controle para a forma fosforilada de CREB.



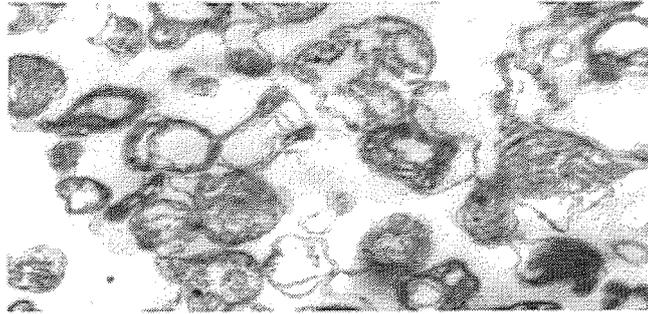
Como pode ser observado na Figura 35, CREB também foi encontrado em mitocôndrias de outros tecidos, tais como coração (Heart), fígado (Liver), rins (Kidney) e adrenais (Adrenal).

Figura 35: Presença de CREB em preparações mitocondriais provenientes de coração ("Heart"), fígado ("Liver"), rins ("Kidney") e adrenais ("Adrenal") de ratas.



Para verificar a pureza das frações subcelulares utilizadas, realizamos um controle eletromicroscópico das mesmas. Como pode ser visto na Figura 36, nossa preparação encontrava-se composta exclusivamente por mitocôndrias, validando morfológicamente os resultados encontrados e excluindo a possibilidade de contaminação das frações mitocondriais com outros componentes celulares.

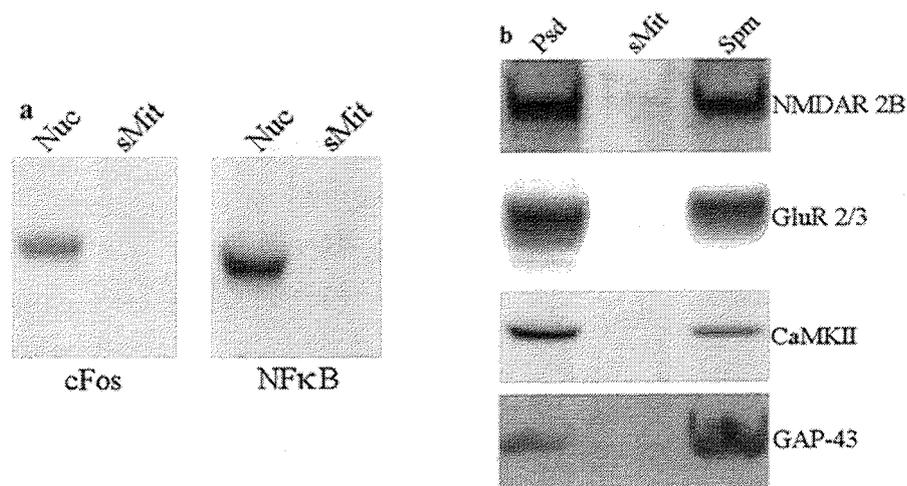
Figura 36: Microscopia eletrônica das preparações mitocondriais utilizadas.



Visando descartar completamente a possibilidade de contaminação nuclear ou de algum outro componente sináptico, testamos nossa fração sMit com anticorpos que reconhecem proteínas de localização tipicamente nuclear ou sináptica.

Como pode ser observado na Figura 37, as frações mitocondriais utilizadas não apresentam imunoreatividade para c-Fos e NF- $\kappa$ B (p65), dois fatores de transcrição tipicamente nucleares (Fig 6a; ver linhas "Nuc"). Da mesma maneira, não detectamos imunoreatividade para proteínas intimamente associadas com a sinapse, como é o caso dos receptores NMDA 2B e GluR 2/3 (proteínas localizadas principalmente nas regiões pós-sinápticas) ou da proteína GAP-43, encontrada principalmente na pré-sinapse. Imunoreatividade para a subunidade  $\alpha$  da enzima CaMKII não foi detectada nas frações de sMit. Todas as proteínas mencionadas acima foram encontradas nas frações nas quais normalmente estão presentes [Fig. 6b; ver linhas Psd ("post-synaptic densities") e Spm ("synaptic plasma membranes")].

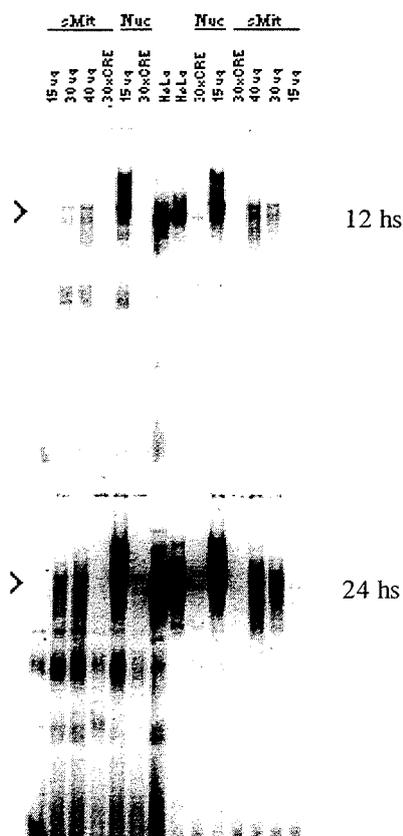
Figura 37: Imunorreatividade para proteínas que apresentam localização tipicamente nuclear (cFos, NFκB) ou encontram-se tipicamente associadas com a região sináptica (NMDAR 2B, GluR2/3, CaMKII, GAP-43) em frações nucleares (Nuc), mitocôndrias sinápticas (sMit), densidades pós-sinápticas (Psd) e membranas sinaptossomais (Spm).



Devido às suas propriedades de dimerização e transativação, CREB pode ligar-se a seqüências de DNA e promover a transcrição gênica. Decidimos, então, verificar se a proteína CREB encontrada em mitocôndrias apresentava a capacidade de ligar-se, *in vitro*, a uma seqüência CRE marcada radioativamente. Com este objetivo, realizamos experimentos de EMSA. A figura 38 apresenta os resultados obtidos quando extratos de mitocôndrias sinápticas (ExtMit; sMit) foram incubados com a sonda de DNA. Com baixas concentração de proteína (linhas “15 µg”) não foi possível observar nenhuma banda de união específica à sonda; mas, na medida em que a concentração protéica foi aumentada (linhas “30 e 40 µg”), alguns complexos de união à sonda foram observados (>). Os complexos formados são específicos já que a co-incubação da mistura descrita

acima, na presença de um excesso de sonda não radioativa, produz um deslocamento claro e completo da sonda marcada (linhas “30X CRE”). As reações realizadas com extratos nucleares (ExtNuc) e com a linhagem celular HeLa (Promega) serviram como controles (linhas Nuc e HeLa).

Figura 38: Ensaio de alteração da mobilidade eletroforética (EMSA) em extratos mitocondriais (Ext.Mit, sMit) e nucleares (Nuc), utilizando distintas concentrações proteicas (15, 30 e 40 µg). A especificidade dos complexos formados entre proteínas presentes nos extratos e a sonda de DNA (>) foi verificada a partir da incubação, juntamente com as reacções de ligação específica, de um excesso de sonda de DNA não marcada radioativamente (30XCRE). HeLa = extrato celular controle. 12 e 24 hs = tempo de exposição do filme.

