

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências
Médicas

**PAPEL DE mTOR NA FORMAÇÃO E
RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA**

Paulo Fernandes Costa Jobim

Orientador: Prof. Dr. Rafael Roesler

Porto Alegre, novembro de 2011

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências
Médicas

**PAPEL DE mTOR NA FORMAÇÃO E
RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA**

Paulo Fernandes Costa Jobim

Orientador: Prof. Dr. Rafael Roesler

Tese de Doutorado apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre, novembro de 2011

FONTE DE FINANCIAMENTO

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; projeto número 303703/2009-1); Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina; Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA; projeto número 09-641) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) através da bolsa de doutorado do aluno Paulo Fernandes Costa Jobim.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a minha maravilhosa esposa por toda a ajuda e todo companheirismo durante estes anos de doutorado. Recordo que muitas vezes eu me via cansado e abatido e ela me animava, outras tantas, estava tenso e assustado e ela me acalmava. Muito obrigado por tudo meu amor!

Ao meu orientador, professor Rafael Roesler, por quem tenho grande admiração, agradeço por ter me aceitado como seu aluno, mesmo vindo de uma área diferente. A confiança que o Rafael depositou em mim, foi sem dúvida, um dos fatores decisivos para a conclusão desta tese. Muito obrigado Rafael!

Ao meu pai agradeço pelos inúmeros conselhos durante nossas conversas em nossos almoços semanais. Sempre fiquei muito seguro por saber que podia contar com ele. Durante este período de doutorado, essas conversas foram de grande valor para o meu trabalho. Muito obrigado pai!

Não posso deixar de agradecer aos meus colegas e amigos do laboratório de Neurofarmacologia Molecular (atualmente chamado de laboratório de Neurofarmacologia e Biologia de Tumores Neurais):

Gustavo: Por me passar noções básicas relacionadas aos processos da memória. Em 2008, quando entrei no laboratório, tive a oportunidade de aprender muito nas reuniões do grupo coordenadas pelo Gustavo. A disposição e didática para ensinar neurociência foi algo que sempre admirei no Gustavo. Valeu Gustavo!

Natasha: Por estar sempre presente ajudando nos meus experimentos. Fiz meus primeiros experimentos sob a supervisão da Natasha e nunca vou esquecer aquele final de semana em que chegamos no laboratório às oito da manhã e saímos, passado de meia noite. Foi muito divertido ter a companhia da Nata neste, e em outros tantos experimentos que fizemos juntos. Com ela

aprendi o que é trabalhar em equipe, com comprometimento e dedicação. Te adoro Nata!

Thiago: Pelas tantas vezes que me ajudou para organizar e elaborar meus experimentos. Imaginem vocês que no começo, nos odiávamos. Mas com o passar do tempo fomos conhecendo melhor um ao outro e por fim, nos tornamos grandes amigos. Ainda continuamos discutindo como no começo. Valeu Thiago!

Aline: Por estar sempre alegre e disposta a rir das minhas piadas mais infâmes. Sempre achei muito prazeroso estar na companhia da Aline. Obrigado Aline, por deixar o laboratório com um clima mais leve e agradável. Valeu Aline!

Raissa: Por ter sido uma dedicada aluna de iniciação científica durante meus experimentos finais.

Agradeço a minha amiga Diva por me ajudar durante o processo de transição que passei ao longo do doutorado.

Agradeço ao pessoal da Unidade de Experimentação Animal: Marta, Fabíola, Rosa, Eduardo e Jú por serem prestativos e eficientes.

Agradeço a todas as pessoas que fizeram parte da minha história acadêmica durante o doutorado. Direta ou indiretamente, todos vocês me ajudaram a me tornar uma profissional mais competente e uma pessoa melhor. Muito obrigado a todo!

Por fim, agradeço à algo que é difícil de nomear ou definir. Algo que, sem o qual, eu estaria num outro lugar, com outras pessoas, fazendo outras coisas. Algo que, posso sentir quando estou em paz. O que me trouxe até aqui, além do meu desejo e da minha determinação, foi este algo. Escolhi acreditar nisso e depositar minha fé, de que meus atos por si só, não podem definir minha realidade. Existe algo mais.

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a minha mãe, que sempre demonstrou muito orgulho de mim por ter escolhido este caminho.

Aos meus sogros, os quais inúmeras vezes tentei explicar sobre o que se tratava minha pesquisa e eles nunca conseguiram entender. Meu sogro olhava através de mim, perdido em seus pensamentos profundos e a minha sogra, dormia serenamente durante minhas tentativas. Mas o carinho que eles tem por mim, é o suficiente.

Meus amigos João e Camila, que sempre me incentivaram a fazer esportes e perder peso durante o período de escrita da tese, no qual me tornei sedentário.

A minha família por parte de pai: Angela, Carol, Tia Sandra, tio Cleber, e Júnior; Tia Cintia, André, Dani e Andrézinho por vibrarem com as minhas conquistas.

A família por parte de mãe: Tia Tânia e tia Tanize por compartilharem comigo muitos momentos bons e ruins ao longo do doutorado.

Ao meu irmão Francisco. Espero que a vida e a sorte sempre sorriam pra ti como sorriem para mim.

***“You, me or nobody is going to hit as hard
as life. But isn’t about how hard you hit.
It’s about how hard you can get hit and
keep moving forward. How much you can
take and keep moving forward. That’s
how winning is done.”***

Rocky Balboa

Sumário

Parte I

1. Resumo.....	11-12
2. Abstract.....	13-14
3. Lista de abreviaturas e siglas.....	15-19
4. Lista de Figuras.....	20-21
5. Lista de Tabelas.....	22
6. Introdução.....	23-27
7. Revisão da literatura.....	28-35
7.1. Consolidação da memória.....	28
7.2. Reconsolidação da memória.....	28-29
7.3. mTOR.....	30-32
7.4. Via de sinalização de mTOR e memória.....	32-35
8. Objetivos.....	36
8.1. Geral.....	36
8.2. Específicos.....	36
9. Materiais e métodos.....	37-47
9.1. Delineamento da pesquisa.....	37

9.2. Local de realização dos experimentos.....	37
9.3. Animais experimentais.....	37
9.4. Tratamentos.....	38
9.5. Tamanho amostral.....	38
9.6. Procedimentos cirúrgicos.....	38-39
9.7. Tarefas comportamentais.....	39-41
9.7.1. Esquiva inibitória.....	39-40
9.7.2. Reconhecimento de objetos.....	40-41
9.8. Desenhos experimentais.....	41-46
9.8.1. Experimentos investigar o efeito de inibição de mTOR amigdalare hipocampal na consolidação da memória de esquiva inibitória e reconhecimento de objetos.....	41-43
9.8.2. Experimentos para investigar o efeito de inibição de mTOR amigdalare hipocampal na reconsolidação da memória de esquiva inibitória e reconhecimento de objetos.....	43-46
9.8.2.1. Experimentos controle sem reativação de esquiva inibitória e reconhecimento de objetos.....	45-46
9.8.2.2. Experimentos controle "reminder" de esquiva inibitória.....	46
9.9. Análise histológica.....	47
9.10. Análise estatística.....	47

Parte II

10. 1º Artigo da tese: Inhibition of mTOR by rapamycin in the amygdala or hippocampus impairs formation and reconsolidation of inhibitory avoidance memory.....	48-56
11. 2º Artigo da tese: Impairment of object recognition memory by rapamycin inhibition of mTOR in the amygdala or hippocampus around the time of learning or reactivation.....	57-91

Parte III

12. Considerações finais.....	92-95
13. Referências.....	96-108
14. Anexos.....	110-114
14.1. Parecer de aprovação do Comitê de Ética.....	110
14.2. Produção científica do doutorado.....	111
14.2.1. Artigos completos publicados.....	111
14.2.2. Artigos completos submetidos.....	111
14.2.3. Resumos publicados em eventos.....	111-114
14.2.4. Participação em eventos.....	114

Parte I

1. RESUMO

Novas informações assimiladas pelo sistema nervoso primeiramente ficam em um estado de labilidade para depois se estabilizarem através de um processo conhecido como consolidação, que envolve síntese de proteínas. Depois da reativação, uma memória previamente consolidada retorna ao seu estado de labilidade, e para que volte a ser estável, é necessário que haja novamente síntese de proteínas. Este segundo processo é chamado de reconsolidação. Recentemente os mecanismos moleculares e celulares envolvidos na regulação da síntese protéica relacionados à formação de memória de longa duração vêm sendo esclarecidos. A proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) modula a plasticidade sináptica pela regulação da fosforilação de dois alvos: a proteína ribossomal S6K e a proteína de ligação 4E. A amígdala basolateral e o hipocampo dorsal são parte integrante do sistema neural envolvido na formação e expressão de diversos tipos de memórias. Estudos indicam que a via de sinalização da mTOR no hipocampo tem um papel importante na consolidação da memória de ratos submetidos a tarefa de esquiva inibitória e reconhecimento de objetos e na reconsolidação da memória de medo contextual condicionado. Contudo, estudos anteriores não avaliaram o efeito da inibição de mTOR amigdalares sobre a memória de esquiva inibitória e reconhecimento de objetos. O objetivo do presente trabalho é investigar o efeito da inibição de mTOR na amígdala basolateral por rapamicina na consolidação e reconsolidação da memória de esquiva inibitória e reconhecimento de objetos e comparar estes resultados com a inibição de mTOR no hipocampo. Ratos Wistar machos foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas na amígdala basolateral e hipocampo dorsal. Os animais foram submetidos à tarefa de esquiva inibitória, um modelo animal de memória de caráter aversivo, e a tarefa de reconhecimento de objetos, um modelo animal de memória de caráter pouco aversivo. Para investigar o efeito da inibição de mTOR na consolidação e

reconsolidação da memória, os animais receberam microinfusões de rapamicina intra-amigdalár e intra-hipocampal em diferentes tempos em torno do treino e do teste. Nós demonstramos que a via de sinalização de mTOR na amígdala basolateral é necessária para consolidação da memória de esquiva inibitória e de reconhecimento de objetos. Nós também mostramos que a reativação torna a memória novamente suscetível e sensível à inibição de mTOR por rapamicina.

Palavras chave: Reconsolidação, Consolidação, mTOR, Síntese protéica, Memória aversiva, Memória de reconhecimento

2. ABSTRACT

Memory formation requires protein synthesis, but only recently the cellular and molecular mechanisms involved in the regulation of protein synthesis related to the formation of long term memory has been elucidated. During memory formation, new information is acquired by the central nervous system as an initially fragile trace that over time becomes stable through a process known as consolidation. After reactivation, previously consolidated memories might return to a labile state, requiring a new round of protein synthesis to be restabilized. This second process is called reconsolidation. The basolateral amygdala and dorsal hippocampus are part of the neural systems involved in the formation and expression of several types of memory. One key regulator of protein synthesis is mTOR, a protein critical for different forms of synaptic plasticity by regulation of two targets: S6K and 4EBP. Evidence indicates that the mTOR signaling pathway in hippocampus has an important role in consolidation in rats of inhibitory avoidance and object recognition in rats, as well as in reconsolidation of contextual fear conditioning. However, previous studies have not examined the effect of amygdalar mTOR inhibition on reconsolidation of inhibitory avoidance and object recognition. The aim of the present study was to evaluate the effect of amygdalar mTOR inhibition by rapamycin on consolidation and reconsolidation of inhibitory avoidance and object recognition, and compare the results with those obtained with hippocampal mTOR inhibition. Male rats Wistar underwent stereotaxic surgeries for cannulae implantation above the basolateral amygdala or dorsal hippocampus. After recovery, the animals were trained in inhibitory avoidance, an aversive memory task, or object recognition, a less aversive task. To investigate the effect of mTOR inhibition on memory consolidation and reconsolidation, we administered rapamycin, a specific mTOR inhibitor, into the basolateral amygdala or the dorsal hippocampus before or after training or reactivation. Our results provide evidence that mTOR in the basolateral amygdala and hippocampus might play a role in inhibitory avoidance and object recognition memory formation and reconsolidation.

Key Words: Reconsolidation, Consolidation, mTOR, Protein synthesis, Aversive memory, Recognition memory

3. LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µl – Microliter (Microlitro)

2W – Two Weeks (Duas semanas)

4E-BP1 – Eukaryotic Initiation Factor 4E Binding Protein 1 (Proteína de ligação do fator de iniciação eucariótico 4E 1)

4E-BP2 – Eukaryotic Initiation Factor 4E Binding Protein 2 (Proteína de ligação do fator de iniciação eucariótico 4E 2)

4E-BP3 – Eukaryotic Initiation Factor 4E Binding Protein 3 (Proteína de ligação do fator de iniciação eucariótico 4E 3)

5`UTRs - 5` Untranslated Regions (Região não traduzidas 5`)

AGC - Protein kinase A/protein G/protein kinase C-family (Família de proteína quinase A, G e C)

AKT ou PKB - Protein kinase B (Proteína quinase B)

AMPA-R - Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazole Propionic Acid Receptors (Receptor do ácido amino 3--hidroxi-5-metil-4-isoxalatopropionico)

Arc - Activity Regulated Cytoskeleton Associated Protein (Proteína associada a atividade regulatória do citoesqueleto)

ATP - Adenosine-5'-Triphosphate (Adenosina tri-fosfato)

BDNF - Brain Derived Neurotrophic Factor (Fator neurotrófico derivado do cérebro)

BLA – Basolateral Amygdala (Amígdala basolateral)

Ca⁺² - Calcium (Cálcio)

CaMKII - Calcium/Calmodulin Dependent Protein kinases II (Proteína quinase dependente de cálcio calmodulina II)

CamKIV - **Calcium/Calmodulin** Dependent Protein **kinase** Type **IV** (Proteína quinase dependente de cálcio calmodulina tipo IV)

cAMP - **Adenylyl Cyclase Monophosphate** (Adenilato ciclase mono-fosfato)

C/EBP - **CCAAT Enhancer Binding Protein** (Proteína de ligação potenciadora de CCAAT)

CREAL - **Centro de Reprodução de Animais de Laboratório**

CREB - **cAMP Response Element Binding** (Elemento de ligação responsivo a cAMP)

D1-R - **Dopaminergic Receptor 1** (Receptor de dopamina 1)

D2-R - **Dopaminergic Receptor 2** (Receptor de dopamina 2)

Deptor - **Domain Containing mTOR Interacting Protein** (Proteína de interação que contém o domínio mTOR)

DH – **Dorsal Hippocampus** (Hipocampo dorsal)

DMSO - **Dimethyl Sulfoxide** (Dimetil sulfóxido)

eIF4A - **Eukaryotic Initiation Factor 4A** (Fator de iniciação eucariótico 4A)

eIF4B - **Eukaryotic Initiation Factor 4B** (Fator de iniciação eucariótico 4B)

eIF4E - **Eukaryotic Initiation Factor 4E** (Fator de iniciação eucariótico 4E)

eIF4F - **Eukaryotic Initiation Factor 4F** (Fator de iniciação eucariótico 4F)

eIF4G - **Eukaryotic Initiation Factor 4G** (Fator de iniciação eucariótico 4G)

eEF2 – **Eukaryotic Elongation Factor 2** (Fator de alongação eucariótico 2)

FEPPS - **Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde**

FKBP12 – **FK506 Binding Protein** (Proteína de ligação FK506)

FRB – **FKBP12-Rapamycin Binding Domain** (Domínio da ligação de FKBP12- rapamicina)

GTPase - Guanosine Triphosphatase (Guanosina tri-fosfatase)

Homer2 - Homer Protein Homolog 2 (Proteína homóloga Homer 2)

IA - Inhibitory Avoidance (Esquiva inibitória)

ICBS - Instituto de Ciências Básicas da Saúde

JNK - c-Jun N-Terminal kinase (Proteína quinase c-Jun N-terminal)

LTP – Long Term Potentiation (Potencial de longa duração)

L-LTP - Late Long Term Potentiation (Potencial de longa duração tardio)

LTD - Long Term Depression (Depressão de longa duração)

LTF - Long Term Facilitation (Facilitação de longa duração)

LTM – Long Term Memory (Memória de longa duração)

mA – mili Ampere (mili ámpere)

MAPK - Mitogen Activated Protein Kinases (Proteína quinase ativada por mitógeno)

mGluRs - Metabotropic Glutamate Receptors (Receptores glutamatérgicos metabotrópicos)

mLST8 - GTPase β -subunit like protein G β L (Subunidade β da proteína GTPase)

mRNA - Messenger Ribonucleic Acid (Ácido ribonucléico mensageiro)

mTOR – Mammalian Target of Rapamycin (Proteína alvo de rapamicina em mamíferos)

mTORC1 – Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 (Complexo 1 da proteína alvo de rapamicina em mamíferos)

mTORC2 – Mammalian Target of Rapamycin Complex 2 (Complexo 2 da proteína alvo de rapamicina em mamíferos)

MSK1 - **Mitogen and Stress Activated Protein Kinase 1** (Proteína quinase ativada por mitógeno e estresse 1)

mSIN1- **Mammalian Stress Activated Protein Kinase SAPK - Interacting Protein 1** (Proteína de interação da proteína quinase de mamíferos ativada por estresse 1)

NMDA-R - **N-methyl-D-Aspartate Receptor** (Receptor N-metil-D-aspartato)

NRD - **Negative Regulatory Domain** (Domínio regulatório negativo)

OR - **Object Recognition** (Reconhecimento de objeto)

PDCD4 - **Programmed Cell Death 4 Protein** (Proteína de morte celular programada 4)

PDK1- **Phosphoinositide Dependent Kinase 1** (Quinase dependente de fosfoinositideo 1)

PI3K - **Phosphatidylinositol 3 Kinase** (Quinase fosfatidilinositol 3)

PKA - **cAMP Dependent Protein Kinase** (Proteína quinase dependente de cAMP)

PKC - **Protein Kinase C** (Proteína quinase C)

Raptor – **Regulatory Associated Protein of TOR** (Regulador associado à proteína TOR)

Rictor - **Rapamycin Insensitive Companion of TOR** (Proteína associada a TOR insensível a rapamicina)

RNA – **Ribonucleic Acid** (Acido ribonucléico)

S6K – **Ribosomal Kinase Protein S6** (Proteína quinase ribossomal S6)

SAPK - **Mammalian Stress Activated Protein Kinase** (Proteína quinase de mamíferos ativada por estresse)

SBNec - **Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento**

SGK1 - **S**erum/**G**lucocorticoid **R**egulated **K**inase **1** (Proteína quinase reguladora do soro/glicocorticóide 1)

STM – **S**hort **T**erm **M**emory (Memória de curta duração)

TIF - IA - **T**ranscription **I**nitiation **F**actor **IA** (Fator de iniciação da transcrição IA)

TR - **T**raining (Treino)

TrK-R - **T**yrosine **K**inase **R**eceptor (Receptor tirosina quinase)

TSC 1 - **T**uberous **S**clerosis **C**omplex **1** (Complexo tuberosse esclerose 1)

TSC 2 - **T**uberous **S**clerosis **C**omplex **2** (Complexo tuberosse esclerose 2)

TT - **T**est (Teste)

UEA - **U**nidade de **E**xperimentação **A**nimal

UFRGS - **U**niversidade **F**ederal do **R**io **G**rande do **S**ul

4. LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho esquemático dos tipos de memória e estruturas envolvidas.

Figura 2 - Fases da memória de curta e longa duração.