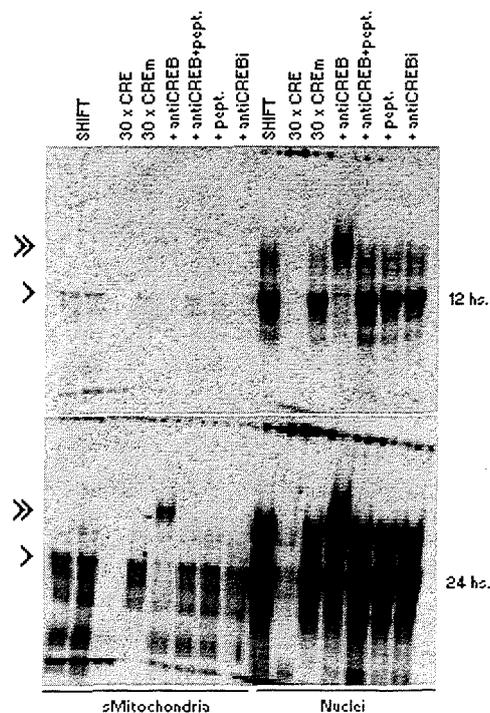


Para corroborar estes resultados, realizamos experimentos de EMSA tanto para ExtMit (Figura 39; linhas "sMitochondria"; 30  $\mu$ g) como para ExtNuc (Figura 39; linhas "Nuclei"; 15  $\mu$ g) provenientes do hipocampo, agregando controles de especificidade adicionais.

A Figura 39 demonstra, então, a atividade de união específica observada nos extratos de ambas frações celulares com 12 (12hs) ou 24 (24hs) horas de exposição do filme. As linhas identificadas como "SHIFT" e as setas ">" indicam as bandas formadas pela ligação de CREB à sonda CRE. A atividade de união verificada em ExtMit é bastante semelhante a observada em ExtNuc, demonstrando que a proteína CREB encontrada nas mitocôndrias apresenta propriedades de ligação ao DNA semelhante as apresentadas pelo CREB nuclear.

A especificidade das bandas formadas foi verificada através da incubação, juntamente com a mistura de reação, de um excesso de sonda CRE e sonda CRE mutada não radioativas (linhas "30 X CRE" e "30 X CREm", respectivamente). Como pode ser observado, a incubação, com um excesso de sonda CRE não marcada, deslocou completamente a sonda marcada, como já demonstrado anteriormente na Figura 38. Ao contrário disso, a incubação com um excesso do oligonucleotídeo mutado não produziu nenhuma inibição sobre a formação dos complexos (linhas "30 X CREm").

Figura 39: Ensaio de alteração da mobilidade eletroforética (EMSA) em extratos provenientes de mitocôndrias sinápticas (sMitochondria) e nucleares (Nuclei). “SHIFT” = complexos formados entre proteínas presentes nos extratos e a sonda de DNA. A especificidade das bandas formadas foi verificada a partir da incubação de um excesso de sonda não marcada radioativamente, juntamente com as reações de ligação (30xCRE, 30xCREm). A presença de CREB nos complexos formados foi verificado através da incubação, juntamente com a reação de ligação, de anticorpos capazes de reconhecer CREB (+antiCREB). A inativação do anticorpo (+antiCREBi) ou a inclusão de um peptídeo sintético correspondente aos resíduos 123 a 135 de CREB (+antiCREB+pept) nas reações de ligação, previnem o deslocamento dos complexos formados com a sonda de DNA. A presença do mencionado peptídeo não provocou, por si só, nenhuma alteração na formação dos complexos proteína/DNA (+pept). >: Complexos formados a partir da incubação dos extratos mitocondrias e nucleares com a sonda de DNA. >>: super-desplacamento dos complexos de união específica. 12 e 24 hs = tempo de exposição do filme.



Para verificar a presença de CREB nos complexos formados, incubamos, juntamente com a mistura de reação, 1  $\mu$ l de anticorpo anti-CREB (linhas "+antiCREB"). A incubação com este anticorpo provocou um retardo na mobilidade eletroforética (>>) de alguns complexos (>), indicando a presença de CREB nos mesmos.

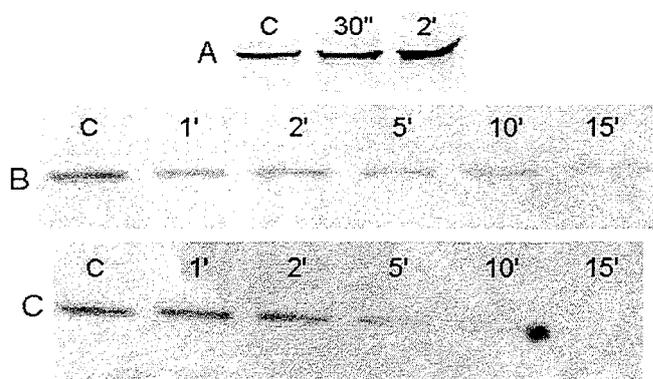
Como controle de especificidade das reações de "supershift" incluímos, nas mesmas, 1  $\mu$ l de anti-CREB inativado (linhas "+antiCREBi") ou 1  $\mu$ g de um peptídeo sintético correspondente aos resíduos 123 a 135 de CREB (linhas "+antiCREB+pept."). Em ambos casos, o "supershift" anteriormente observado foi completamente eliminado. A incubação das misturas de reação apenas com o peptídeo não apresentou nenhum efeito sobre a formação das bandas específicas (linhas "+ pept").

Com o objetivo de verificar se o CREB mitocondrial é capaz de sofrer, *in vitro*, alguma das modificações covalentes (i.e. fosforilação, desfosforilação) características de seu correlato nuclear, submetemos a nossa preparação de sMit (previamente inativada pela ação do calor) a ensaios de fosforilação e desfosforilação em presença de enzimas purificadas (Figura 40).

Estes experimentos demonstraram que o CREB mitocondrial pode ser fosforilado pela subunidade catalítica da PKA (Fig 40 A) e desfosforilado tanto por PP2B (Fig 40 B) como por PP1 (Fig 40 C).

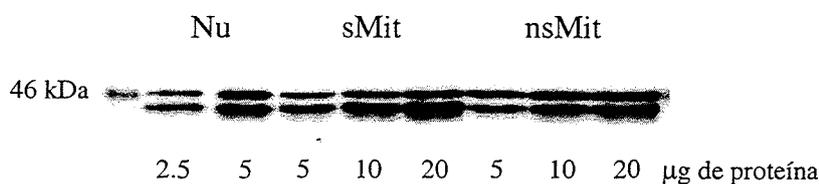


Figura 40: Fosforilação e defosforilação do CREB presente em extratos mitocondriais. Painei A) Fosforilação de CREB pela subunidade catalítica da enzima PKA. C = controle. 30'' e 2' referem-se ao tempo de duração dos ensaios apresentados. Painei B) Defosforilação de CREB pela proteína fosfatase 2B. C = Controle. 1', 2', 5', 10' e 15' referem-se ao tempo de duração dos ensaios apresentados. Painei C) Defosforilação de CREB pela proteína fosfatase C = controle. 1. 1', 2', 5', 10' e 15' referem-se ao tempo de duração dos ensaios apresentados.



Para verificar se alguma destas reações poderia acontecer *in vivo*, decidimos testar a presença da subunidade catalítica de PKA em sMit hipocampais. Esta enzima já foi descrita em mitocôndrias de tecidos periféricos, nos quais é responsável pela fosforilação de proteínas relacionadas com a respiração celular (Sardanelli e cols, 1996; Yang e cols., 1998) e também de um canal iônico voltagem dependente (Bera e cols., 1995). Através da técnica de "Western Blot", demonstramos a presença de PKA nas frações mitocondriais que utilizamos. Como pode ser observado na Figura 41, a subunidade catalítica da PKA está presente em sMit e nsMit provenientes do hipocampo. Como controle destes experimentos utilizamos distintas concentrações de extratos nucleares hipocampais (Nu).

Figura 41: Presença da subunidade catalítica da PKA em núcleos (Nu), mitocôndrias sinápticas (Smit) e não sinápticas (nsMit). 2.5, 5, 10 e 20  $\mu\text{g}$  referem-se a quantidade de proteína no gel.



Uma vez definida a presença de CREB em sMit e nsMit hipocampais, decidimos estudar sua localização submitocondrial. Para isto, tratamos nossas frações mitocondriais com NaCl 1M, KSCN 0,5 M ou Triton X-100 0,5 %, durante 30 minutos à 4°C (Figura 42). Após a centrifugação das preparações tratadas da maneira mencionada acima, analisamos o "pellet" obtido, através da técnica de "Western Blot"

Figura 42: Tratamento das frações de mitocôndrias sinápticas com NaCl 1M, KSCN 0.5M e Triton (TX-100) 0.5%. Control = controle.

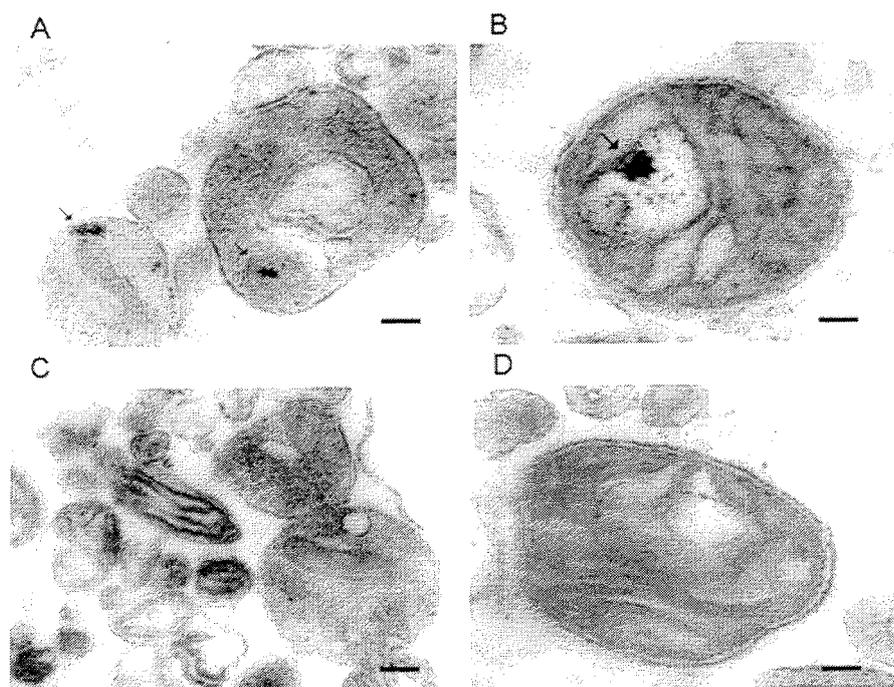


Estes experimentos tiveram como objetivo verificar se algum destes agentes era capaz de eliminar a imunoreatividade para pCREB observada nas sMit. O tratamento com Triton X-100 produziu uma marcante diminuição da imunoreatividade de pCREB, enquanto que o tratamento com NaCl ou com KSCN não produziu nenhuma diminuição

detectável nos níveis de pCREB. Estes resultados sugerem que CREB está especificamente associado com alguma das duas membranas mitocondriais ("Control"= frações mitocondriais que não sofreram nenhum tratamento).

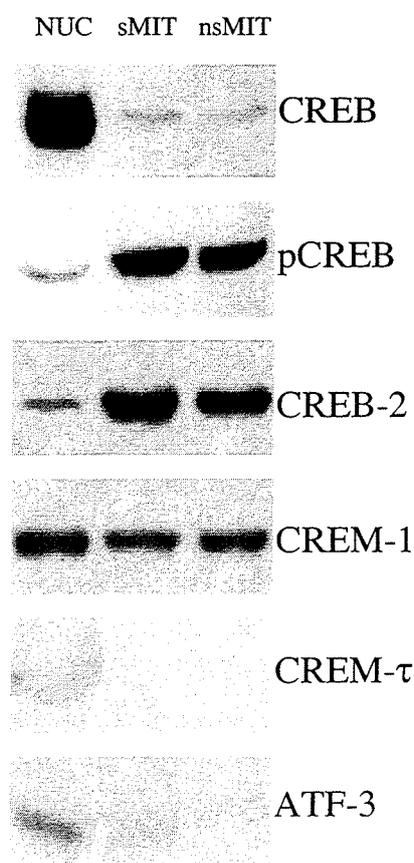
Estes resultados foram corroborados e estendidos através da imunoeletrolocalização de CREB em uma fração mitocondrial crua (Lai and Clark, 1979). Como pode ser observado na Figura 43, existe uma marcante imunoreatividade específica para pCREB, localizada na membrana mitocondrial interna (seta; Fig 43 B). Em terminais sinápticos, a imunoreatividade para pCREB é encontrada principalmente em mitocôndrias (seta; Fig 43 A). As Figuras 43 C e D representam seções controles, nas quais foram omitidos os anticorpos primário ou secundário, respectivamente.

Figura 43: Imunolocalização de CREB em frações mitocondriais cruas. Os painéis A e B demonstram que CREB está localizado nas mitocôndrias presentes nos terminais sinápticos. As setas indicam imunoreatividade positiva para CREB. Painéis C e D: seções controle.



Além de CREB e pCREB em sMit e nsMit, verificamos a presença de outros dois membros desta família de fatores de transcrição, CREB-2 ("Cyclic-AMP responsive element binding protein 2") e CREM-1 ("Cyclic-AMP responsive element modulator 1"). Nenhuma imunoreatividade foi observada para outros dois componentes testados, CREM- $\tau$  ("Cyclic-AMP responsive element modulator  $\tau$ ") e ATF-3 ("Activating transcription factor 3"). Estes resultados podem ser observados na Figura 44. Todos estes fatores encontram-se presentes na fração nuclear (NUC), onde estão tipicamente localizados.

Figura 44: Presença de CREB, pCREB, CREB-2 e CREM-1 em mitocôndrias sinápticas (sMIT) e não sinápticas (nsMIT). As proteínas CREM- $\tau$  e ATF-3 foram observadas apenas em frações provenientes de núcleos (NUC).