Figura 3 - Estrutura química da rapamicina.

Figura 4 - Desenho esquemático da via de sinalização de mTOR.

Figura 5 - Desenho esquemático ilustrando o papel da síntese de proteínas na formação da memória.

Figura 6 - Aparelho Insight para cirurgia estereotáxica.

Figura 7 - Caixa de esquiva inibitória.

Figura 8 - Caixa de campo aberto e objetos usados na tarefa de reconhecimento de objeto.

Figura 9 - Desenho experimental usado para investigar a consolidação na tarefa de esquiva inibitória representando o tempo da infusão de rapamicina ou veículo na região CA1 do hipocampo dorsal e na amígdala basolateral e os momentos de treino e teste.

Figura 10 - Desenho experimental usado para investigar a consolidação na tarefa de reconhecimento de objetos representando o tempo da infusão de rapamicina ou veículo na região CA1 do hipocampo dorsal e na amígdala basolateral e os momentos de treino e teste.

Figura 11 - Desenho experimental usado para investigar a reconsolidação na tarefa de esquiva inibitória representando o tempo da infusão de rapamicina ou

veículo na região CA1 do hipocampo dorsal e na amígdala basolateral e os momentos de treino e teste.

Figura 12 - Desenho experimental usado para investigar a reconsolidação na tarefa de reconhecimento de objetos representando o tempo da infusão de rapamicina ou veículo na região CA1 do hipocampo dorsal e na amígdala basolateral e os momentos de treino e teste.

Figura 13 - Desenho experimental usado para investigar se o efeito de rapamicina na reconsolidação na tarefa de esquiva inibitória e reconhecimento de objetos é dependente de reativação da memória, representando o tempo da infusão de rapamicina ou veículo na região CA1 do hipocampo dorsal e na amígdala basolateral e os momentos de treino e teste.

Figura 14 - Desenho experimental usado para investigar se o efeito de rapamicina na reconsolidação da memória na tarefa de esquiva inibitória pode ser revertido pelo choque reminder, representando o tempo da infusão de rapamicina ou veículo na região CA1 do hipocampo dorsal e na amígdala basolateral e os momentos de treino e teste.

Figura 15 - Esquema da difusão do fármaco na amígdala basolateral e na região CA1 do hipocampo dorsal.

5. LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Associações de mTOR na literatura.

6. INTRODUÇÃO

A memória é considerada a capacidade de aquisição, armazenamento e evocação de informações. A fase de aquisição da memória é o momento em que se adquirem novas informações, habilidades ou experiências. A memória é diferente de acordo com o seu conteúdo, sendo classificada como declarativa ou explícita e não-declarativa ou implícita, e quanto ao tempo de duração, sendo classificada como de curta ou longa duração. (Squire, 1987). As memórias explícitas são adquiridas conscientemente e podem ser divididas em memórias episódicas e semânticas. As memórias episódicas são referentes a eventos que se assiste ou participa e as memórias semânticas são referentes a conhecimentos gerais. As memórias implícitas, por outro lado, são adquiridas de maneira inconsciente e englobam as memórias de procedimentos, de habilidades motoras e a informação obtida a partir de aprendizados simples (Myskiw et al. 2008). A formação desses dois tipos de memória depende de estruturas encefálicas diferentes. As memórias explícitas requerem a integridade de algumas estruturas do lobo temporal medial, que compreende o hipocampo e o córtex entorrinal. As memórias implícitas envolvem estruturas como a amígdala, os gânglios da base e o cerebelo (Squire et al. 2007).

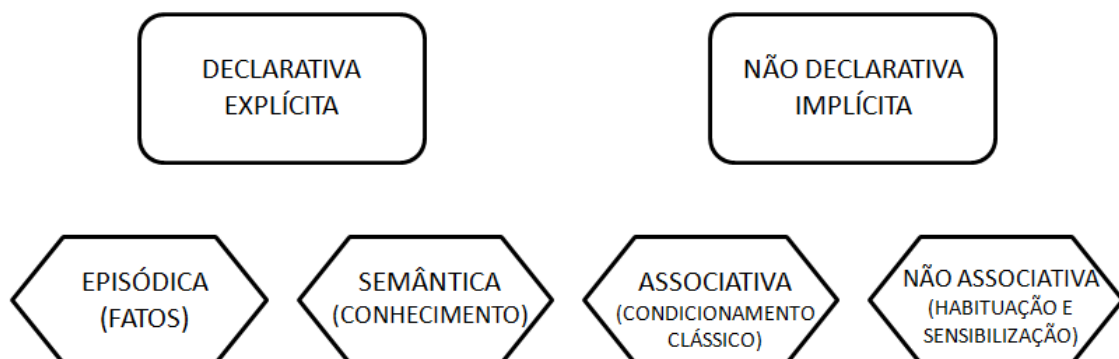


Fig. 1. Desenho esquemático dos tipos de memória. Adaptado de Squire e Kandel, 2003.

As memórias de curta duração persistem poucos minutos ou horas, não requerem síntese de mRNA e proteínas. As memórias de longa duração, por sua

vez, requerem síntese de mRNA, síntese de proteínas e a participação de várias vias de sinalização metabólicas celulares vinculadas a esses processos (McGaugh, 2000; Alberini et al. 2006; Roesler e McGaugh, 2010). As memórias de curta e de longa duração utilizam as mesmas estruturas anatômicas para seu processamento, como hipocampo, córtex entorrinal e amígdala, mas envolvem mecanismos moleculares independentes (Izquierdo et al.1998). O período em que ocorre a formação da memória de longa duração é chamado de consolidação. O processo de consolidação é um conjunto complexo e regulado de reações bioquímicas, levando a uma progressiva estabilização pós-aquisição das memórias de longa duração (McGaugh 2000; Dudai, 2004; Roesler e McGaugh 2010). Durante este processo as memórias encontram-se lábeis e são sensíveis a inibidores de síntese protéica ou eventos traumáticos (Squire e Kandel, 2003). Memórias já consolidadas tornam-se novamente lábeis e susceptíveis a intervenção quando reativadas (Milekic e Alberini, 2002) e para que persistam, precisam passar por um novo processo de estabilização, dependente de síntese protéica, chamado de reconsolidação (Nader et al. 2000a; Sara, 2000).

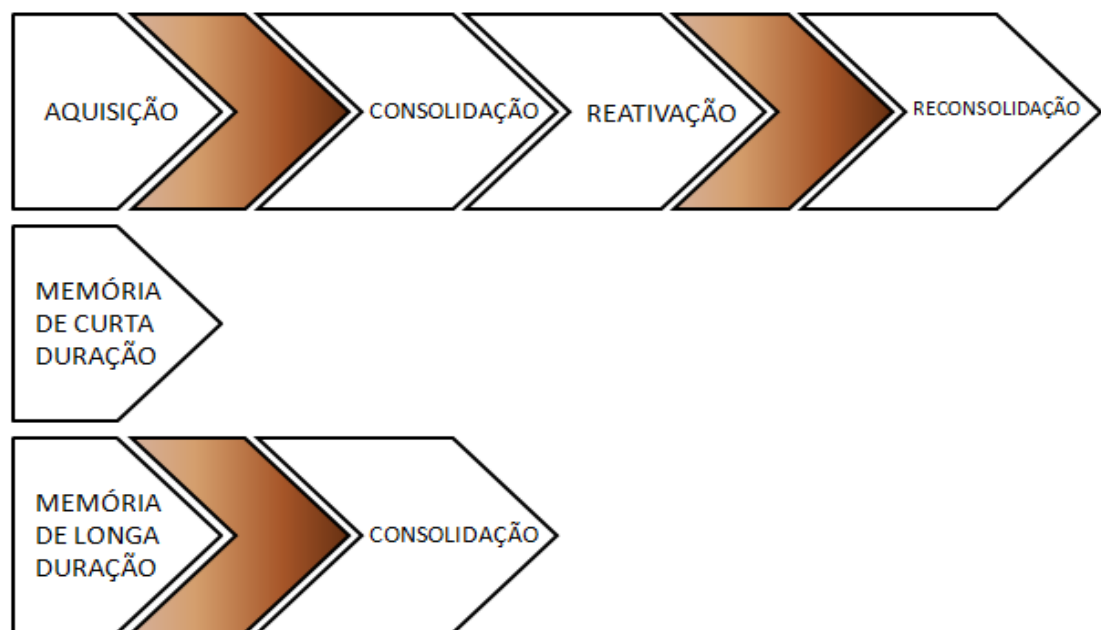


Fig. 2. Fases da memória de curta e longa duração. As flechas coloridas indicam o período em que a memória está lábil. Adaptado de Tronson e Taylor, 2007.

No condicionamento clássico, o animal aprende a relacionar um estímulo que inicialmente não possui relevância biológica ou significado aparente (estímulo condicionado) a outro estímulo, ao qual o animal apresenta resposta instintivamente (estímulo incondicionado). O processo de condicionamento faz com que a representação do estímulo condicionado ganhe relevância biológica e o animal responda a este, da mesma maneira que responderia ao estímulo incondicionado. A reativação de memórias aversivas na ausência do estímulo incondicionado (choque) pode levar a dois processos: reconsolidação ou extinção. A reconsolidação pode fornecer uma janela de oportunidades para a manutenção e o fortalecimento do traço mnemônico evocado (Nader et al. 2000b). Muitos tratamentos que bloqueiam a consolidação são capazes de prejudicar a reconsolidação, o que levou à hipótese de que a reconsolidação envolve a recapitulação dos acontecimentos moleculares que ocorrem durante a consolidação (Sara, 2000). Porém, mesmo com algumas semelhanças, consolidação e reconsolidação não são processos idênticos (Alberini, 2005). Existem indícios de que vias de sinalização que controlam a tradução do mRNA estão envolvidas na consolidação de memórias, bem como na persistência do traço após sua evocação (Parsons et al. 2006a; Bekinschtein et al. 2007). Uma dessas vias envolvidas no crescimento e proliferação celular e no controle traducional envolve a proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR). A proteína mTOR é ativada por atividade do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), receptor tirosina quinase (TrK), receptor glutamatérgico metabotrópico (mGluR) e receptores dopaminérgicos (D1 e D2) (Hoeffler e Klann, 2010). mTOR é capaz de fosforilar proteínas em resíduos serina ou treonina. A mTOR regula o nível de tradução pela fosforilação de alvos intracelulares, incluindo a proteína ribossomal S6 quinase (S6K) e proteína de ligação do fator de iniciação eucarioto 4E (4E-BP) (Raught et al. 2001; Carroll et al. 2006; Hoeffler e Klann 2010). No sistema nervoso central, esta proteína quinase é crucial para plasticidade sináptica, aprendizado e formação de memórias (Swiech et al. 2008). Os mamíferos possuem dois complexos da mTOR denominados mTORC1 e mTORC2 (Hay e Sonenberg, 2004). O mTORC1 controla a ativação da S6K, proteína responsável pela regulação da biogênese ribossômica, e do fator de iniciação eucariótico 4E-BP, que possui um importante papel na regulação da tradução de proteínas (Wang et al. 2008).

Associação	Modelo animal	Primeiro autor e ano
Obesidade	Zebrafish	Craig et al. 2011
Transplante renal	Humanos	Cortazar et al. 2011
Câncer de mama	Humanos (<i>in vitro</i>)	Yellen et al. 2011
Cardiomiopatia	Camundongos	Marin et al. 2011
Depressão	Camundongos	Koike et al. 2011
Alzheimer	Camundongos	Caccamo et al. 2011
Parkinson	Humanos (<i>in vitro</i>)	Elstner et al. 2011
Epilepsia	Camundongos	Sunnen et al. 2011
Longevidade	Ratos	Harrison et al. 2009
Memória	Ratos	Gafford et al. 2011

Tabela 1. Associações de mTOR na literatura.

Este complexo pode ser inibido diretamente por rapamicina, um macrolídeo obtido da bactéria *Streptomyces hygroscopicus*, que inicialmente foi identificada como um agente anti fungicida (Vézina et al. 1975), e no ano de 1999, foi aprovado para utilização em pacientes por suas propriedades imunossupressoras (Sabatini, 2006). Atualmente uma molécula sintética da rapamicina, RAD001, está em fase III (testes clínicos), para o tratamento de carcinoma renal (Motzer et al. 2008).

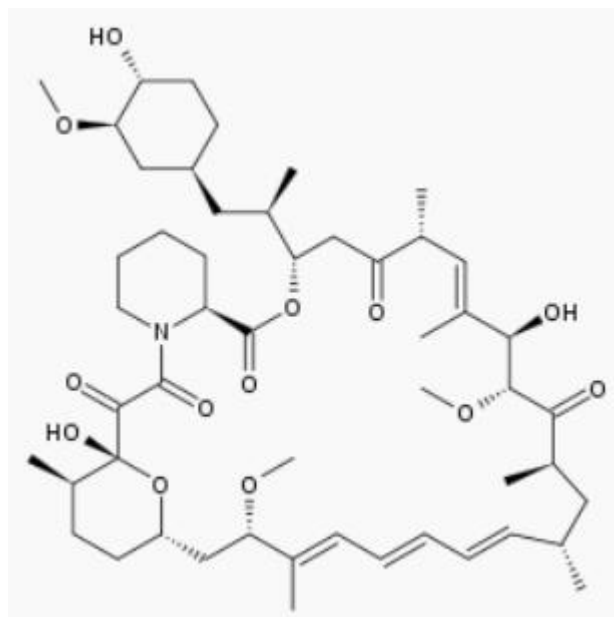


Fig. 3. Estrutura química da rapamicina. Retirado de McAlister et al. 2002.

A rapamicina exerce seu efeito principalmente por se ligar ao domínio N-terminal da mTOR, inibindo sua atividade enzimática e enfraquecendo a interação entre mTOR e a proteína regulatória de mTOR (Raptor), conseqüentemente, suprimindo a fosforilação de seus principais alvos, a proteína quinase S6K e o fator de iniciação eucariótico 4E-BP (Raught et al. 2001; Swiech et al. 2008). Ao inibir a mTOR, a rapamicina prejudica consolidação e a reconsolidação de memórias espaciais e aversivas em ratos (Parsons et al. 2006a; Bekinschtein et al. 2007; Dash et al. 2006; Blundell et al. 2008). É possível que o efeito amnésico na consolidação da memória de esquiva inibitória induzida pela inibição da mTOR hipocampal descrito na literatura possa ocorrer também na reconsolidação da memória. Este efeito talvez ocorra pela administração intra-amigdalar de rapamicina. A via da mTOR está relacionada a consolidação da memória aversiva de esquiva inibitória, mas uma ampla revisão da literatura não encontrou relato do papel da mTOR na reconsolidação da memória na tarefa de esquiva inibitória, bem como o efeito da inibição de mTOR amigdalar por rapamicina nesta tarefa comportamental. Da mesma forma, a participação de mTOR amigdalar na tarefa de reconhecimento de objetos, que possui um componente aversivo muito menos evidente, ainda não está descrito. No hipocampo, a via de sinalização de mTOR participa da consolidação e reconsolidação deste tipo de memória (Myskiw et al. 2008). Como existem relatos na literatura sobre a influência da amígdala basolateral sobre a consolidação da memória de reconhecimento de objetos, possivelmente pela ativação de receptores Beta adrenérgicos (Roosendaal et al. 2008), se torna importante analisar se a via de mTOR amigdalar também é necessária para a formação e reconsolidação da memória de reconhecimento de objetos.