O gene para a proteína moduladora CREM ("CRE modulator") codifica um grande número de proteínas, as quais podem modular a atividade de CREB positiva ou negativamente. Entre as isoformas que regulam negativamente a transcrição encontram-se CREM-1, CREM- $\alpha$ , CREM- $\beta$ , CREM- $\gamma$  e S-CREM. As isoformas ativadoras são CREM- $\tau$ , CREM- $\tau$ 1 e CREM- $\tau$ 2. As proteínas repressoras apresentam como característica a ausência do domínio rico em glutamina (Laoide e cols., 1993) ou do sítio fosfoceptor (Delmas e cols., 1992) e são originadas a partir de "splicing" alternativo, início alternativo da transcrição ou uso alternativo do promotor (Molina e cols., 1993). As isoformas com capacidade de ativação transcricional apresentam um ou mais domínios ricos em glutamina (Foulkes e cols., 1992). O outro membro da família CREB/ATF de fatores de transcrição encontrado na fração mitocondrial, CREB-2, caracteriza-se por exercer uma ação repressora sobre a transcrição gênica regulada pelo AMPc. A região responsável pela atividade antagonista foi localizada na região que contém os aminoácidos 294 - 351, os quais encontram-se na região COOH terminal (Karspinski e cols., 1992). Esta proteína não contém o sítio para fosforilação pela enzima PKA (Gachon e cols., 1998).

Os resultados atuais demonstram a presença de CREB e de sua forma fosforilada em ser 133, além de outros membros desta família de fatores de transcrição, em mitocôndrias neuronais e abrem uma nova e excitante perspectiva de estudo, referida a participação das vias de transdução de sinais mediadas por AMPc/PKA no controle da

função mitocondrial. Ao mesmo tempo, os resultados encontrados permitem hipotetizar à respeito do envolvimento desta organela nos processos de plasticidade sináptica.

Em relação ao exposto e devido ao envolvimento de pCREB durante a formação de memória para a tarefa de Esquiva Inibitória (ver capítulo anterior desta tese), resolvemos estudar o que acontecia com os níveis de pCREB mitocondriais, após submeter o animal ao treino neste paradigma.

Dados recentes de Williams e cols. (1998) demonstraram que a atividade sináptica provoca o aumento da expressão gênica mitocondrial. Os autores verificaram que a expressão do rRNA 12S encontrava-se aumentada 48 após a indução de LTP, no giro dentado. Análises através de "Northern Blot" demonstraram que os níveis deste rRNA mitocondrial começavam a aumentar 8 horas após a indução de LTP e permaneciam incrementados por um período de até duas semanas. O mesmo efeito foi descrito nas áreas CA1 e CA3 hipocâmpais. Os autores sugeriram que o aumento da expressão gênica mitocondrial pode estar relacionado com as alterações de longa duração necessárias para a formação e manutenção da LTP. As mencionadas organelas estão intimamente relacionadas com a regulação dos níveis de  $Ca^{2+}$  intracelulares (Thayer and Miller, 1990; Herrington et al., 1996) e o importe de  $Ca^{2+}$  para a mitocôndria, com posterior liberação para o citoplasma, parece ser importante para evitar a saturação celular dos sinais mediados por este íon.

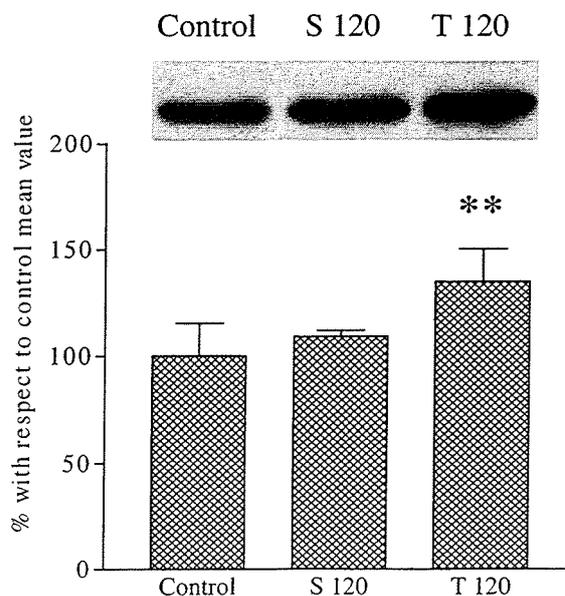
Resultados de Tang and Zucker (1997) sugerem que as mitocôndrias estão relacionadas com a geração e manutenção de potenciais pós-tetânicos.

Estudos realizados por Bennett e cols. (1996) demonstraram que a inibição parcial da atividade da enzima mitocondrial citocromo oxidase provoca um déficit de aprendizado para a tarefa de "Water Maze". Os alvos do efeito amnésico desta inibição parecem ser as mitocôndrias sinápticas, já que estas são mais sensíveis a ação das drogas empregadas no estudo.

Os estudos mencionados ressaltam a importância da atividade mitocondrial em mecanismos sinápticos do SNC e sugerem o envolvimento das mesmas nos mecanismos de plasticidade neuronal.

Com respeito ao nosso paradigma e como pode ser visto na Figura 45, o treinamento na tarefa aversiva de esQUIVA inibitória provocou um aumento nos níveis de pCREB encontrado nas sMit hipocampais, duas horas após o treino em esQUIVA inibitória (\*\* $p < 0,01$ ; ANOVA seguida de Newman-Keuls;  $n=7$ ; T 120).

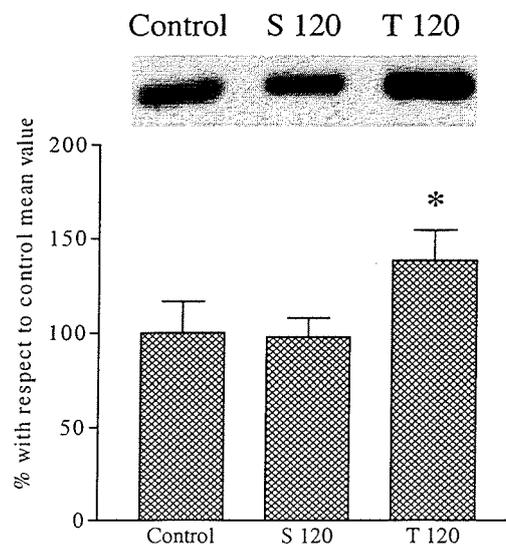
Figura 45: Imunorreatividade para pCREB, em amostras provenientes de mitocôndrias sinápticas hipocampais, 2 horas após o treino (T120) ou choque (S120). "Control" = controle. \*\* $p < 0,01$ .



Os animais que receberam apenas choque não diferiram dos animais controles. A parte superior da figura 45 apresenta um "Western Blot" representativo de 7 experimentos independentes e a análise densitométrica das amostras encontra-se representada na parte inferior.

Para verificar se o aumento observado foi devido a um aumento da proteína CREB total ou consequência de uma modificação no estado de fosforilação da proteína que já se encontrava dentro da mitocôndria, realizamos análises de "Western Blot" utilizando um anticorpo anti-CREB. A parte superior da Figura 46 apresenta um "Western Blot" representativo de 5 experimentos independentes. Como pode ser observado, os níveis totais da proteína CREB estão aumentados duas horas após o treino (\* $p < 0,05$ ; ANOVA seguida de Newman-Keuls;  $n=5$ ; T 120) em sMit hipocampais. Os animais que receberam apenas choque (S 120) apresentaram imunoreatividade semelhante a apresentada pelos animais controle ("Control").

Figura 46: Imunorreatividade para CREB total, em amostras provenientes de mitocôndrias sinápticas hipocampais, 2 horas após o treino (T120) ou choque (S120). "Control" = controle. \* $p < 0,05$ .



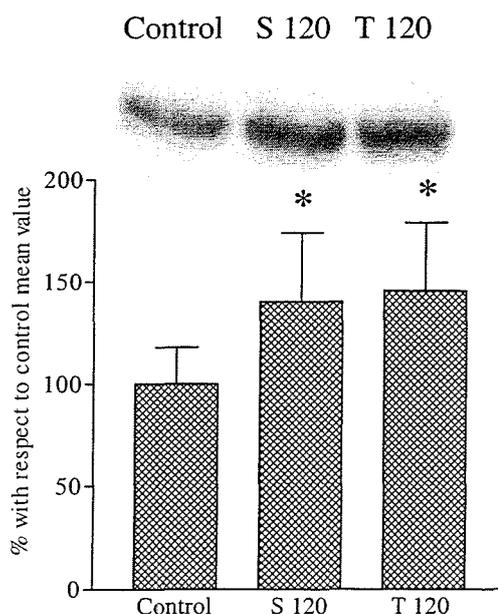


O gráfico apresentado na parte inferior da Figura 46 representa a análise densitométrica das amostras.

Os resultados sugerem um incremento nos níveis totais de CREB intramitocondrial, concomitantemente com um aumento do seu estado de fosforilação, duas horas após o treino em esQUIVA inibitória.

Para verificar se o aumento observado acontecia especificamente em sMit, realizamos experimentos para testar se os níveis de pCREB encontravam-se alterados em nsMit hipocampais, duas horas após o treino. Como pode ser visto na Figura 47, níveis aumentados de pCREB foram observados tanto em animais treinados como em animais que receberam apenas choque e que foram sacrificados duas horas após (\* $p < 0,05$ ; ANOVA seguida de Newman-Keuls;  $n=6$ ; "Control" = grupo controle).

Figura 47: Imunorreatividade para pCREB, em amostras provenientes de mitocôndrias não sinápticas hipocampais, 2 horas após o treino (T120) ou choque (S120). "Control" = controle. \* $p < 0,05$ .

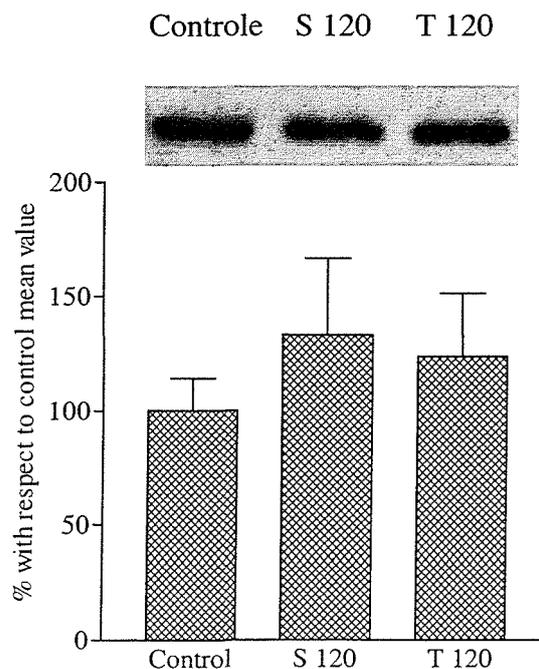


Estes resultados sugerem que as alterações observadas nos níveis de pCREB em mitocôndrias extrasinápticas não são específicas do aprendizado, pois o choque, por si só, é capaz de induzi-las.

Para estudar o envolvimento de CREM1 com o aprendizado para a tarefa de esQUIVA inibitória, realizamos experimentos de "Western Blot" com preparações de mitocôndrias sinápticas hipocâmpais obtidas a partir de animais controles ("Control") ou de animais treinados (T 120) ou choqueados (S 120) e sacrificados duas horas após.

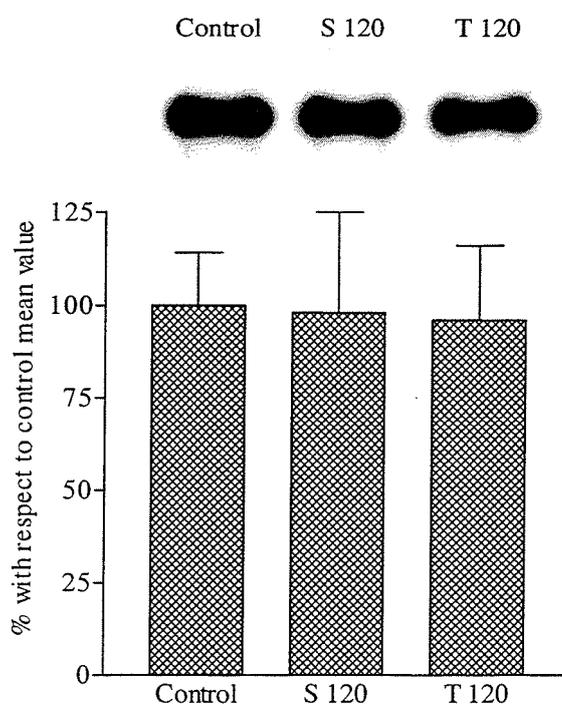
Como pode ser observado na Figura 48, nenhuma alteração na imunoreatividade para CREM-1 foi observada entre os distintos grupos experimentais. O "Western Blot" apresentado na parte superior da figura é representativo de 5 preparações independentes. O histograma da parte inferior representa a análise densitométrica das amostras.

Figura 48: Imunorreatividade para CREM1, em amostras provenientes de mitocôndrias sinápticas hipocâmpais, 2 horas após o treino (T120) ou choque (S120). "Control" = controle.



Como pode ser observado na Figura 49, realizamos experimentos com sMit hipocâmpais provenientes dos mesmos grupos experimentais mencionados anteriormente, com o objetivo de estudar as possíveis alterações nas quantidades de CREB-2 que pudessem ocorrer como consequência do aprendizado. Nenhuma alteração nos níveis desta proteína foi observado duas horas após o treino em esQUIVA inibitória.

Figura 49: Imunorreatividade para CREB-2, em amostras provenientes de mitocôndrias sinápticas hipocâmpais, 2 horas após o treino (T120) ou choque (S120). "Control" = controle. \* $p < 0,05$ .



O conjunto dos resultados apresentados neste capítulo sugere uma função completamente desconhecida para fatores de transcrição, até então, associados especificamente com a regulação transcricional nuclear.

O CREB presente nas sinapses hipocâmpais, em sinaptossomas e em membranas plasmáticas, poderia estar relacionado com as alterações moleculares que subjacem os

mecanismos de plasticidade neuronal. Esta proteína, bem como outros fatores de transcrição localizados nos dendritos, poderia estar envolvida com os processos de sinalização de eventos específicos que ocorrem em resposta a um determinado estímulo extracelular, permitindo que uma sinapse ou um grupo de sinapses ativadas a partir de um aprendizado sejam “visualizadas” pela maquinaria celular responsável pelos processos de plasticidade.