7. REVISÃO DA LITERATURA

7.1. CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA

A consolidação da memória começa depois da aquisição. Nessa fase ocorre a formação e armazenamento da memória aprendida. Esse processo ocorre com a gradual conversão do traço mnemônico, que inicialmente é lábil, em uma memória estável. No processo de consolidação, as novas memórias não se formam no seu estado final, mas sim em um estado lábil que é suscetível a diversos fatores, tais como tratamento eletroconvulsivo, hipotermia, traumas, estresse, administração de fármacos amnésicos e até mesmo, novos aprendizados (McGaugh, 2000; Squire e Kandel, 2001; Roesler e McGaugh, 2010).

As memórias de curta duração persistem poucos minutos ou horas, não requerem síntese de novos mRNAs e proteínas, enquanto as memórias de longa duração necessitam destes processos, além da participação de várias vias de sinalização metabólicas celulares (Alberini et al. 2006). Mesmo envolvendo em algumas ocasiões as mesmas estruturas nervosas para seu processamento, as memórias de curta e de longa duração utilizam mecanismos moleculares independentes (Izquierdo et al. 1998; Squire e Kandel, 2003). O processo de consolidação leva a uma progressiva estabilização pós-aquisição das memórias (McGaugh, 2000; Dudai, 2004; Roesler e McGaugh, 2010).

7.2. RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA

A fase de consolidação da memória é investigada há mais de 100 anos e a hipótese inicial sobre o fenômeno prediz que, uma vez que a memória encontra-se consolidada, ela não sofre mais interferência de tratamentos amnésicos (McGaugh 2000). Essa hipótese por muito tempo foi praticamente um dogma dos estudos com aprendizado e memória. Mas ela tem sido desafiada

pela hipótese da reconsolidação, que prediz que o período de labilidade da memória não depende unicamente do tempo desde o aprendizado, mas sim do estado funcional da memória (Dudai, 2004). Memórias já consolidadas tornam-se novamente lábeis e susceptíveis a intervenção quando reativadas (Milekic e Alberini, 2002) e para que persistam, precisam passar por um novo processo de estabilização, dependente de síntese protéica, chamado de reconsolidação (Nader et al. 2000a; Sara, 2000). Muitos tratamentos que bloqueiam a consolidação são capazes de prejudicar a reconsolidação, o que levou à hipótese de que a reconsolidação envolve a recapitulação dos acontecimentos moleculares que ocorrem durante a consolidação (Nader et al. 2000a), mas mesmo com algumas semelhanças, consolidação e reconsolidação não são processos idênticos (Squire et al. 2007). A natureza do processo de reconsolidação da memória tem sido debatida. Inicialmente foi argumentado que a reativação da memória induzia a recapitulação da consolidação (Alberini et al. 2006). Posteriormente, foi proposto a hipótese de que a reconsolidação estaria relacionada de alguma forma, com a consolidação da memória, que ficaria persistente até o momento de sua reativação. Os autores que acreditam nesta segunda hipótese sugerem que a memória estabilizada sofre ações endógenas, ou seja, modificações a partir de reativações espontâneas, de tempos em tempos que contribuem para o processo de consolidação até o momento em que uma nova consolidação aconteça (Izquierdo et al. 1998; Squire e Kandel, 2003; Eisenberg e Dudai 2004). No período anterior a esta segunda consolidação, a memória retorna a um estado de labilidade podendo ser prejudicada, como foi comentado anteriormente. A reconsolidação pode fornecer uma janela de oportunidades para a manutenção e o fortalecimento do traço mnemônico evocado (Nader et al. 2000b). Existem indícios de que vias de sinalização que controlam a tradução do mRNA estão envolvidas na consolidação de memórias bem como na persistência do traço após sua evocação (Bekinschtein et al. 2007; Parsons et al. 2006a).

7.3. mTOR

mTOR é uma proteína quinase evolutivamente conservada que fosforila o sítio serina/treonina de seus alvos e tem sua ação inibida por rapamicina, um macrolídeo proveniente de uma bactéria chamada *Streptomyces hygroscopicus*. A extremidade C terminal de mTOR contém um domínio quinase catalítico que por sua vez contém pequenas regiões que são locais de fosforegulação chamados domínios regulatórios negativos (NRD) ou domínios repressores. (Xiangyu, 2009). No interior destas regiões, a fosforilação da treonina 2446, serina 2448 e serina 2481 estão vinculadas a altos níveis de atividade de mTOR (Jacinto, 2008). Próximo a este domínio está o domínio de ligação a rapamicina de FKBP12 (FRB), que é onde se dá a interação inibitória entre rapamicina e mTOR, em que a ligação de rapamicina à proteína de ligação FK506 (FKBP12) interrompe a interação chave para o funcionamento de mTOR, que controla a tradução pela formação de um complexo sinalizador (Guertin e Sabatini, 2005).

A proteína mTOR é formada de dois complexos protéicos denominados complexo 1 da mTOR (mTORC1) e complexo 2 da mTOR (mTORC2). O mTORC1 modula a tradução em resposta a nutrientes, hormônios e fatores de crescimento e é composto pela proteína regulatória associada a TOR (Raptor), pela Proteína GTPase subunidade β (mLST8) e pela Proteína de interação que contém o domínio mTOR (Deptor) (Hoeffler e Klann, 2010). Alguns componentes de mTORC1 também estão presentes em mTORC2, como mLST8 e Deptor. Outras proteínas como a proteína associada a TOR insensível a rapamicina (Rictor), proteína de interação da proteína quinase de mamíferos ativada por estresse (mSIN1) e a proteína rica em prolina (Protor) são encontradas apenas em mTORC2 (Frias et al. 2006).

Os complexos mTORC1 e mTORC2 fosforilam substratos diferentes e regulam funções celulares distintas. mTORC2 fosforila AKT, SGK1 e PKC (membros da família de proteínas quinase AGC), as quais controlam a sobrevivência celular e a organização do citoesqueleto (Garcia Martinez et al. 2008). Por outro lado, mTORC1 estimula o crescimento e proliferação celular pelo aumento da fase de iniciação da tradução, e isto é mediado por dois alvos: a proteína de ligação a eIF4E e a S6 quinase (Hay e Sonenberg, 2004).

Acredita-se que S6k controla a tradução pela modulação de seus alvos: fator de iniciação eucariótico 4B (eIF4B) e proteína de morte celular programada 4 (PDCD4) (Ma e Blenis, 2009). A família das 4E-BPs é formada por moléculas repressoras da tradução que incluem: 4E-BP1, 4E-BP2 e 4E-BP3. Essas proteínas suprimem a tradução de um conjunto de transcritos chamados "mRNAs sensíveis a eIF4E" por competir com o fator de iniciação eucariótico 4G (eIF4G) pela ligação a fator de iniciação eucariótico 4E (eIF4E), e assim, evitam a formação do complexo de iniciação eIF4F (Woo et al. 2007).

Devido a complexidade da 5'UTRs, mRNAs sensíveis a eIF4E são traduzidos com menos eficiência que outros. Quando ativado, mTORC1 fosforila os sítios treonina 37 e treonina 46 de 4E-BP1, o que por sua vez atua como um evento iniciador, essencial para a fosforilação dos sítios serina 65 e treonina 70, que levam a liberação de eIF4E e subsequente formação do complexo eIF4E. mTORC1 também modula indiretamente a síntese de proteínas pela ativação de TIF-IA e consequente estimulação da transcrição do RNA ribossomal e biogênese ribossomal (Mayer et al. 2004), bem como pela fosforilação de eIF4G (Raught et al. 2000). A proteína mTOR é ativada pela ativação do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA-R) por glutamato; receptor do ácido amino 3-hidroxi-5-metil-4-isoxalatopropionico (AMPA-R) por glutamato; receptor Tirocina quinase (TrK) pelo fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluRs) (Slipczuk et al. 2009). Todos estes receptores são importantes para indução e persistência de LTP e LTD e mTOR atua como um alvo destes receptores e algumas vias de sinalização como quinase dependente de fosfoinosítido 1 (PDK1), quinase fosfatidilinositol 3 (PI3K), Akt e proteína do complexo tuberosa esclerose 1 e 2 (Tsc1/2) (Banko et al. 2005; Slipczuk et al. 2009).

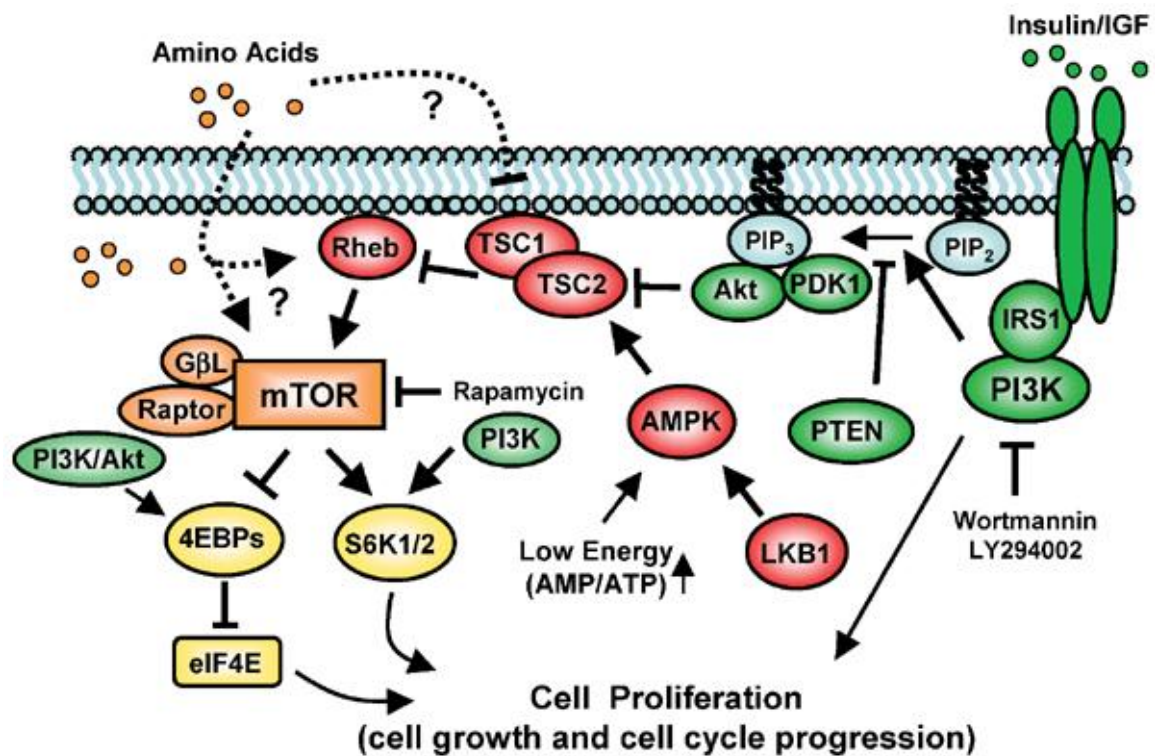


Fig. 4. Desenho esquemático da via de sinalização de mTOR (Fingar e Blenis, 2004).

7.4. VIA DE SINALIZAÇÃO DE mTOR E MEMÓRIA

A primeira evidência que relacionou a via de sinalização de mTOR a plasticidade sináptica surgiu de estudos usando rapamicina em *Aplysia californica* (Casidio et al. 1999; Khan et al. 2001). Além de atuar na fase de iniciação da tradução, a rapamicina também bloqueia a fosforilação do fator de alongação eucariótico 2 (eEF2) na fase de alongação inibindo facilitação de longa duração (LTF) (Carroll et al. 2004). Através destes primeiros achados, percebeu-se que esta via de sinalização é essencial para formação de alterações duradouras na plasticidade sináptica em invertebrados. Tang e colaboradores (2002) demonstraram pela primeira vez que a inibição de mTOR por rapamicina bloqueia LTP em cultura de células hipocâmpais, argumentando que mTOR estaria envolvida com a maquinaria de tradução (Tang et al. 2002).

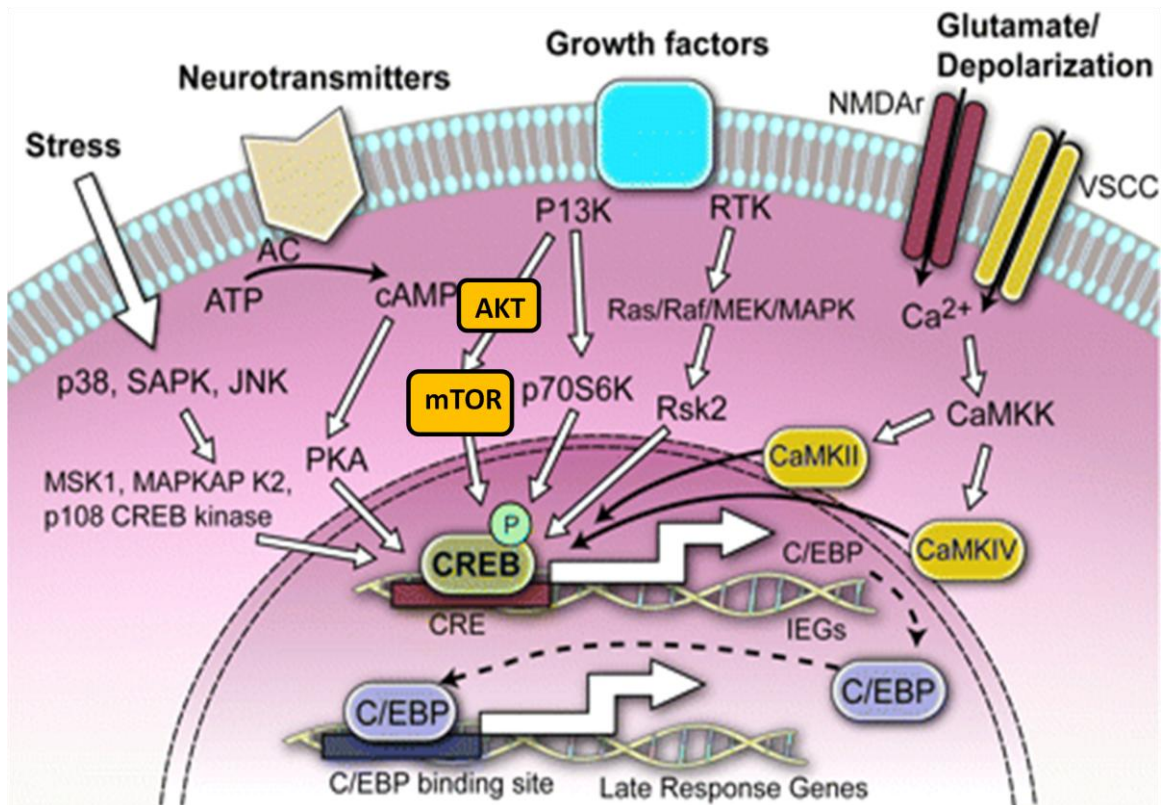


Fig. 5. Desenho esquemático ilustrando o papel da síntese de proteínas na formação da memória. Adaptado de Alberini, 2009.

Em neurônios, a rapamicina bloqueia a expressão de componentes chave para a maquinaria da tradução, como 4E-BP e eIF4E, e mTOR regula a síntese de diversas proteínas envolvidas na plasticidade sináptica e formação da memória, incluindo Arc, CaMKII e Homer2 (Dash et al. 2006). Muitas dessas proteínas são sintetizadas localmente nos dendritos pela ativação da via de mTOR, sugerindo que a rapamicina tenha um efeito seletivo na tradução nos dendritos (Tang et al. 2002). De fato, foi reportado que LTP induzida por estímulo tetânico em dendritos da região CA1 do hipocampo, pode ser bloqueado por rapamicina. Adicionalmente, a ativação de NMDA leva a plasticidade sináptica dependente de síntese protéica através da ativação da via de mTOR nos dendritos na região CA1 do hipocampo dorsal (Tang et al. 2002). Estudos sugerem que por este mecanismo mTOR esta envolvida na formação da memória de longa duração, uma vez que a rapamicina bloqueia parcialmente LTM (Blundell et al. 2008).

Camundongos *knockout* sem o regulador negativo de mTOR, TSC2 ou os alvos de mTOR, S6K e 4E-BP apresentam plasticidade sináptica alterada e déficit de memória (Banko et al. 2005). Contudo, mesmo com alguns resultados sólidos e bem estruturados a cerca do papel de mTOR na formação da memória (Blundell et al. 2008; Gafford et al. 2011), ainda existem resultados controversos. Por exemplo, somente com a administração de uma dose alta de rapamicina (150mg/kg) é possível prejudicar a memória de longa duração contextual em camundongos (Ehninger et al. 2008). Além disso, evidências recentes sugerem que rapamicina não bloqueia L-LTP no giro dentado (Panja et al. 2009) e a tradução também pode ser mantida mesmo na presença de rapamicina (Ma e Blenis, 2009). Os fenótipos gerados em camundongos *knockout* com a ausência de TSC2, FKBP12 são contraditórios em relação a plasticidade neural e memória (Hoeffler et al. 2008). Por fim, camundongos sem S6K exibem L-LTP, o que sugere que S6K não controla a tradução mediada por mTOR, necessária para que haja L-LTP. (Antion et al. 2008). Mesmo que camundongos sem 4E-BP2, outro alvo de mTOR, apresentem déficit na formação da memória de longa duração, foi visto que mTORC1 é incapaz de fosforilar 4E-BP2 em cérebro de adultos (Bidinosti et al. 2010). Este fato sugere que a síntese de proteínas controlada por mTORC1 no cérebro não dependa de 4E-BP2 (Stoica et al. 2010).

mTOR é ativada por uma grande variedade de sinais sinápticos e leva a alterações dependentes de tradução na força sináptica e LTM. mTORC1 funciona com um grande integrador de sinais sinápticos regulando a tradução. Em humanos, o único estudo que realizado até o presente momento mostrou que o bloqueio de mTORC1 melhora a cognição (Lang et al. 2009). Esses resultados mostram que o papel de mTOR na consolidação da memória está longe de ser completamente esclarecido. Dado que a via de sinalização de mTOR está envolvida em várias doenças neurodegenerativas (Bishop, 2010) e sua inibição está relacionada com o aumento da longevidade (Harrison et al. 2009), é crucial que a participação de mTOR na consolidação e reconsolidação da memória seja elucidada.

Já foi mostrado que mTOR na região CA1 do hipocampo dorsal participa da consolidação da tarefa de esquiva inibitória em ratos (Bekinschtein et al 2007) e na consolidação e reconsolidação de reconhecimento de objetos (Myskiw et al.

2008). Foi sugerido recentemente que mTOR hipocampal também desempenha um papel na reconsolidação de medo condicionado em ratos (Gafford et al. 2011). Da mesma forma, já foi mostrado que mTOR na amígdala basolateral está envolvida na consolidação da tarefa de *cued fear conditioning* e *contextual fear conditioning* (Parsons et al. 2006a) e que a infusão de rapamicina sistêmica em camundongos prejudica a reconsolidação desta segunda tarefa (Blundell et al. 2008). Contudo, o papel de mTOR amigdalar na consolidação e reconsolidação da tarefa de esquiva inibitória e reconhecimento de objetos ainda não foi reportado.

Na tarefa de EI, existem dois componentes principais, o aversivo, representado pelo choque, que requer a participação da amígdala e o componente contextual, representado pela caixa de esquiva inibitória, que requer a participação do hipocampo (Roesler et al. 2003b). Por outro lado, na tarefa de RO, o componente aversivo é mais discreto, contudo, a exposição do animal a um contexto ou objeto novo gera um certo grau de estresse (Roosendaal et al. 2006). Por causa disso, a amígdala modula a consolidação desta memória (Roosendaal et al. 2008), enquanto o hipocampo está associado a noção espacial e ao contexto (Moses et al. 2002).

8. OBJETIVOS

8.1. OBJETIVO GERAL

- Avaliar o papel da sinalização por mTOR na formação e reconsolidação da memória.

8.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o papel da mTOR amigdalar e hipocampal na consolidação da memória de esquiva inibitória através da administração de rapamicina na amígdala basolateral e hipocampo dorsal após o treino.
- Investigar o papel da mTOR amigdalar e hipocampal na reconsolidação da memória de esquiva inibitória através da administração de rapamicina na amígdala basolateral e hipocampo dorsal após a reativação.
- Investigar o papel da mTOR amigdalar e hipocampal na consolidação da memória de reconhecimento de objetos através da administração de rapamicina na amígdala basolateral e hipocampo dorsal.
- Investigar o papel da mTOR amigdalar e hipocampal na reconsolidação da memória de reconhecimento de objetos através da administração de rapamicina na amígdala basolateral e hipocampo dorsal.

9. MATERIAIS E MÉTODOS

9.1. DELINEAMENTO DE PESQUISA

Este estudo teve caráter experimental, no qual foi observado o efeito da inibição da mTOR amigdalár e hipocampal por rapamicina sobre a consolidação e reconsolidação da memória aversiva de esquivar inibitória em ratos.

9.2. LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Os experimentos foram realizados na Unidade de Animais de Experimentação do Centro de Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e no Laboratório de Neurofarmacologia e Biologia de Tumores Neurais no Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob a orientação do Prof. Dr. Rafael Roesler.

9.3. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos adquiridos da Fundação Estadual de Pesquisa em Saúde (FEPPS-RS) e do Centro de Reprodução de Animais de Experimentação da UFRGS (CREAL-UFRGS). A manutenção dos roedores ficou a cargo dos bioteristas da Unidade de Experimentação Animal (UEA – HCPA) e ICBS - UFRGS, sob controle de um médico veterinário. Os animais foram mantidos no ratário das unidades em grupos de cinco animais por caixa (dimensões de 41x34x17cm comprimento x largura x altura), sob condições de temperatura e luz controlados ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclo claro-escuro de 12 horas) com água e comida disponíveis *ad libitum*. Os experimentos foram realizados entre 10h e 18h. Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Ética para Uso de Animais do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (projeto número 09-641). Todos os esforços foram realizados para diminuir o número de animais utilizados e seu sofrimento.

9.4. TRATAMENTOS

Doses e regimes de tratamento foram escolhidos com base em resultados preliminares, dados da literatura e experimentos piloto. Para determinação da dose intra-cerebral foi infundido 600 nM de rapamicina dissolvido em veículo (1% de DMSO em salina) no volume de 1µl (na região CA1 do hipocampo dorsal) e/ou 0,5µl (na amígdala basolateral) ou veículo no mesmo volume.

9.5. TAMANHO DA AMOSTRA

O tamanho amostral foi baseado em estudos anteriores. O n da amostra foi de 12 animais por grupo (Roesler et al. 2003; Roesler et al. 2006a; Roesler et al. 2006b; Luft et al. 2008; Roesler et al. 2009). Foram usados no total 520 animais, incluindo animais excluídos do estudo.

9.6. PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Os ratos utilizados nos experimentos utilizando a administração intra-cerebral de rapamicina foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas sob a amígdala basolateral e hipocampo dorsal. Os animais foram tratados com atropina (medicação pré-anestésica para o tratamento de bradicardia e assistolia) e com lidocaína, sedados com quetamina (75mg/kg) e xilazina (25mg/kg) e implantados bilateralmente com cânulas que permitiram micro-infusões da droga na amígdala basolateral (coordenadas: Antero posterior: -2,8mm em relação ao bregma, médio-lateral: ±4,8mm em relação ao bregma e ventral: -7,5mm em relação à superfície do crânio) ou área CA1 do hipocampo dorsal (coordenadas: anteroposterior: -4,3 mm em relação ao bregma; médio lateral: ±3 mm em relação ao bregma e ventral: -2 mm em relação à superfície do crânio) como descrito anteriormente em experimentos piloto e estudos de nosso grupo de pesquisa (Roesler et al. 2003a; Roesler et al. 2003b; Roesler et al. 2008; Reolon et al. 2009). As cânulas foram fixadas com auxílio de cimento acrílico auto polimerizante e de pequenos parafusos (1,4 mm

de diâmetro afixados no crânio). Os animais passaram por um período de recuperação de sete dias após a cirurgia.



Fig.6. Aparelho para cirurgia estereotáxica

9.7. TAREFAS COMPORTAMENTAIS

9.7.1. ESQUIVA INIBITÓRIA

Os animais foram submetidos ao treino e testes de retenção de memória de curta e longa duração na tarefa de esquiva inibitória, um modelo animal de memória motivada emocionalmente de caráter aversivo, conforme descrito em estudos anteriores de nosso grupo (Meller et al. 2004; Maurmann et al. 2010). O aparato da esquiva inibitória consiste de uma caixa de acrílico de 50x25x25cm com uma grade de barras de aço paralelas de 1 mm de diâmetro. Na sessão de treino, os animais foram colocados na plataforma (com largura de 7 cm, localizada junto à parede esquerda da caixa) e sua latência de descida sobre a grade foi medida com a utilização de cronômetros. Quando os animais desceram

com suas quatro patas na grade, foi dado 1 choque de 2 segundos, com intensidade de 0,7 mA. Na sessão de teste de memória de curta duração (realizada 1,5h após o treino) e longa duração (realizada 24h após o treino), os animais foram recolocados na plataforma e suas latências de descida à grade registradas e usadas como uma medida de retenção (memória) da tarefa. Os animais foram treinados conforme descrito acima e 24 horas depois, para que ocorresse a reativação da memória, foi realizado um teste no qual foi medida a latência de descida do animal, sem reforço do estímulo aversivo. Um segundo teste foi realizado para medir a retenção 24 horas após a reativação da memória.



Fig.7. Caixa de esquiva inibitória.

9.7.2. RECONHECIMENTO DE OBJETOS

Os animais foram individualmente habituados à caixa do campo aberto por 2 minutos. Durante a sessão de treino, realizada após 24h, os animais foram re-

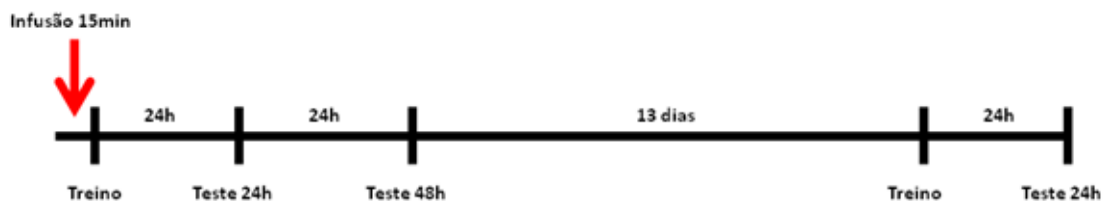
expostos ao campo aberto contendo dois objetos idênticos (posicionados em dois cantos adjacentes, a 9 cm das paredes) e o tempo gasto pelo animal na exploração de cada objeto foi registrado durante 5 minutos. Os objetos utilizados no treino foram duas garrafas idênticas (objeto A) e houve o contrabalanceamento dos objetos pelo menos uma vez ao longo das sessões de treino. Exploração foi definida como atividade de toque ou cheiro pelos animais aos objetos com o nariz ou as patas. Durante a sessão de teste, realizada 3h ou 24h após o treino, o animal foi colocado novamente na caixa, na presença de um objeto familiar utilizado na sessão de treino (objeto A), e de um objeto novo (lata = objeto B), com textura, cor e tamanhos semelhantes, porém formas distintas. O percentual de tempo da exploração de qualquer um dos objetos (na sessão de treino e na sessão de teste) foi utilizada como medida de retenção de memória de reconhecimento. Foi feito um experimento anterior para constatar que não havia preferência dos animais por nenhum dos objetos utilizados ao longo do experimento. Os animais foram treinados conforme indicado acima e 24 horas depois, para que ocorra a reativação da memória, foi realizado o teste no qual se mediu a porcentagem de exploração dos objetos, com um familiar (objeto A) e um objeto novo (objeto B). Um segundo teste foi realizado para medir a exploração 24 horas após a reativação da memória com um familiar (objeto A) e um outro objeto novo (Cofre em forma de lápis = objeto C).



Fig.8. Caixa de campo aberto e objetos usados na tarefa de reconhecimento de objeto.

9.8. DESENHOS EXPERIMENTAIS

9.8.1. EXPERIMENTOS PARA INVESTIGAR O EFEITO DA INIBIÇÃO DE mTOR AMIGDALAR E HIPOCAMPAL NA CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA DE ESQUIVA INIBITÓRIA E RECONHECIMENTO DE OBJETOS



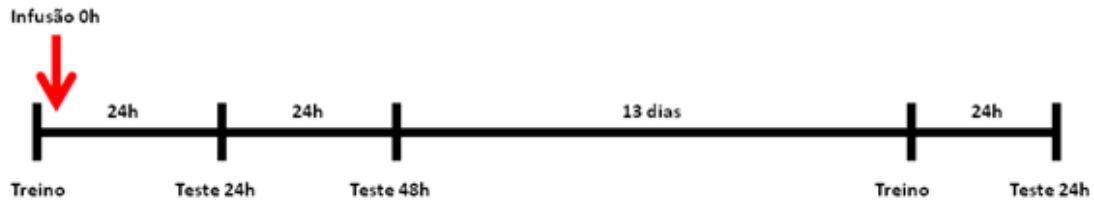


Fig. 9. Desenho experimental usado para investigar a consolidação na tarefa de esquila inibitória representando o tempo da infusão de rapamicina ou veículo na região CA1 do hipocampo dorsal e na amígdala basolateral e os momentos de treino e teste.

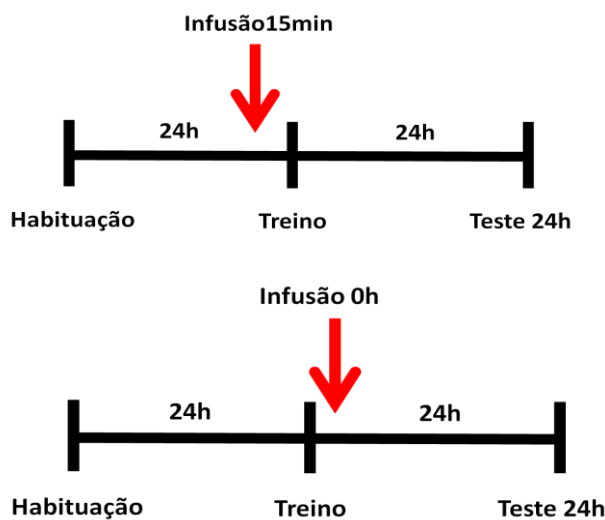


Fig. 10. Desenho experimental usado para investigar a consolidação na tarefa de reconhecimento de objetos representando o tempo da infusão de rapamicina ou veículo na região CA1 do hipocampo dorsal e na amígdala basolateral e os momentos de treino e teste.

Para investigar o efeito da inibição de mTOR na consolidação da memória de esquila inibitória e reconhecimento de objetos, os animais foram treinados em EI ou RO. Foram realizados dois tempos de administração, quinze minutos antes e imediatamente depois do treino. Os ratos receberam micro infusão intra-amigdalár ou intra-hipocampal de rapamicina. Os animais foram testados 24 horas depois para análise da retenção da memória. Quatorze dias após o treino, os animais foram submetidos a um segundo treino e foram testados 24 horas

depois. Um experimentador cego para os tratamentos avaliou a latência dos testes.

9.8.2. EXPERIMENTOS PARA INVESTIGAR O EFEITO DA INIBIÇÃO DE mTOR AMIGDALAR E HIPOCAMPAL NA RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA DE ESQUIVA INIBITÓRIA E RECONHECIMENTO DE OBJETOS

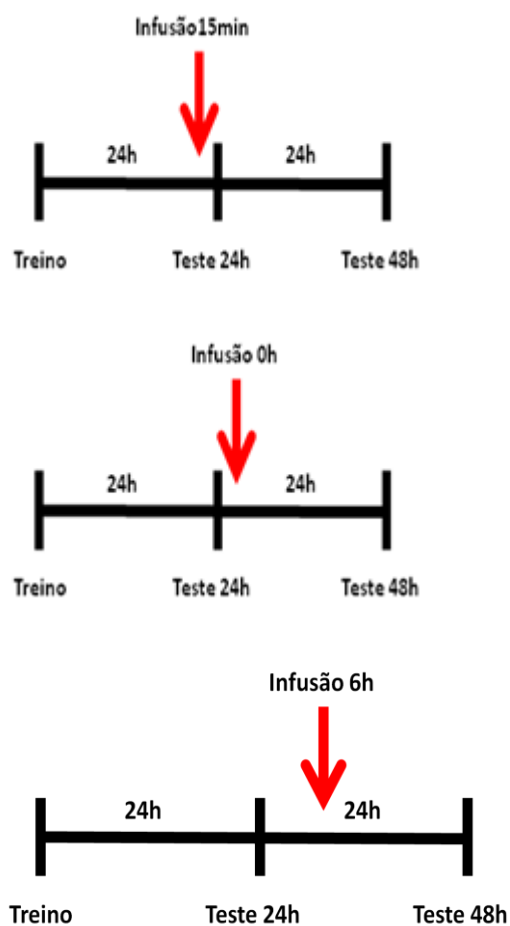


Fig. 11. Desenho experimental usado para investigar a reconsolidação na tarefa de esQUIVA INIBITÓRIA representando o tempo da infusão de rapamicina ou veículo na região CA1 do hipocampo dorsal e na amígdala basolateral e os momentos de treino e teste.