Já a presença de CREB, pCREB, CREM-1 e CREB-2 em mitocôndrias sugere uma possível participação das mesmas na modulação da atividade gênica mitocondrial.

Nossos resultados demonstraram que os níveis de CREB e pCREB encontram-se aumentados em mitocôndrias sinápticas hipocâmpais, 2 horas após o aprendizado de uma tarefa aversiva indicando, talvez, a existência de uma maior atividade mitocondrial nos animais submetidos ao tratamento em questão. O aumento da atividade mitocondrial poderia estar associado a um aumento do requerimento energético celular, necessário para o perfeito funcionamento dos processos celulares ativados em consequência do processo de aprendizagem.

A proteína CREB presente em mitocôndrias sinápticas hipocâmpais apresenta características semelhantes as apresentadas pelo CREB nuclear. *In vitro*, CREB presente em sMit liga-se a uma seqüência CRE e pode ser fosforilada pela enzima dependente de AMPc e desfosforilada pelas proteínas fosfatases PP1 e PP2B. Estas enzimas poderiam atuar modulando a atividade de CREB nos dendritos e nas mitocôndrias sinápticas hipocâmpais.

Estes achados, em conjunto, abrem a possibilidade de uma nova abordagem no estudo das alterações moleculares relacionadas com o aprendizado de uma tarefa aversiva e com a função mitocondrial sináptica.

# Resumo

Esta tese tratou do estudo de mecanismos relacionados com a aquisição de memória para a tarefa de esquiva inibitória.

O envolvimento da via bioquímica AMPc/CREB/PKA foi estudado a partir de enfoques farmacológicos e bioquímico-moleculares. Os experimentos farmacológicos constaram da infusão intra-hipocampal de drogas que apresentavam efeito sobre algum componente relacionado com a mencionada via (Forskolina, 8-Br-AMPc; KT5720) e da infusão de agonistas (SKF38393, noradrenalina, 8-OH-DPAT) ou antagonistas (NAN-190, timolol, SCH23390) de sistemas neuronais que, acredita-se, atuam de maneira regulatória sobre os processos de formação de memórias. Os estudos farmacológicos revelaram o envolvimento dos receptores dopaminérgicos, serotoninérgicos e noradrenérgicos com a formação de memória para a tarefa de esquiva inibitória, principalmente no período compreendido entre 3 e 6 hs após o treino. Também comprovamos o envolvimento da enzima PKA durante os processos de plasticidade sináptica envolvidos com a formação de memória para a mencionada tarefa de aprendizado. Estudos bioquímicos demonstraram um aumento da atividade de PKA em amostras provenientes dos animais treinados e sacrificados 3, 6 e 9 hs após o treino, bem como um aumento da imunorreatividade para a subunidade catalítica da mencionada enzima, 2 hs após o treino.

Também verificamos um aumento no estado de fosforilação de um substrato da PKA, o fator de transcrição CREB e um aumento na atividade de ligação a uma sonda de DNA (que contém a região consenso à qual CREB se liga) em amostras provenientes de animais submetidos ao treino em esQUIVA inibitória e sacrificados 2hs após.

Além da via AMPc/CREB/PKA, a via bioquímica das MAPKs também parece participar dos processos de formação de memória para o paradigma em questão. O estado de fosforilação e a atividade das enzimas p42 e p44 encontram-se aumentados 2 hs após o treino em esQUIVA inibitória. O aumento observado relaciona-se com um aumento, também 2 hs após o treino, dos níveis dos fatores de transcrição Elk-1 e c-fos, substratos passíveis de regulação pelas MAPKs.

Para finalizar, descrevemos a presença de CREB e sua forma fosforilada, pCREB, nas mitocôndrias sinápticas e extra-sinápticas do sistema nervoso central. Os níveis de CREB presente nas mitocôndrias sinápticas encontram-se aumentados 2 hs após o treino em esQUIVA inibitória, indicando um possível envolvimento do mesmo com os processos de formação de memória para o paradigma estudado. Além de CREB, descrevemos a presença de CREM-1 e CREB-2 nas mitocôndrias sinápticas do SNC. Os níveis destes fatores de transcrição não encontram-se alterados 2 hs após o treino.

## Conclusões

Os estudos realizados durante o período que durou este trabalho de doutorado aportaram vários resultados importantes para a elucidação dos mecanismos envolvidos com o processo de formação de uma memória do tipo aversivo, a saber:

- 1) Demonstramos, através de experimentos farmacológicos e análises bioquímico-moleculares, o envolvimento da via bioquímica AMPc/PKA/pCREB com os processos de formação de memória para a tarefa de esquiva inibitória,
- 2) Demonstramos a participação da via bioquímica das MAPKs na formação de memória para a tarefa de esquiva inibitória.
- 3) Descrevemos, pela primeira vez, a presença de um fator de transcrição tipicamente nuclear, CREB, nas mitocôndrias sinápticas e extra-sinápticas do sistema nervoso central e demonstramos o seu envolvimento com os mecanismos que subjacem a formação de memória para o paradigma de esquiva inibitória. Além de CREB, verificamos a presença de outros dois fatores de transcrição relacionados com a família CREB de fatores de transcrição, CREM1 e CREB-2, nas mitocôndrias sinápticas.



1. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

2. Alberini CM, Ghirardi M, Metz R, Kandel ER (1994). *Cell* 76: 1099-114.
3. Antkiewicz-Michaluk L, Guidotti A and Krueger KE (1988). *Mol. Pharmacol.* 34: 272 - 278.
4. Atkins CM, Selcher JC, Petraitis JJ, Trzaskos JM and Sweatt JD (1998). *Nature Neuroscience* 1: 602 - 609.
5. Bading H and Greenberg ME (1991). *Science* 253: 912 - 914.
6. Bailey CH, Kaang B, Chen M, Martin KC, Lim CS, Casadio A and Kandel ER (1997). *Neuron* 18: 913 - 924.
7. Bartsch D, Ghirardi M, Skechel PA, Karl KA and Herder SP (1995). *Cell* 83: 979-92.
8. Beninger RJ, Palomo T and Archer T (1996). *Dopamine Disease States*. Complutense. Madrid.
9. Bennett MC, MLady GW, Fleshner M and Rose GM (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 1330 – 1334.
10. Bera AK, Ghosh S and Das S. (1995). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209: 213 – 217.
11. Bernabeu R, Bevilaqua L, Ardenghi P, Bromberg E, Chmitz P, Bianchin M, Izquierdo I and Medina JH (1997). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 7041 - 7046.

12. Bevilaqua L, Ardenghi P, Schröder N, Bromberg E, Schmitz PK, Schaeffer E, Quevedo J, Bianchin M, Walz R, Medina JH and Izquierdo I (1997). *Behavioral Pharmacology* 8: 331 - 338.
13. Bito H, Deisseroth K and Tsien RW (1996). *Cell* 87: 1203 - 1214.
14. Blumer KJ and Johnson GL (1994). *Trends Biochem. Sci.* 19: 236 - 240.
15. Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Radziejewska E, Morgenbesser SD, DePinho RA, Panayotatos N, Cobb MH and Yancopoulos GD (1991). *Cell* 65: 663 - 675.
16. Bourtchuladze R, Frenguelli B, Blendy J, Cioffi D, Schutz G and Silva AJ (1994). *Cell* 79: 59 - 68.
17. Bourtchuladze R, Abel T, Berman N, Gordon R, Lapidus K and Kandel ER (1998). *Learning and Memory* 5: 365 - 374.
18. Brambilla R, Gnesutta N, Minichiello L, White G, Roylance A, Herron CE, Ramsey M, Wolfer DP, Cestari V, Rossi-Arnaud C, Grant SGN, Chapman PF, Lipp H, Sturani E and Klein R (1997). *Nature* 390: 281 - 286.
19. Brindle P, Linke S, Montminy M (1993). *Nature* 364: 821-24.
20. Brugg B and Matus A (1991). *Journal of Cell Biology* 114: 735 - 743.
21. Chrivia JC, Kwok RPS, Lamb N, Hagiwara M, Montminy MR and Goodman RH (1993). *Nature* 365: 855 - 859.
22. Cammarota M, Izquierdo I, Wolfman C, Levi de Stein M, Bernabeu R, Jerusalinsk D and Medina JH (1995). *Neurobiol. Learn. Mem.* 64: 257 - 264.

23. Cammarota M, Bernabeu R, Levi de Stein M, Izquierdo I and Medina JH (1998).  
European Journal of Neuroscience 10: 2669 - 2676.
24. Cho YH, Giese KP, Tanila H, Silva AJ and Eichenbaum H (1998). Science 279, 867  
– 873.
25. Chuang TT, Lacovelli L, Salles M, De Blasi A (1996). Trends. Pharmacol. Sci. 17:  
416-21.
26. Cohen P (1992). Trend. Biochem. Sci. 17: 408 - 413.
27. Conti M, Nemoz G, Sette C, Vicini E (1995). Endocr. Rev. 16: 370-89.
28. Crino P, Khodakhah K, Becher K, Ginsberg S, Hemby S and Eberwine J. (1998).  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 2313 – 2318.
29. Crow T, Xue-Bian J, Siddiqi V, Kang Y and Neary JT (1998). The Journal of  
Neuroscience 18: 3480 - 3487.
30. Dash PR, Hoechner B, Kandel ER (1990). Nature 345: 718-21.
31. De Robertis E, Pellegrino de Iraldi A, Rodriguez de Lores Arnaiz G and Salganicoff  
L (1962). J. Neurochem. 9: 23 - 25.
32. Delmas V, Laoide BM, Masquillier D, de Groot RP, Foulkes NS and Sassone-Corsi P  
(1992). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4226 – 4230.
33. Dickinson A and Mackintosh NJ (1978). Annu. Rev. Psychol. 29: 587 - 612.
34. Domino SE, Tubb DJ and Garbers DL (1991). Methods Enzymol. 195: 345 - 355.
35. English JD and Sweatt JD (1996). The Journal of Biological Chemistry 271: 24329 -  
24332.

36. Eichenbaum H (1996). *Curr. Opin. Neurobiol.* 6: 187 - 195.
37. English JD and Sweatt JD (1997). *The Journal of Biological Chemistry* 272: 19103 - 19106.
38. Fields RD, Feleke E, Stevens B and Kouichi I (1997). *The Journal of Neuroscience* 17: 7252 - 7266.
39. Finkbeiner S and Greenberg ME (1996). *Neuron* 16: 233 - 236.
40. Fiore RS, Murphy TH, Sanghera JS, Peletch SL and Baraban JM (1993). *J. Neurochem.* 61: 1626 - 1633.
41. Foulkes NS, Mellström B, Benusiglio E and Sassone-Corsi P (1992). *Nature* 355: 80 - 84.
42. Frey U, Krug M, Reymann KG and Matthies H (1988). *Brain Research* 462: 57 - 65.
43. Gachon F, Peleraux A, Thebault S, Dick J, Lemasson J, Devaux C and Mesnard JM (1998). *J. Virol.* 72: 8332 - 8337.
44. Galef BGJ and Wigmore SW (1983). *Anim. Behav.* 31: 748 - 758.
45. Gille R, Sharrocks D and Shaw, PE (1992). *Nature* 358: 414.
46. Ginty DD, Kornhauser JM, Thompson MA, Bading H and Mayo KE (1993). *Science* 260: 238 - 241.
47. Ghosh A and Greenberg ME (1995). *Science* 268: 239-47.
48. Gonzalez GA and Montminy MR (1989). *Cell* 59: 675 - 680.
49. Grant S and Silva A (1994). *TINS* 17: 71 - 75.
50. Guerra FC (1974). *Methods Enzymol.* 31: 299 - 305.

51. Habener JF (1995). In *Endocrinology*. Ed. LJ de Groot, pp. 77-92. Philadelphia PA: Saunders. 3rd ed.
52. Harvey J and Collingridge G (1992). *Neurosci. Letters* 139: 197 - 200.
53. Hawkins R (1993). *Annu. Rev. Neurosci.* 16: 625 - 665.
54. Hengerer B, Lindholm D, Heumann R, Ruther U, Wagner EF and Thoenen H (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 3899 - 3903.
55. Herrington J, Park YB, Babcock DF and Hille B (1996). *Neuron* 16: 219 – 228.
56. Hodge C, Liao J, Stofega M, Guan K, Carter-Su C and Schwartz J (1998). *The Journal of Biological Chemistry* 273: 31327 - 31336.
57. Houslay MD, Milligan G (1997). *Trends. Biochem. Sci.* 22: 217-24.
58. Hummler E, Cole TJ, Blendy JA, Ganss R and Aguzzi A (1994). *PNAS* 91: 5647-51.
59. Impey S, Obrietan K, Wong ST, Poser S, Yano S, Wayman G, Deloulme JC, Chan G and Storm DR (1998). *Neuron* 21: 869 - 883.
60. Iyengar R (1993) *FASEB J.* 7: 768-75.
61. Izquierdo I, Da Cunha C, Rosat R, Jerusalinsk D, Ferreira MBC and Medina JH (1992). *Behav. Neural Biol.* 58: 16 - 25.
62. Izquierdo I (1993). *Drug Develop. Res.* 30: 1 - 17.
63. Izquierdo I, Medina JH, Bianchin M, Walz R, Zanatta MS, Da Silva RC, Bueno e Silva, M, Ruschel AC and Paczko, N (1993). *Behavioral Brain Research* 58: 91 - 98.
64. Izquierdo I and Medina JH (1997). *Neurobiology of Learning and Memory* 68: 285 - 316.