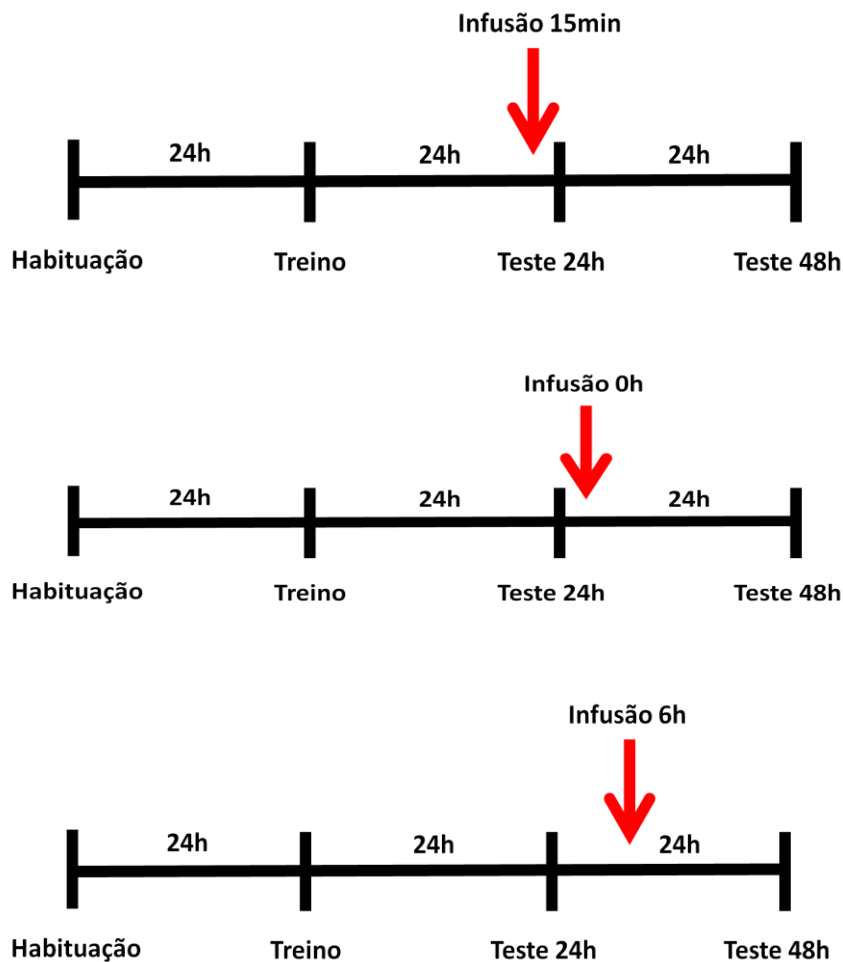


Fig. 12. Desenho experimental usado para investigar a reconsolidação na tarefa de reconhecimento de objetos representando o tempo da infusão de rapamicina ou veículo na região CA1 do hipocampo dorsal e na amígdala basolateral e os momentos de treino e teste.

Para investigar o efeito da inibição de mTOR na reconsolidação da memória de esquiva inibitória e reconhecimento de objetos os animais foram treinados e testados 24 horas depois em EI ou RO, onde as memórias foram reativadas. Foram realizados dois tempos de administração de rapamicina intra-amigdalár ou intra-hipocampal, 15 minutos antes e imediatamente após o teste. Os animais foram submetidos a um segundo teste 24 horas depois para medir a retenção da memória. Um experimentador cego para os tratamentos avaliou a latência dos testes.

9.8.2.1. EXPERIMENTOS CONTROLE SEM REATIVAÇÃO DE ESQUIVA INIBITÓRIA E RECONHECIMENTO DE OBJETOS

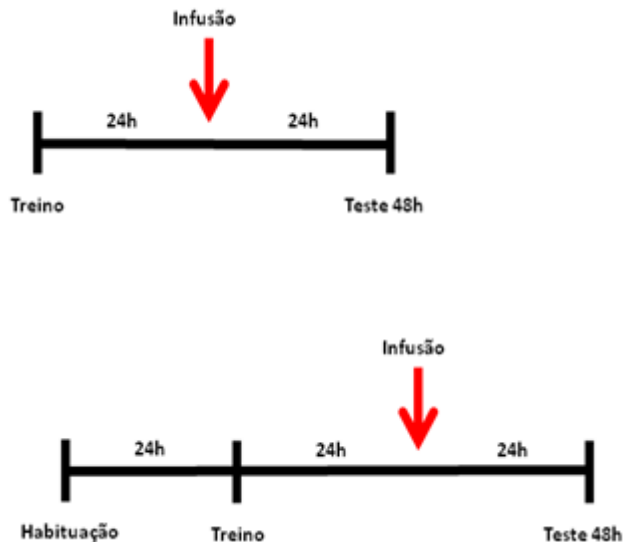


Fig. 13. Desenho experimental usado para investigar se o efeito de rapamicina na reconsolidação na tarefa de esQUIVA INIBITÓRIA e reconhecimento de objetos é dependente de reativação da memória, representando o tempo da infusão de rapamicina ou veículo na região CA1 do hipocampo dorsal e na amígdala basolateral e os momentos de treino e teste.

Para investigar se as infusões de rapamicina prejudicaram de fato a reconsolidação da memória de esQUIVA INIBITÓRIA e reconhecimento de objetos, os animais foram treinados e diferentemente do protocolo padrão de reconsolidação, não foram submetidos à reativação da memória. No dia seguinte ao treino foram realizadas micro-infusões de rapamicina na amígdala ou hipocampo em uma sala diferente da sala usada no treino. Os animais foram testados 24 horas depois para averiguar se o efeito da rapamicina é dependente da reativação da memória. Um experimentador cego para os tratamentos avaliou a latência dos testes.

9.8.2.2. EXPERIMENTOS CONTROLE "REMINDER" DE ESQUIVA INIBITÓRIA



Fig. 14. Desenho experimental usado para investigar se o efeito de rapamicina na reconsolidação da memória na tarefa de esquiva inibitória pode ser revertido pelo choque reminder, representando o tempo da infusão de rapamicina ou veículo na região CA1 do hipocampo dorsal e na amígdala basolateral e os momentos de treino e teste.

Para investigar se as infusões de rapamicina prejudicaram de fato a reconsolidação da memória de esquiva inibitória os animais foram treinados e testados em EI. Imediatamente após o teste os animais receberam micro-infusões de rapamicina intra-amígdalar ou intra-hipocampal. Os animais foram testados 24 horas depois para reativação da memória. Seis dias depois, os animais passaram por uma sessão de *reminder*, onde a intensidade do choque utilizado foi incapaz de provocar um novo aprendizado. Neste caso, o choque serviu apenas como uma lembrança do primeiro treino. No dia seguinte os animais foram testados novamente. Um experimentador cego para os tratamentos avaliou a latência dos testes.

9.9. ANÁLISE HISTOLÓGICA

Dois dias após os testes, os animais foram infundidos com 0,5 μ l ou 1 μ l de azul de metileno 4% por amígdala e hipocampo, respectivamente. Quinze minutos após a infusão, foi realizada eutanásia por decapitação. Os encéfalos foram removidos e armazenados em formalina por quatro a sete dias. Com o auxílio de uma lupa, foi verificado se a cânula estava posicionada corretamente, caso a cânula estivesse mal posicionada, os resultados foram desconsiderados.

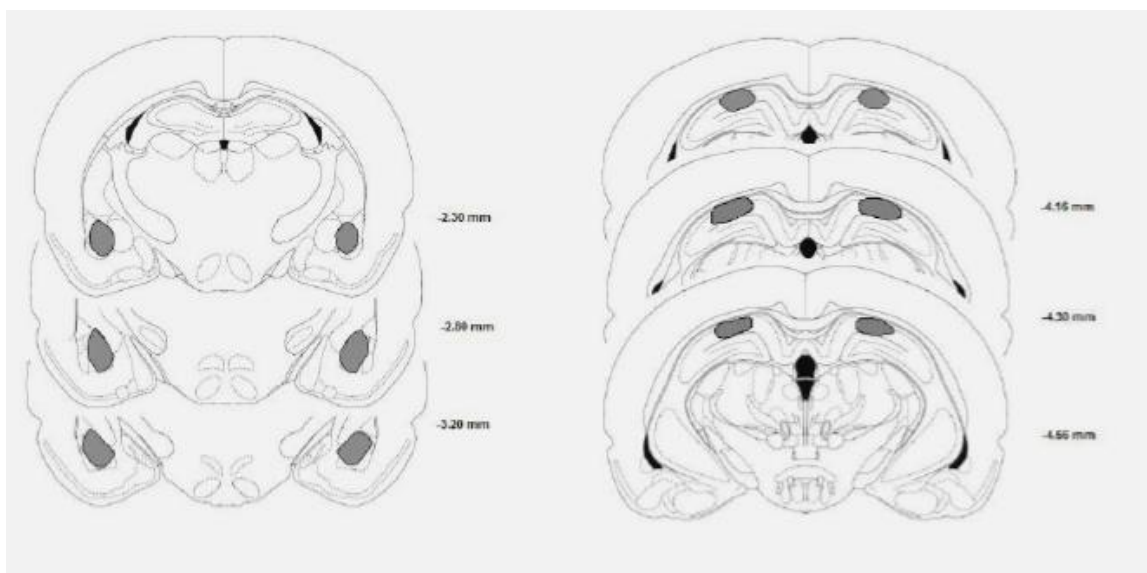


Fig. 15. Esquema da difusão do fármaco na amígdala basolateral e na região CA1 do hipocampo dorsal. Adaptado de Paxino e Watson (1997).

9.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro. Diferenças entre os grupos experimentais foram analisadas através do teste não paramétrico de Mann-Whitney. Diferenças entre treino e teste no mesmo grupo foram analisadas através do teste não paramétrico de Wilcoxon (, Maurmann et al. 2010; Reolon et al. 2011; Pardo Andreu et al. 2011). As análises estatísticas foram feitas no programa PASW 18. Em todas as comparações, valores de P menores que 0,05 indicaram diferenças significativas.

Parte II

10. 1ºARTIGO DA TESE: Inhibition of mTOR by rapamycin in the amygdala or hippocampus impairs formation and reconsolidation of inhibitory avoidance memory. (2011, doi:10.1016/j.nlm.2011.10.002). Publicado na *Neurobiology of Learning and Memory*.

Inhibition of mTOR by rapamycin in the amygdala or hippocampus impairs formation and reconsolidation of inhibitory avoidance memory

Paulo F.C. Jobim^{a,b}, Thiago R. Pedroso^{a,b}, Raissa R. Christoff^a, Aline Werenicz^a, Natasha Maurmann^{a,b}, Gustavo K. Reolon^{a,b}, Rafael Roesler^{a,b,c,*}

^aLaboratory of Neuropharmacology and Neural Tumor Biology, Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil

^bNational Institute for Translational Medicine (INCT-TM), 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

^cCancer Research Laboratory, University Hospital Research Center (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 August 2011

Revised 7 October 2011

Accepted 12 October 2011

Available online xxx

Keywords:

Rapamycin

mTOR

Protein synthesis

Consolidation

Reconsolidation

Inhibitory avoidance

ABSTRACT

Mammalian target of rapamycin (mTOR), a central regulator of protein synthesis in neurons, has been implicated in synaptic plasticity and memory. Here we show that mTOR inhibition by rapamycin in the basolateral amygdala (BLA) or dorsal hippocampus (DH) impairs both formation and reconsolidation of memory for inhibitory avoidance (IA) in rats. Male Wistar rats received bilateral infusions of vehicle or rapamycin into the BLA or DH before or after IA training or retrieval. Memory retention was tested at different time points after drug infusion. Rapamycin impaired long-term IA retention when given before or immediately after training or retrieval into the BLA. When infused into the DH, rapamycin produced memory impairment when given before training or immediately after retrieval. The impairing effects of post-retrieval rapamycin required memory retrieval and were not reversed by a reminder shock. The results provide the first evidence that mTOR in the BLA and DH might play a role in IA memory reconsolidation.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Gene expression and protein synthesis are required for long-term memory formation. The protein synthesis-dependent phase whereby newly learned, initially labile, memory traces become stabilized is known as *consolidation* (McGaugh, 2000). Consolidation of memory for inhibitory avoidance (IA), a fear conditioning paradigm in which rats or mice learn to avoid a context previously associated with a footshock, is blocked by protein synthesis inhibitors given systemically or infused directly into the dorsal hippocampus (DH) or the basolateral amygdala (BLA) (Flood, Bennett, Orme, & Rosenzweig, 1975; Milekic, Pollonini, & Alberini, 2007; Quevedo et al., 1999; Stäubli, Faraday, & Lynch, 1985).

The traditional consolidation theory has been challenged by a wave of studies showing that reactivation of a previously consolidated fear motivated memory during retrieval might render this memory again susceptible to disruption by protein synthesis inhibitors. Thus, a reactivated labile memory would need to undergo a

protein synthesis-dependent phase of re-stabilization, a process generally referred to as *reconsolidation* (Alberini, 2011; Debiec, LeDoux, & Nader, 2002; Nader, Schafe, & LeDoux, 2000; Sara, 2000), although the exact nature of this phenomenon remains a matter of debate (Alberini, 2005, 2011; Amaral, Osan, Roesler, & Tort, 2008; Miller & Sweatt, 2006; Nader & Hardt, 2009). In IA studies, evidence from experiments using systemic or intra-BLA injections of protein synthesis inhibitors have suggested that memory for IA undergoes reconsolidation (Milekic & Alberini, 2002; Milekic et al., 2007), whereas other studies have found that impairments in IA memory produced by administration of drugs around the time of retrieval are transient and may not be attributed to a deficit of memory storage (Amaral, Luft, Cammarota, Izquierdo, & Roesler, 2007; Power, Berlau, McGaugh, & Steward, 2006). From a translational point of view, understanding the molecular mechanisms underlying the reconsolidation of fear memories and the effects of pharmacological treatments on reconsolidation has clinical implications for the identification of novel treatment opportunities for fear-related neuropsychiatric disorders including post-traumatic stress disorder (PTSD) (Debiec & LeDoux, 2006; Tronel & Alberini, 2007).

Mammalian target of rapamycin (mTOR) is a central regulator of protein synthesis in neurons. mTOR is a protein kinase that acts as central component of two multi-protein signaling complexes, mTORC1 and mTORC2. The mTORC1 pathway integrates signaling

* Corresponding author at: Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500 (ICBS, Campus Centro/UFRGS), 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil. Fax: +55 51 33083121.

E-mail address: rafael.roesler@pq.cnpq.br (R. Roesler).

from neurotransmitter and growth factor receptors to influence the activity of downstream protein kinase pathways, including phosphoinositide 3-kinase (PI3K). mTOR regulates mRNA translation by controlling the phosphorylation state of the eukaryotic initiation factor 4E binding protein (4E-BP1) and p70s6 kinase (p70s6K) (for a review, see Hoeffler & Klann, 2010). Rapamycin (sirolimus), a naturally occurring macrolide derived from the soil bacterium *Streptomyces hygroscopicus*, potently inhibits mTORC1 activity by associating with the intracellular protein FKBP12, and together they bind the FKBP12-rapamycin-binding (FRB) domain of mTOR, thus preventing mTOR-protein complex formation (for reviews, see Guertin & Sabatini, 2009; Hoeffler & Klann, 2010).

Recent studies have used rapamycin as a tool to investigate the role of mTOR in memory formation and reconsolidation. Systemic administration of rapamycin impaired the consolidation of memory for contextual fear conditioning (CFC) and reduced subsequent memory retention when given after reactivation (Blundell, Kouser, & Powell, 2008). Rapamycin given systemically also impaired fear-potentiated startle to a shock-paired context, but did not disrupt startle increases when an odor cue was used (Glover, Ressler, & Davis, 2010). Consolidation and reconsolidation of CFC were impaired by rapamycin infused directly into the DH (Gafford, Parsons, & Helmstetter, 2011), and long-term retention of trace fear memory was impaired by rapamycin infused into the medial prefrontal cortex in rats (Sui, Wang, & Li, 2008). The role of mTOR in memory formation and reconsolidation in the BLA is less understood. One study has indicated that rapamycin given into the amygdala either after training or retrieval reduced memory for cued fear conditioning, however that study did not verify whether memory reactivation was required for the effect of post-retrieval rapamycin and whether the effect was long-lasting or could recover with time (Parsons, Gafford, & Helmstetter, 2006).

Only two previous studies examined the role of mTOR in memory for IA, and their findings indicate that IA memory consolidation is dependent on mTOR and sensitive to rapamycin in the DH around the time of training and 3 h after training (Bekinschtein et al., 2007; Slipczuk et al., 2009). Previous studies have not examined whether mTOR is involved in IA reconsolidation, or the role of mTOR in the amygdala in memory for IA. Here we used rapamycin infusions to investigate the effects of mTOR inhibition in the BLA or DH, around the time of acquisition or retrieval, on IA memory.

2. Methods

2.1. Animals

Adult male Wistar rats (340–440 g at time of surgery) were obtained from the institutional breeding facility (CREAL, ICBS, UFRGS). Animals were housed five per cage in plastic cages with sawdust bedding, and maintained on a 12 h light/dark cycle at a room temperature of 22 ± 1 °C. The rats were allowed *ad libitum* access to standardized pellet food and water. All experiments took place between 9 AM and 6 PM. All experimental procedures were performed in accordance with the National Institutes of Health (NIH) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the institutional animal care committee under protocol number 09-641.

2.2. Surgery

Animals were implanted under anesthesia with ketamine (75 mg/kg) and xylazine (25 mg/kg) with bilateral 14-mm or 9.0-mm, 23-gauge guide cannulae aimed 1.0 mm above the BLA or CA1 area of the DH respectively, as described in previous studies (Quevedo et al., 1999; Roesler et al., 2003). Coordinates (BLA,

anteroposterior, -2.8 mm from bregma, mediolateral, ± 4.8 mm from bregma, ventral, -7.5 mm from skull surface; DH anteroposterior, -4.3 mm from bregma; mediolateral, ± 3.0 mm from bregma; ventral, -2.0 mm from skull surface) were obtained from the atlas of Paxinos and Watson (2007). Animals were allowed to recover at least 7 days after surgery.

2.3. Drugs and infusion procedures

The general procedures for intra-BLA and intra-DH infusions were as described in previous reports (Amaral et al., 2007; Quevedo et al., 1999; Roesler et al., 2003, 2006). At the time of infusion, a 30-gauge infusion needle was fitted into the guide cannula. The tip of the infusion needle protruded 1.0 mm beyond the guide cannula and was aimed at either the BLA or the CA1 area of the DH. Drug or vehicle (1% dimethylsulfoxide, DMSO, in saline) were infused during a 30-s period. The infusion needle was left in place for an additional minute to allow diffusion of the drug away from the needle tip.

Either 15 min before or immediately after training or the 24-h retention test trial, rats received a bilateral 0.5- μ l (BLA) or 1.0- μ l (DH) infusion of vehicle or rapamycin (600 nM dissolved in vehicle; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) into either the BLA or DH. The dose of rapamycin was chosen on the basis of previous studies (Bekinschtein et al., 2007; Parsons et al., 2006) and pilot experiments. Drug solutions were freshly prepared before each experiment.

2.4. Inhibitory avoidance (IA)

We used the single-trial step-down IA conditioning as an established model of fear-motivated memory. In step-down IA training, animals learn to associate a location in the training apparatus (a grid floor) with an aversive stimulus (footshock). The general procedures for IA behavioral training and retention test were described in previous reports (Amaral et al., 2007; Quevedo et al., 1999). The IA apparatus was a 50 \times 25 \times 25-cm acrylic box (Albarsch, Porto Alegre, Brazil) whose floor consisted of parallel caliber stainless steel bars (1 mm diameter) spaced 1 cm apart. A 7-cm wide, 2.5-cm high platform was placed on the floor of the box against the left wall.

On training trials, rats were placed on the platform and their latency to step down on the grid with all four paws was measured with a digital chronometer connected to the box control unit. Immediately after stepping down on the grid, rats received a 0.7-mA, 2.0-s footshock and were removed from the apparatus immediately after the footshock. Retention test trials took place at different time points after training by placing the rats on the platform and recording their latencies to step down. No footshock was presented during retention test trials. In experiments examining possible drug effects on reconsolidation, rats that did not step down to the grid floor within 180 s during the 24-h test trial ("reactivation session") were gently put on the grid floor for 3 s. Step-down latencies on the retention test trial (maximum 180 s) were used as a measure of IA memory retention. In some of the experiments, the rats were given a retraining trial 2 weeks after the original training, or a 0.3-mA 2.0-s reminder footshock 1 week after the original training (Tronel & Alberini, 2007), followed by a retention test 24 h later. Fig. 1 shows a diagram of the design of the experiments used in this study.

2.5. Histology

Twenty-four to 72 h after behavioral testing, a 0.5- μ l (BLA) or 1.0- μ l (DH) infusion of a 4% methylene blue solution was given into the BLA or DH. Rats were killed by decapitation 15 min later, and

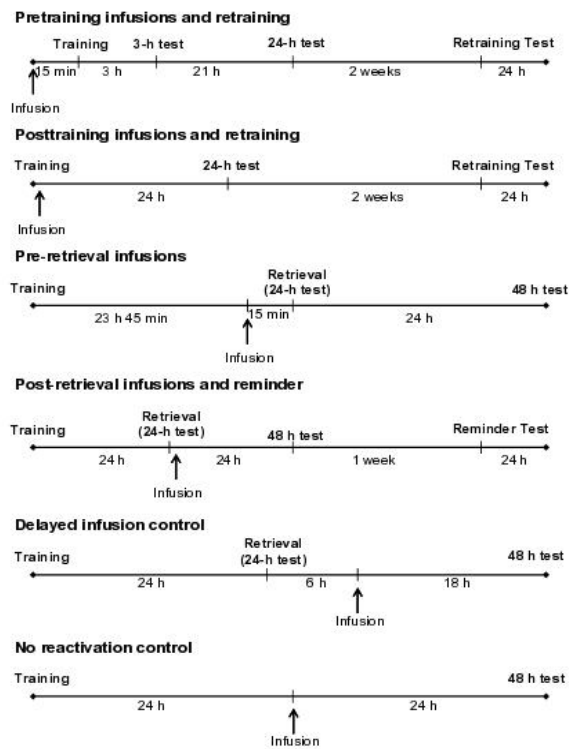


Fig. 1. Schematic diagram showing the design of the experiments used in the present study.

their brains were removed and stored in 10% formalin for at least 72 h. The brains were sectioned and examined for cannulae placement in the hippocampus and BLA. The extension of the methylene blue dye was taken as indicative of diffusion of the drugs previously given to each rat, as previously described (Amaral et al., 2007; Quevedo et al., 1999; Roesler et al., 2003, 2006). Rats with incorrect cannula placements were excluded from the analysis.

2.6. Statistics

Data are mean + SEM retention test latencies to step-down (s). Comparisons of training and retention test step-down latencies between groups were performed using Mann-Whitney *U* tests, two-tailed (Amaral et al., 2007; Quevedo et al., 1999; Roesler et al., 2003, 2006). In all comparisons, $p < 0.05$ was considered to indicate statistical significance.

3. Results

3.1. Rapamycin infused into the BLA impairs consolidation of long-term IA memory

We first examined the effects of intra-BLA infusions of rapamycin on memory for IA. Rats were given IA training and tested for retention 3 and 24 h later. Either 15 min before (pretraining infusions) or immediately after (post-training infusions) training, vehicle or rapamycin was infused into the BLA. Rapamycin given 15 min before training significantly decreased IA retention tested at 24 h ($p < 0.05$), but not at 3 h after training, compared to vehicle-injected controls (Fig. 2A). Rapamycin also impaired 24-h

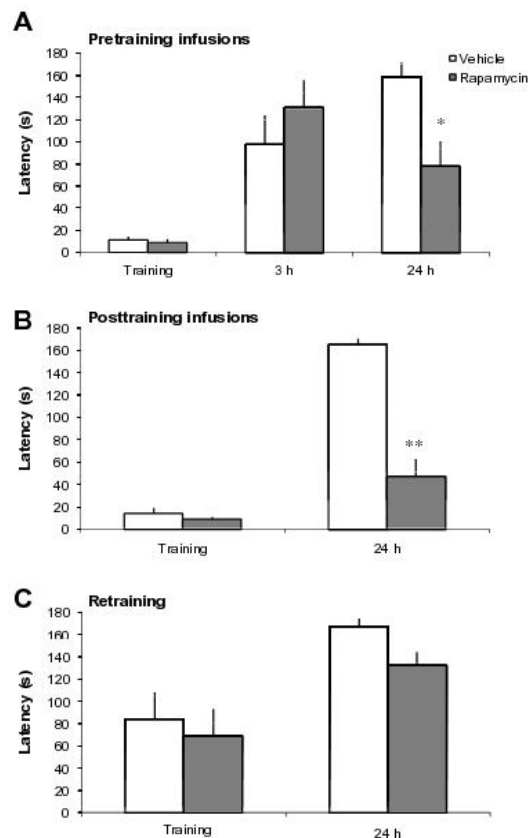


Fig. 2. Inhibition of mTOR by rapamycin in the BLA impairs formation of long-term IA memory. Rats were trained in IA and tested for retention 3 and 24 h later. Vehicle or rapamycin was infused into the BLA either before or after training. (A) Rats were infused with vehicle ($N = 9$) or rapamycin ($N = 9$) 15 min before training. When tested for retention 3 h after training both groups had similar latencies. In a second retention test 24 h after training, rats given rapamycin had significantly lower latencies compared to controls ($^{*}p < 0.05$). (B) Rats were infused with vehicle ($N = 11$) or rapamycin ($N = 11$) immediately after training. When tested for retention 24 h after training, rats given rapamycin had significantly lower latencies compared to controls ($^{**}p < 0.01$). (C) Rats given post-training rapamycin showed normal IA retention after being given a retraining drug-free 2 weeks after the original training. There was no significant difference between vehicle and rapamycin-treated rats.

retention when infused immediately after training ($p < 0.01$) (Fig. 2B). The effects of rapamycin could not be attributed to permanent impairment or neuronal damage, since rats given rapamycin post-training showed normal retention when given a second training drug-free 2 weeks after the original training (Fig. 2C). Thus, rapamycin infusion in the BLA around the time of acquisition impairs long-, but not short-term memory for IA, indicating that mTOR in the BLA is required for IA memory consolidation.

3.2. Rapamycin infused into the BLA before or after retrieval impairs reconsolidation of IA memory

We next examined whether mTOR inhibition in the BLA would affect reconsolidation-like processes by giving rats intra-BLA rapamycin around the time of retrieval. BLA-implanted rats underwent IA training followed by a retention test trial 24 h later. Fifteen minutes before (pre-retrieval infusions), immediately after

(post-retrieval infusions), or 6 h (delayed infusions) after the 24-retention test, vehicle or rapamycin was infused into the BLA. An additional retention test trial was carried out 48 h after training. There were no significant differences between groups treated with vehicle and rapamycin in training or 24-h test latencies. Intra-BLA rapamycin produced a decrease in IA latency in the 48-h test compared to controls, when given either before ($p < 0.01$; Fig. 3A) or immediately after ($p < 0.05$; Fig. 3B) training.

We also verified whether the impairing effect of intra-BLA rapamycin given after retrieval would undergo spontaneous recovery or be ameliorated by a reminder (Fig. 3C). Rats that received intra-BLA infusions after retrieval were again placed on the platform 1 week after the original training and their time to step down was recorded. There was no significant increase in the step down latencies of rapamycin-treated rats in this trial compared to the 48-h test trial. Upon stepping down, rats were given a mild reminder footshock and tested again for retention 24 h later. Latencies in the rapamycin-treated group remained significantly reduced

compared to controls ($p < 0.05$). A separate experiment using a different group of untrained rats confirmed that the reminder shock used (0.3 mA) was sub-threshold, i.e., it did not induce significant 24-h retention by itself (data not shown).

Additional control experiments were performed to confirm the specificity of the effects induced by rapamycin. A "delayed infusion" control experiment showed that intra-BLA rapamycin did not affect IA retention when infused 6 h after the 24-h test (Fig. 3D). Moreover, the impairing effect of rapamycin was dependent on memory retrieval; a "no reactivation" control experiment showed that intra-BLA rapamycin given 24 h after training failed to affect 48-h retention in the absence of a retention test trial (Fig. 3E).

Together, these results suggest that rapamycin infused into the BLA either before or after retrieval impairs IA memory tested in a subsequent retention trial compared to controls. This impairing effect requires memory retrieval associated with the drug infusion, does not recover spontaneously, and is not ameliorated by a

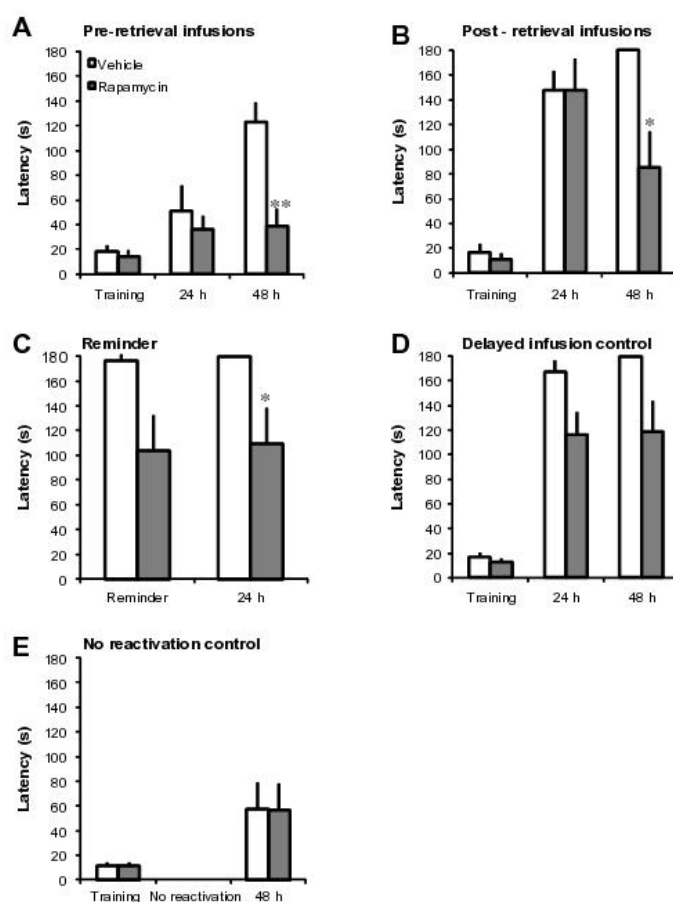


Fig. 3. Inhibition of mTOR by rapamycin in the BLA impairs IA memory reconsolidation. (A) Rats were trained in IA and tested for retention 24 h later. Fifteen minutes before the 24-h test, vehicle ($N = 11$) or rapamycin ($N = 12$) was infused into the BLA. When re-tested for retention 24 h later (48 h after training), rats given rapamycin had significantly lower latencies compared to vehicle-treated controls (** $p < 0.01$). (B) Rats were trained in IA and tested for retention 24 h later. Vehicle ($n = 10$) or rapamycin ($N = 10$) was infused into the BLA immediately after the 24-h test. When re-tested for retention 24 h later (48 h after training), rats given rapamycin showed significantly lower latencies compared to controls ($p < 0.05$). (C) The impairing effect of post-retrieval rapamycin was not ameliorated by a reminder shock. Rats used in the experiment shown in the previous panel were given a 0.3-mA footshock 1 week after training and tested for retention 24 h later. Latencies in rapamycin-treated rats remained significantly reduced compared to vehicle-treated controls (** $p < 0.01$). (D) Delayed infusion control. Rats were trained in IA and tested for retention 24 and 48 h later. Six hours after the 24-h test, vehicle ($N = 7$) or rapamycin ($N = 9$) was infused into the BLA. There was no significant difference between groups. (E) No reactivation control. Rats were trained in IA and tested for retention 48 h later. Twenty-four hours after training, vehicle ($N = 12$) or rapamycin ($N = 12$) was infused into the BLA in the absence of a retention test. There was no significant difference between groups.

reminder shock. Thus, inhibition of mTOR in the BLA might produce deficits in IA memory reconsolidation.

3.3. Rapamycin infused into the DH before but not after training impairs long-term IA memory

We then aimed to compare the findings from experiments using intra-BLA infusions of rapamycin with the effects of infusions given into the DH. Rats were trained in IA and tested for retention 3 and 24 h later. Either 15 min before or immediately after training, vehicle or rapamycin was infused into the DH. There was no significant difference between groups in training trial latencies. Rapamycin given 15 min before training significantly decreased IA retention tested at 24 h ($p < 0.01$), but not at 3 h after training, compared to vehicle-injected controls (Fig. 4A). However, rapamycin did not affect 24-h retention when infused into the DH immediately after training (Fig. 4B). Rats given pretraining rapamycin were capable of learning normally when given a second training trial drug-free 2 weeks after the original training (Fig. 4C). These

findings suggest that mTOR inhibition in the DH before acquisition impairs long-, but not short-term memory for IA.

3.4. Rapamycin infused into the DH after but not before retrieval impairs reconsolidation of IA memory

In the final set of experiments, we investigated the possible role of hippocampal mTOR in reconsolidation-like processes. Previous studies have indicated that the DH is not involved in IA reconsolidation (Cammarota, Bevilaqua, Medina, & Izquierdo, 2004; Taubenfeld, Milekic, Monti, & Alberini, 2001). Rats were trained in IA and given intra-DH infusions of vehicle or rapamycin 15 min before, immediately after, or 6 h after a 24-retention test. An additional retention test trial was carried out 48 h after training. There were no significant differences between groups treated with vehicle and rapamycin in training or 24 h test latencies. Intra-DH rapamycin did not significantly affect 48-h retention when infused before the 24-h test (Fig. 5A). However, rapamycin given after the 24-h test produced a decrease in IA latency in the subsequent 48-h test compared to controls ($p < 0.05$; Fig. 5B).