65. Johnson CM, Hill C, Sangeeta C, Treisman R and Bading H (1997). *The Journal of Neuroscience* 17: 6189 - 6202.
66. Kaang B-R, Kandel ER, Grant SGN (1993). *Neuron* 10: 427-35.
67. Kaczmarek L (1993). *Journal of Neuroscience Research* 34: 377 - 381.
68. Karpinski BA, Morle GD, Huggenvik J, Uhler MD and Leiden JM (1992). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4820 – 4824.
69. Kogan J, Frankland PW, Blendy JB, Coblenz J and Marowitz Z (1996). *Curr. Biol.* 7: 1 - 11.
70. Lai JCR and Clark JB (1979). In *Methods in enzymology*, vol LV. Academic Press Inc. pp 51 – 60.
71. Landschulz WH, Johnson PF, McKnight SL (1988). *Science* 240: 1759 - 1764.
72. Laoide BM, Foulkes NS, Schlotter F and Sassone-Corsi P (1993). *EMBO J.* 12: 1179 – 1191.
73. Liu XB and Jones EG (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 7332 - 7336.
74. Lowy DR and Willumsen BM (1993). *Annu. Rev. Biochem.* 62: 851 - 891.
75. Lynch G and Granger R (1992). *J. Cogn. Neuroci.* 4: 189 - 199.
76. Martin KC, Michael D, Rose JC, Barad m, Casadio A, Zhu H and Kandel ER (1997). *Neuron* 18: 899 - 912.
77. Michael D, Martin KC, Seger R, Ning M, Baston R and Kandel ER (1998). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 1864 - 1869.
78. Milner B, Squire LR and Kandel ER (1998). *Neuron* 20: 445 - 468.

- 79.Molina CA, Foulkes NS, Lalli E and Sassone-Corsi P (1993). *Cell* 75: 875 – 886.
- 80.Mori Y, Matsubara H, Folco E, Siegel A and Koren G (1993). *J. Biol. Chem.* 268: 26482 - 26493.
- 81.Morris RGM (1981). *Learn. Motiv.* 12: 239 - 260.
- 82.Müller U and Carew TJ (1998). *Neuron* 21: 1423 - 1434.
- 83.Niewenhuys R (1985). *Chemoarchitecture of the Brain*. Springer, Berlin.
- 84.Olson NJ, Massé T, Suzuki T, Chen J, Alam D and Kelly PT (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1659 - 1663.
- 85.Otani S, Marshall CJ, Tate WP, Goddard GV and Abraham WC (1989). *Neuroscience* 28: 519 - 526.
- 86.Pavlov I (1927). *Conditioned Reflexes*, Eds. Oxford University Press, London.
- 87.Pawson T (1995). *Nature* 373: 573 - 580.
- 88.Paxinos G and Watson C (1986). *The Brain in Stereotaxic Coordinates*. Eds. Academic Press, New York.
- 89.Roman F (1987). *Brain Research* 418: 221 - 226.
- 90.Rose S (1993). *The making of Memory*.Eds. Bantam, UK.
- 91.Roskoski R (1983). *Methods Enzymol.* 99: 3 - 6.
- 92.Sakamoto KM, Bardeleben C, Yates KE, Raines A, Golde DW and Gasson JC (1991). *Oncogene* 6: 867 - 871.
- 93.Samama P, Cotecchia S, Costa T and Lefkowitz RJ (1993). *J. Biol. Chem.* 268: 4625 – 4636.

- 94.Sardanelli PS, Cocco T, Speranza F, Scacco SC and Techniková-Dobrova Z. (1996).  
FEBS Lett. 379: 299 – 301.
- 95.Sassoni-Corsi P, Visvader J, Ferland L, Mellon PL, Verma IM (1988). Genes Dev. 2:  
1529-38.
- 96.Sassone-Corsi (1995). Ann. Rev. Cell Dev. Biol. 11: 355 - 377.
- 97.Sauerwald A, Hoesche C, Oschwald R and Kilimann MW (1990). J. Biol. Chem.  
265: 14932 - 14937.
- 98.Seger R and Krebs EG (1995). The FASEB Journal 9: 726 - 735.
- 99.Sgambato V, Vanhoutte P, Pagès C, Rogard M, Hipskind R, Besson M and Caboche  
J (1998). The Journal of Neuroscience 18: 214 - 226.
100. Shaw PE, Schroter H and Nordheim A (1989) Cell 56: 563 - 572.
101. Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW and Molinoff PB (1994). Basic  
Neurochemistry: Molecular Cellular and Medical Aspects, 5th edn. Raven Press,  
New York.
102. Silva AJ, Kongan JH, Frankland PW and Kida S (1998). Annu. Rew. Neurosci.  
21: 127-148.
103. Sonnenberg JL, Rausther FJ, Morgan JL and Curran T (1989). Science 246: 1622  
- 1625.
104. Squire LR (1992). Journal of Cognitive Neuroscience 4: 232 -243.
105. Struthers RS, Vale WW, Arias C, Sawchenko PE and Montminy MR (1991).  
Nature 350: 622 - 624.



106. Suzuki T, Mitake S, Okumura-Noji K, Yang JP, Fujii T and Okamoto T (1997). *Neuroreport* 8: 2931 – 2935.
107. Tang Y and Zucker RS (1997). *Neuron* 18: 483 – 491.
108. Thayer SA and Miller RJ (1990). *J. Physiol.* 425: 85 – 115.
109. Thompson WJ, Broker G and Appleman MM (1974). *Methods Enzymol.* 38: 205 – 212.
110. Tully T (1991). In *Neurobiology of Learning, Emotion and Affect*, ed. J Madden, pp. 30-66. New York: Raven.
111. Williams JM, Thompson VL, Mason-Parker SE, Abraham W and Tate WP (1998). *Molecular Brain Research* 60: 50 – 56.
112. Willner P, Bianchin M, Walz R, Bueno e Silva M, Zanatta MS and Izquierdo I (1993). *Behav. Pharmacol.* 4: 95 - 100.
113. Xing J, Ginty DD and Greenberg M (1996). *Science* 273: 959 - 963.
114. Yang WL, Iacono L, Tang WM and Chin KV (1998). *Biochemistry* 37: 14175 – 14180
115. Yin J, Wallach JS, Vecchio MD, Wilder EL and Zhou H (1994). *Cell* 79: 49-58.
116. Silva AJ, Stevens CF, Tonegawa S and Wang Y (1992). *Science* 257: 201 – 205.

Os resultados apresentados nesta tese de doutorado foram publicados ou aceitos para publicação nas seguintes revistas:

Ramon Bernabeu, **Lia Bevilaqua**, Patricia Ardenghi, Elke Bromberg, Paulo Schmitz, Marino Bianchin, Ivan Izquierdo and Jorge H. Medina (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**: 7041 - 7046.

**L. Bevilaqua**, P. Ardenghi, N. Schröder, E. Bromberg, P.K. Schmitz, E. Schaeffer, J. Quevedo, M. Bianchin, R. Walz, J.H. Medina and I. Izquierdo (1997). Drugs acting upon the cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A signalling pathway modulate memory consolidation when given late after training into rat hippocampus but not amygdala. Behavioural Pharmacology **8**: 331 - 338.

Martín Cammarota, **Lia R.M. Bevilaqua**, <sup>§</sup>Gustavo Paratcha, Miguelina Levi de Stein, Margarita Lopez, Amanda Pellegrino de Iraldi, Iván Izquierdo and Jorge H. Medina (1999). Cyclic AMP-Responsive Element Binding Protein in Brain Mitochondria. Journal of Neurochemistry **72**: 2272 - 2277.

<sup>§</sup>The Drs. G. Paratcha and L. R. M. Bevilaqua contributed equally to the work and could be cited in an interchangeable order.