As with intra-BLA infusions, the rapamycin-induced impairment did not recover spontaneously and was not rescued by a reminder shock ($p < 0.01$; Fig. 5C). Moreover, a “delayed injection” control experiment showed that intra-DH rapamycin did not affect IA retention when infused 6 h after the 24-h test (Fig. 5D). Finally, the impairing effect of rapamycin required memory retrieval, as shown by a “no reactivation” control experiment (Fig. 5E). The results indicate that rapamycin infused into the DH after retrieval reduces IA retention tested in a subsequent retention trial, suggesting that mTOR inhibition in the DH impairs reconsolidation.

3.5. Histology

Twenty-eight rats implanted in the BLA and 10 rats implanted in the CA1 were excluded from the analysis due to incorrect cannulae placements. Fig. 6 shows representative pictures of cannula locations and a schematic drawing of the spread of dye within the BLA and DH.

4. Discussion

Together, our results suggest that administration of the mTOR inhibitor rapamycin directly into the BLA or DH can impair both formation and reconsolidation of memory for IA. Only one previous study has examined the effects of rapamycin infused into the BLA on fear memory reconsolidation, however that study did not address whether the impairing effects were reversible and dependent on retrieval (Parsons et al., 2006). Thus, to our knowledge here we provide the first evidence that intra-BLA rapamycin produces an impairment in fear memory reconsolidation that is not ameliorated by a reminder, and that mTOR in the BLA might be required for IA reconsolidation. Also, our findings provide the first evidence that pharmacological manipulation of the hippocampus after retrieval can produce a deficit in IA memory that does not recover with time or exposure to a reminder. Thus, in contrast to previous studies (Cammarota et al., 2004; Taubenfeld et al., 2001), the present results suggest that the hippocampus might play a role in reconsolidation of IA memory.

It remains unclear why intra-DH rapamycin impaired formation of IA memory when given before, but not after training, whereas, in contrast, the effects on reconsolidation were produced by infusions given after, but not before retrieval. However, this pattern of effect is similar to that previously observed in experiments using intra-DH infusions of the protein synthesis inhibitor anisomycin (Quevedo et al., 1999; Vianna, Szapiro, McGaugh, Medina, & Izquierdo,

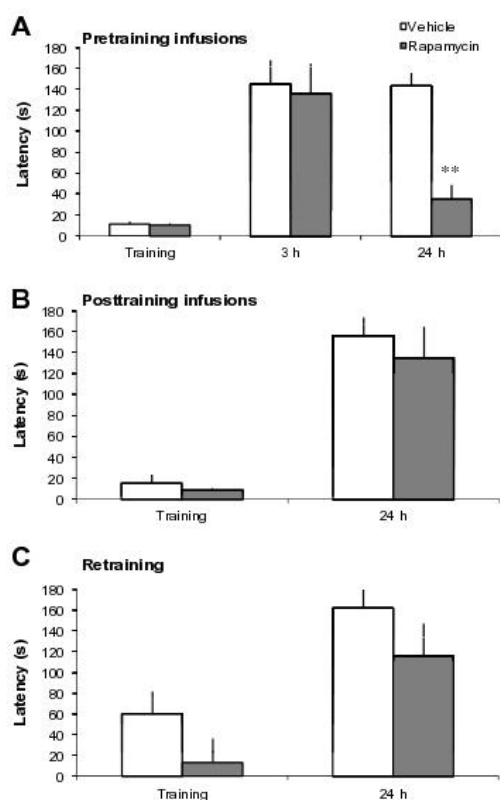


Fig. 4. Inhibition of mTOR by rapamycin in the DH before but not after training impairs long-term IA memory. Rats were trained in IA and tested for retention 3 and 24 h later. Vehicle or rapamycin was infused into the DH either before or after training. (A) Rats were infused with vehicle ($N = 13$) or rapamycin ($N = 13$) 15 min before training. Both groups showed similar latencies in a retention test carried out 3 h after training. In a second retention test 24 h given after training, rats infused with rapamycin showed significantly lower latencies compared to vehicle-treated rats ($p < 0.01$). (B) Rats were infused with vehicle ($N = 8$) or rapamycin ($N = 7$) immediately after training. When tested for retention 24 h after training, both groups showed similar latencies. There was no significant difference between vehicle- and rapamycin-treated rats. (C) Rats given post-training rapamycin showed normal IA retention after a retraining drug-free 2 weeks after the original training. There was no significant difference between vehicle and rapamycin-treated rats.

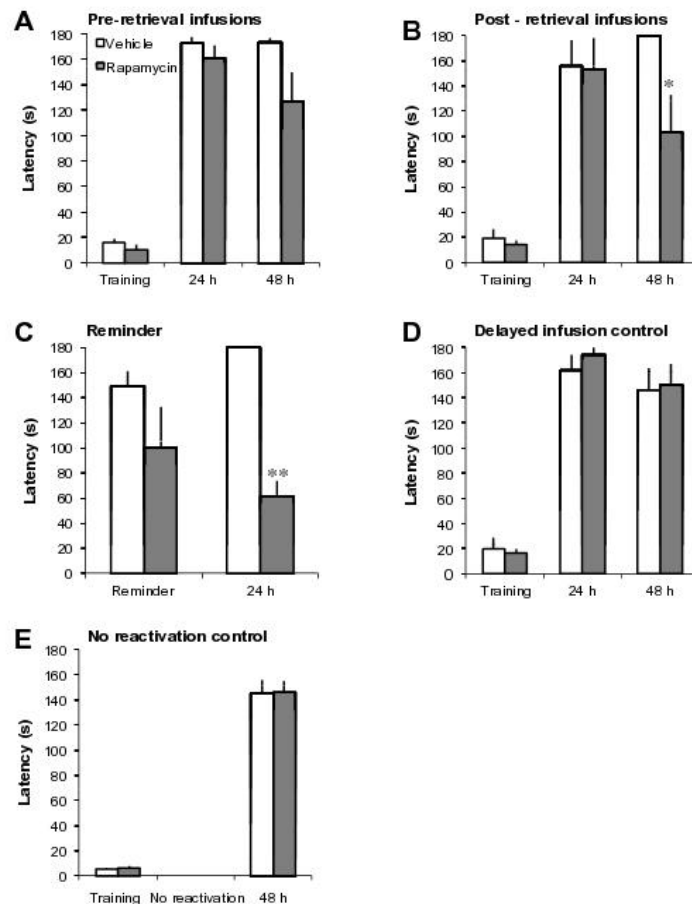


Fig. 5. Inhibition of mTOR by rapamycin in the DH after retrieval impairs IA memory reconsolidation. (A) Rats were trained in IA and tested for retention 24 h later. Fifteen minutes before the 24-h test, vehicle ($N = 11$) or rapamycin ($N = 10$) was infused into the DH. When re-tested for retention 24 h later (48 h after training), both groups showed similar latencies. (B) Rats were given IA training and tested for retention 24 h later. Vehicle ($N = 7$) or rapamycin ($N = 7$) was infused into the BLA immediately after the 24-h test. When re-tested for retention 24 h later (48 h after training), rats given rapamycin showed significantly lower latencies compared to vehicle-treated controls ($p < 0.05$). (C) The impairing effect of post-retrieval rapamycin was not ameliorated by a reminder shock. Rats used in the experiment shown in the previous panel were given a 0.3-mA footshock 1 week after training and tested for retention 24 h later. Latencies in the rapamycin-treated group were significantly reduced compared to vehicle-treated rats ($**p < 0.01$). (D) Delayed injection control. Rats were trained in IA and tested for retention 24 and 48 h later. Six hours after the 24-h test, vehicle ($N = 8$) or rapamycin ($N = 8$) was infused into the DH. There was no significant difference between groups. (E) No reactivation control. Rats were trained in IA and tested for retention 48 h later. Twenty-four hours after training, vehicle ($N = 10$) or rapamycin ($N = 12$) was infused into the DH in the absence of a retention test. There was no significant difference between groups.

2001). In experiments examining reconsolidation, intra-BLA infusions of rapamycin impaired 48-h retention when given either before or after retrieval, whereas intra-DH infusions had an effect only if given after retrieval. It is possible that this pattern of effects is related to the differential effects of protein synthesis regulated by mTOR on the BLA and DH in fear memory. Previous findings have suggested that fear memory reconsolidation in the BLA requires protein synthesis, but not de novo mRNA synthesis (Parsons, Gafford, Baruch, Riedner, & Helmstetter, 2006; but see Duvarci, Nader, & LeDoux, 2008). Increasing evidence indicates that mTOR is a key regulator of local protein synthesis induced by synaptic activity (Jiang & Schuman, 2002; Takei et al., 2004). This local synthesis occurs in specialized zones at dendrites through a mechanism that does not depend on transcription. It is possible that memory reconsolidation in the DH is supported by both global and local protein synthesis, whereas mainly local protein synthesis is required in the BLA, thus resulting in a more salient requirement of mTOR in the BLA.

It is also worth pointing out that rapamycin after training or retrieval reduced, but did not completely block, IA retention, as evidenced by the higher latencies of rapamycin-treated rats in test trials compared to training. However, the effect sizes of rapamycin in our study is comparable to those found in previous studies examining the effects of rapamycin and other protein synthesis inhibitors on reconsolidation of fear memory (Milckic et al., 2007; Parsons et al., 2006; Taubenfeld et al., 2001).

In previous studies from our research group, the impairing effects of pharmacological inhibitors given after IA retrieval were transient and recovered spontaneously with time (Amaral et al., 2007; Luft, Amaral, Schwartzmann, & Roesler, 2008). These transient effects were consistent with those observed in many other studies on post-retrieval treatments and fear memory (for a review, see Amaral et al., 2008). Thus, we hypothesized that the impairing effects of post-retrieval manipulations could represent, among other possibilities, a "transient silencing" of the memory trace undergoing consolidation, rather than a blockade of

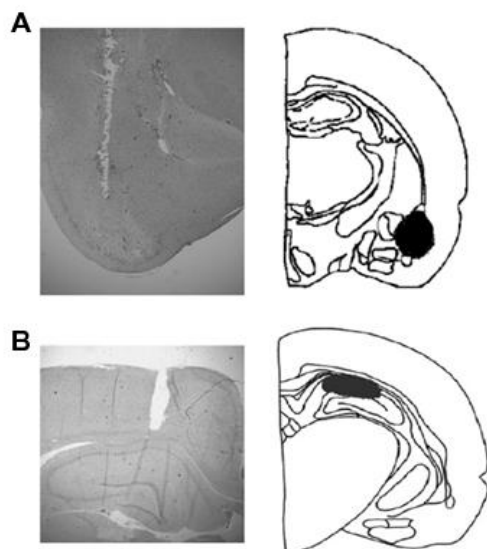


Fig. 6. Infusion placements into the BLA and DH. Representative brain sections at -2.8 (BLA) and -4.3 mm from bregma showing cannula locations aimed at the BLA and DH, and schematic diagrams of coronal sections of the rat brain, adapted from the atlas of Paxinos and Watson (2007), depicting the diffusion of methylene blue in the BLA and DH for rats included in the statistical analysis.

“reconsolidation” (Amaral et al., 2007, 2008). In the present study, in contrast, we observed for the first time a retention impairment induced by post-retrieval manipulation in the IA task that could not be reversed even when animals were given a reminder. Thus, here we interpret our findings adopting the term “reconsolidation”, as defined operationally by a phenomenon revealed by persistent impairment of memory retention produced by administration of a protein synthesis inhibitor after retrieval. However, the relationship between “consolidation” and “reconsolidation” remains a matter of debate and will require further understanding of their underlying mechanisms. We have proposed that it may be possible to reconcile apparent discrepant findings from different reconsolidation studies by developing a view of consolidation and reconsolidation as integrated components of the processes mediating long-term memory storage (Amaral et al., 2008; Roesler & McGaugh, 2010). As proposed originally by Dudai and Eisenberg (2004), and further developed by Alberini (2005, 2011), reconsolidation might be taken as an integral part of a “lingering consolidation” process, and a mechanism triggered by retrieval to strengthen the consolidation of recently formed memories.

Our results add to a growing body of evidence, from pharmacological experiments using rapamycin as well as recent genetic studies (Stoica et al., 2011), indicating that mTOR is a critical molecular regulator of synaptic plasticity and memory. The activity of mTOR is influenced by *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamate receptors and brain-derived neurotrophic factor (BDNF), among other neurotransmitter and neurotrophin pathways. mTOR integrates these signals with downstream signaling pathways such as the PI3K and phosphoinositide dependent kinase-1 (PDK1), to ultimately lead to alterations in mRNA translation and protein synthesis (reviewed in Hoeffler & Klann, 2010). The role of mTORC1 in regulating consolidation and reconsolidation of fear memory opens a window of opportunity for the development of mTORC1 inhibitors as potential therapeutic agents for the treatment of PTSD and other fear-related psychiatric disorders. Rapamycin is an mTOR inhibitor already in clinical use as an immunosuppressant, and has also been investigated in clinical trials of cancer (Lane &

Breuleux, 2009). Thus, as previously pointed out by Blundell et al. (2008), clinical studies of rapamycin combined with reactivation of traumatic memories in patients with PTSD are warranted. Rapamycin analogs such as temsirolimus, as well as second-generation mTOR inhibitors that directly target the mTOR catalytic site (Guertin & Sabatini, 2009), could also be investigated in preclinical studies of fear memory as well as in clinical studies in patients with PTSD.

In conclusion, here we present data consistent with the view that mTOR is importantly involved in fear memory, and provide the first evidence that mTOR in both the amygdala and hippocampus might play a role in reconsolidation of memory for IA.

Acknowledgments

This research was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) Grant 303703/2009-1 to R.R., National Institute for Translational Medicine (INCT-TM), HCPA institutional research fund (FIPE/HCPA), and the South American Office for Anticancer Drug Development. P.F.C.J. and T.R.P. are supported by CAPES fellowships. The funding sources had no role in the collection, analysis and interpretation of data, in the writing of the report, and in the decision to submit the paper for publication.

References

- Alberini, C. M. (2005). Mechanisms of memory stabilization: Are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends in Neurosciences*, 28, 51–56.
- Alberini, C. M. (2011). The role of reconsolidation and the dynamic process of long-term memory formation and storage. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 5, 12.
- Amaral, O. B., Luft, I., Cammarota, M., Izquierdo, I., & Koesler, R. (2007). Temporary inactivation of the dorsal hippocampus induces a transient impairment in retrieval of aversive memory. *Behavioural Brain Research*, 180, 113–118.
- Amaral, O. B., Osan, R., Roesler, R., & Tort, A. B. (2008). A synaptic reinforcement-based model for transient amnesia following disruptions of memory consolidation and reconsolidation. *Hippocampus*, 18, 584–601.
- Bekinschtein, P., Katzev, C., Slipczuk, L. N., Igaz, L. M., Cammarota, M., Izquierdo, I., et al. (2007). mTOR signaling in the hippocampus is necessary for memory formation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 87, 303–307.
- Blundell, J., Kouser, M., & Powell, C. M. (2008). Systemic inhibition of mammalian target of rapamycin inhibits fear memory reconsolidation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90, 28–35.
- Cammarota, M., Bevilaqua, L. R., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2004). Retrieval does not induce reconsolidation of inhibitory avoidance memory. *Learning and Memory*, 11, 572–578.
- Debiec, J., & LeDoux, J. E. (2006). Noradrenergic signaling in the amygdala contributes to the reconsolidation of fear memory: Treatment implications for PTSD. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1071, 521–524.
- Debiec, J., LeDoux, J. E., & Nader, K. (2002). Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. *Neuron*, 36, 527–538.
- Dudai, Y., & Eisenberg, M. (2004). Rites of passage of the engram: Reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron*, 44, 93–100.
- Duvarci, S., Nader, K., & LeDoux, J. E. (2008). De novo mRNA synthesis is required for both consolidation and reconsolidation of fear memories in the amygdala. *Learning & Memory*, 15, 747–755.
- Flood, J. F., Bennett, E. L., Orme, E., & Rosenzweig, M. R. (1975). Relation of memory formation to controlled amounts of brain protein synthesis. *Physiology and Behavior*, 15, 97–102.
- Gaffard, G. M., Parsons, R. G., & Helmstetter, F. J. (2011). Consolidation and reconsolidation of contextual fear memory requires mammalian target of rapamycin-dependent translation in the dorsal hippocampus. *Neuroscience*, 182, 98–104.
- Glover, E. M., Ressler, K. J., & Davis, M. (2010). Differing effects of systemically administered rapamycin on consolidation and reconsolidation of context vs. cued fear memories. *Learning and Memory*, 17, 577–581.
- Guertin, D. A., & Sabatini, D. M. (2009). The pharmacology of mTOR inhibition. *Science Signaling*, 2, pe24.
- Hoeffler, C. A., & Klann, E. (2010). mTOR signaling: At the crossroads of plasticity, memory and disease. *Trends in Neurosciences*, 33, 67–75.
- Jiang, C., & Schuman, E. M. (2002). Regulation and function of local protein synthesis in neuronal dendrites. *Trends in Biochemical Sciences*, 27, 506–513.
- Lane, H. A., & Breuleux, M. (2009). Optimal targeting of the mTORC1 kinase in human cancer. *Current Opinion in Cell Biology*, 21, 219–229.
- Luft, T., Amaral, O. B., Schwartzmann, C., & Roesler, R. (2008). Transient disruption of fear-related memory by post-retrieval inactivation of gastrin-releasing peptide or *N*-methyl-D-aspartate receptors in the hippocampus. *Current Neurovascular Research*, 5, 21–27.

- McGaugh, J. L. (2000). Memory: A century of consolidation. *Science*, 287, 248–251.
- Milekic, M. H., & Alberini, C. M. (2002). Temporally graded requirement for protein synthesis following memory reactivation. *Neuron*, 36, 521–525.
- Milekic, M. H., Pollonini, G., & Alberini, C. M. (2007). Temporal requirement of C/EBPbeta in the amygdala following reactivation but not acquisition of inhibitory avoidance. *Learning and Memory*, 14, 504–511.
- Miller, C. A., & Sweatt, J. D. (2006). Amnesia or retrieval deficit? Implications of a molecular approach to the question of reconsolidation. *Learning and Memory*, 13, 498–505.
- Nader, K., & Hardt, O. (2009). A single standard for memory: The case for reconsolidation. *Nature Reviews Neuroscience*, 10, 224–234.
- Nader, K., Schafe, G. E., & Le Douarin, J. E. (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, 406, 722–726.
- Parsons, R. G., Gafford, G. M., Baruch, D. E., Riedner, B. A., & Helmstetter, F. J. (2006). Long-term stability of fear memory depends on the synthesis of protein but not mRNA in the amygdala. *European Journal of Neuroscience*, 23, 1853–1859.
- Parsons, R. G., Gafford, G. M., & Helmstetter, F. J. (2006). Translational control via the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway is critical for the formation and stability of long term fear memory in amygdala neurons. *Journal of Neuroscience*, 26, 12977–12983.
- Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (6th ed.). San Diego: Academic Press.
- Power, A. E., Berlau, D. J., McGaugh, J. L., & Steward, O. (2006). Anisomycin infused into the hippocampus fails to block "reconsolidation" but impairs extinction: The role of re-exposure duration. *Learning and Memory*, 13, 27–34.
- Quevedo, J., Vianna, M. R., Roesler, R., de-Paris, F., Izquierdo, I., & Rose, S. P. (1999). Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: Protection from amnesia by pretraining but not pre-exposure to the task apparatus. *Learning and Memory*, 6, 600–607.
- Roesler, R., Luft, T., Oliveira, S. H., Farias, C. B., Almeida, V. R., Quevedo, J., et al. (2006). Molecular mechanisms mediating gastrin-releasing peptide receptor modulation of memory consolidation in the hippocampus. *Neuropharmacology*, 51, 350–357.
- Roesler, R., & McGaugh, J. L. (2010). Memory consolidation. In G. F. Koob, M. Le Moal, & R. F. Thompson (Eds.), *Encyclopedia of behavioral neuroscience* (Vol. 2). Oxford: Academic Press.
- Roesler, R., Schröder, N., Vianna, M. R., Quevedo, J., Bromberg, E., Kapczinski, F., et al. (2003). Differential involvement of hippocampal and amygdalar NMDA receptors in contextual and aversive aspects of inhibitory avoidance memory in rats. *Brain Research*, 975, 207–213.
- Sara, S. J. (2000). Retrieval and reconsolidation: Toward a neurobiology of remembering. *Learning and Memory*, 7, 73–84.
- Slipczuk, L., Bekinschtein, P., Katze, C., Cammarota, M., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2009). BDNF activates mTOR to regulate GluR1 expression required for memory formation. *PLoS One*, 4, e6007.
- Stäubli, U., Faraday, R., & Lynch, G. (1985). Pharmacological dissociation of memory: Anisomycin, a protein synthesis inhibitor, and leupeptin, a protease inhibitor, block different learning tasks. *Behavioral and Neural Biology*, 43, 287–297.
- Stoica, L., Zhu, P. J., Huang, W., Zhou, H., Kozma, S. C., & Costa-Mattioli, M. (2011). Selective pharmacogenetic inhibition of mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) blocks long-term synaptic plasticity and memory storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America*, 108, 3791–3796.
- Sui, L., Wang, J., & Li, B. M. (2008). Role of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of the rapamycin signaling pathway in long-term potentiation and trace fear conditioning memory in rat medial prefrontal cortex. *Learning and Memory*, 15, 762–776.
- Takei, N., Inamura, N., Kawamura, M., Namba, H., Hara, K., Yonezawa, K., et al. (2004). Brain-derived neurotrophic factor induces mammalian target of rapamycin-dependent local activation of translation machinery and protein synthesis in neuronal dendrites. *Journal of Neuroscience*, 24, 9760–9769.
- Taubenfeld, S. M., Milekic, M. H., Monti, B., & Alberini, C. M. (2001). The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPbeta. *Nature Neuroscience*, 4, 813–818.
- Tronel, S., & Alberini, C. M. (2007). Persistent disruption of a traumatic memory by postretrieval inactivation of glucocorticoid receptors in the amygdala. *Biological Psychiatry*, 62, 33–39.
- Vianna, M. R., Szapiro, G., McGaugh, J. L., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2001). Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the rat hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America*, 98, 12251–12254.

11. 2ºARTIGO DA TESE: Impairment of object recognition memory by rapamycin inhibition of mTOR in the amygdala or hippocampus around the time of learning or reactivation. Aceito para publicação na Behavioural Brain Research.

De: Behavioural Brain Research
Remetente: ees.bbr.0.1591e9.d4c8f765@eesmail.elsevier.com
Para: rroesler@terra.com.br
Cc: BBR@uni-duesseldorf.de
Assunto: Your Submission BBR-D-11-01024R1
Enviada: 2 Dez, 2011 3:54 AM

Ms. Ref. No.: BBR-D-11-01024R1
Title: Impairment of object recognition memory by rapamycin inhibition of mTOR in the amygdala or hippocampus around the time of learning or reactivation
Authors: Paulo F Jobim; Thiago R Pedroso; Aline Werenicz; Raissa R Christoff; Natasha Maurmann; Gustavo K Reolon; Nadja Schröder; R. Roesler
Behavioural Brain Research

Dear Dr. Roesler,

I am pleased to confirm that your paper "Impairment of object recognition memory by rapamycin inhibition of mTOR in the amygdala or hippocampus around the time of learning or reactivation" has been accepted for publication in Behavioural Brain Research.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards,

Joe Huston
Editor-in-Chief
Behavioural Brain Research

BBR-D-11-01024-R1

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Research report

Impairment of object recognition memory by rapamycin inhibition of mTOR in the amygdala or hippocampus around the time of learning or reactivation

Paulo F.C. Jobim ^{a, b, c}, Thiago R. Pedroso ^{a, b, c}, Aline Werenicz ^{a, b, c},
Raissa R. Christoff ^{a, b, c}, Natasha Maurmann ^{a, b, c}, Gustavo K.
Reolon ^{a, b, c}, Nadja Schröder ^{c, d}, Rafael Roesler ^{a, b, c, *}

^a Laboratory of Neuropharmacology and Neural Tumor Biology, Department of Pharmacology, Institute for Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Cancer Research Laboratory, University Hospital Research Center (CPE-HCPA), Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003 Porto Alegre, Brazil

^c National Institute for Translational Medicine (INCT-TM), Porto Alegre, Brazil

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

^d Neurobiology and Developmental Biology Laboratory, Faculty of Biosciences,
Pontifical Catholic University, Porto Alegre, RS, Brazil

* Corresponding author: Department of Pharmacology, Institute for Basic Health
Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul; Rua Sarmento Leite, 500
(ICBS, Campus Centro/UFRGS), 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55
51 33083183; fax: +5551 33083121.

E-mail address: rafael.roesler@pq.cnpq.br (R. Roesler)

Number of pages (including figures and tables): 35

Number of figures: 5

Number of tables: 2

ABSTRACT

The role of the basolateral complex of the amygdala (BLA) in recognition memory remains poorly understood. The mammalian target of rapamycin (mTOR) in the BLA and other brain areas has been implicated in synaptic plasticity and memory. We have recently shown that mTOR signaling in both the BLA and the dorsal hippocampus (DH) is required for formation and reconsolidation of inhibitory avoidance, a fear-motivated memory task. Here we examined the effects of infusions of the mTOR inhibitor rapamycin into the BLA before or after either training or reactivation on retention of novel object recognition memory (NOR) in rats, and compared the effects with those obtained using intra-DH infusions. Male Wistar rats received bilateral infusions of vehicle or rapamycin into the BLA or DH before or after NOR training or reactivation. Rapamycin impaired NOR retention tested 24 h after training when given either before or immediately after training into the BLA or DH. Rapamycin also impaired retention measured 24 h after reactivation when infused before reactivation into the BLA or DH, or immediately after reactivation into the BLA, but not when given 6 h after reactivation into either the BLA or DH. The results suggest that mTOR signaling in the BLA and DH is involved in NOR memory formation and stabilization.

Keywords:

Rapamycin

1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	
11	
12	
13	
14	
15	
16	
17	
18	
19	
20	
21	
22	
23	
24	
25	
26	
27	
28	
29	
30	
31	
32	
33	
34	
35	
36	
37	
38	
39	
40	
41	
42	
43	
44	
45	
46	
47	
48	
49	
50	
51	
52	
53	
54	
55	
56	
57	
58	
59	
60	
61	
62	
63	
64	
65	

mTOR

Amygdala

Hippocampus

Recognition memory

1. Introduction

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

It is now well established that the basolateral complex of the amygdala (BLA) plays a crucial role in enhancing the formation of memories for emotionally arousing events (for a review, see [1]). Novel object recognition (NOR), a memory task based on the natural preference towards novel objects displayed by rodents, involve no explicit rewarding or aversive stimuli [2]. However, recent evidence indicates that formation of memory for NOR training under specific experimental conditions is modulated by stress hormones and noradrenergic activation of the BLA [3-6]. The involvement of molecular processes including protein synthesis and intracellular signaling pathways within the BLA in NOR memory remains poorly understood.

The mammalian target of rapamycin (mTOR) is a serine/threonine kinase that regulates cell growth and cell cycle progression by integrating signals from growth factors to influence the activity of downstream targets. mTOR is selectively inhibited by rapamycin (sirolimus), a naturally occurring macrolide derived from the soil bacterium *Streptomyces hygroscopicus* mTOR (for reviews, see [7-9]). In the central nervous system, mTOR signaling, which acts as a central regulator of mRNA translation and protein synthesis, has been increasingly implicated in synaptic plasticity and memory formation [9]. Rapamycin injected systemically, or microinfused into selective brain areas including the BLA and the dorsal hippocampus (DH), has been shown to impair memory for fear conditioning when given around the time of acquisition (thus affecting memory formation) or reactivation (interfering with memory reconsolidation or long-term stabilization) [10-16]. We have recently shown that

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

intra-BLA or intra-DH infusions of rapamycin inhibit formation and reconsolidation of long-term memory for inhibitory avoidance, a type of fear-motivated conditioning [14]. A previous study examining the role of mTOR in NOR memory found that rapamycin impaired retention when given into the DH within a limited time window after training, and could either impair reconsolidation or have no effect when given after reactivation, depending on specific training conditions [17]. However, previous studies have not verified whether mTOR in the BLA is involved in NOR memory. In the present study, we examined the effects of mTOR inhibition by rapamycin in the BLA before or after training or reactivation, on memory for NOR, and compared the effects of intra-BLA rapamycin with those obtained with intra-DH infusions.

2. Material and methods

2.1. Animals

Adult male Wistar rats (340-430g at time of surgery) were obtained from the institutional breeding facility (CREAL, ICBS, UFRGS). Animals were housed five per cage in plastic cages with sawdust bedding, and maintained on a 12 h light/dark cycle at a room temperature of 22 ± 1 °C. The rats were allowed ad libitum access to standardized pellet food and water. All experiments took place between 9 AM and 6 PM. All experimental procedures were performed in accordance with the National Institutes of Health (NIH) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the institutional animal care committee under protocol number 09-641.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

2.2. Surgery

Animals were implanted under anesthesia with ketamine (75 mg/kg) and xylazine (25 mg/kg) with bilateral 14-mm or 9.0-mm, 23-gauge guide cannulae aimed 1.0 mm above the BLA or CA1 area of the DH respectively, as described in previous studies [14, 18]. Coordinates (BLA, anteroposterior, -2.8 mm from bregma, mediolateral, ± 4.8 mm from bregma, ventral, -7.5 mm from skull surface; DH anteroposterior, -4.3 mm from bregma; mediolateral, ± 3.0 mm from bregma; ventral, -2.0 mm from skull surface) were obtained from the atlas of Paxinos & Watson [19]. Animals were allowed to recover at least 7 days after surgery.

2.3. Drug infusions

The general procedures for intra-BLA and intra-DH vehicle and rapamycin infusions were as described in a previous report [14]. At the time of infusion, a 30-gauge infusion needle was fitted into the guide cannula. The tip of the infusion needle protruded 1.0 mm beyond the guide cannula and was aimed at either the BLA or the CA1 area of the DH. Drug or vehicle (1% dimethylsulfoxide, DMSO, in saline) were infused during a 30-s period. The infusion needle was left in place for an additional minute to allow diffusion of the drug away from the needle tip.

Fifteen min before, immediately after, or 6 h after NOR training or reactivation, rats received a bilateral 0.5- μ l infusion of vehicle or rapamycin (600

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

nM dissolved in vehicle; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) into either the BLA or DH. The dose of rapamycin was chosen on the basis of a previous study [14]. Drug solutions were freshly prepared before each experiment.

2.4. Novel object recognition

NOR training and testing took place in a 40 cm x 50 cm open field surrounded by 50 cm high walls made of plywood with a frontal glass wall. The floor was covered with sawdust. Objects used in training and testing trials presented distinctive colors and shapes and consisted of pairs of identical cans, small glass bottles, or blocks made with plastic Duplo Lego toys. The different objects and their positions were counterbalanced across experiments and behavioral trials, and all objects had a height of about 10 cm. The objects were washed with a 70% ethanol solution between trials. Exploration was defined as sniffing or touching the object with the nose and/or forepaws, sitting on the object was not considered exploration. General training and test procedures followed the general methods described in previous reports [3, 20-22]. Briefly, rats were left to explore the empty arena for 2 minutes in the first day (habituation). Twenty-four hours after habituation, training was conducted by placing individual rats into the field, in which two identical objects (objects A1 and A2) were positioned in two adjacent corners, 10 cm from the walls. Animals were left to explore the objects during 5 min and the time exploring each object was recorded. On memory retention test trials given either 3 or 24 h after training, rats explored the open field for 5 minutes in the presence of one

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

familiar (A) and one novel (B) object. In experiments using pre- or post-reactivation infusions, the 24-h test trial was used as a memory reactivation session, and a second test trial was given 24 h after reactivation.

2.5. Histology

Twenty-four to 72 h after behavioral testing, a 0.5- μ l (BLA) or 1.0- μ l (DH) infusion of a 4% methylene blue solution was given into the BLA or DH. Rats were killed by decapitation 15 minutes later, and their brains were removed and stored in 10% formalin for at least 72 h. The brains were sectioned and examined for cannulae placement in the hippocampus and BLA. The extension of the methylene blue dye was taken as indicative of diffusion of the drugs previously given to each rat, as previously described [14, 18]. Rats with incorrect cannula placements were excluded from the analysis.

2.6. Statistics

A recognition index calculated for each animal was expressed by the ratio $TB/(TA + TB)*100$ [TA = time spent exploring the familiar object A; TB = time spent exploring the novel object B]. Data are expressed as mean \pm S.E.M. exploratory preferences. Comparisons between groups were performed

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

using Mann-Whitney U-tests, two-tailed [3, 20-22]. In all comparisons, $p < 0.05$ was considered to indicate statistical significance.

3. Results

3.1. Pre- or posttraining intra-BLA infusion of rapamycin impairs NOR memory retention

We first examined the effects of intra-BLA infusions of rapamycin on NOR memory. In the first experiment, rats were given NOR training and tested for retention 3 and 24 h later. Fifteen min before (pretraining infusions) training, vehicle or rapamycin was infused into the BLA. Rapamycin significantly impaired retention tested at 24 h ($p < 0.05$), but not at 3 h after training, compared to vehicle-injected controls (Fig. 1A). In the second experiment, rapamycin was infused immediately after training and rats were tested for retention 24 h later. Rapamycin-treated rats showed impaired retention ($p < 0.01$; Fig. 1B). The results indicate that rapamycin infusion in the BLA either before or early after training impairs long-, but not short-term memory for NOR, suggesting that mTOR in the BLA is required for consolidation of NOR memory.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Fig. 1 should be inserted here

3.2. Intra-BLA infusion of rapamycin after reactivation impairs NOR memory retention

We next examined whether mTOR inhibition in the BLA would affect NOR memory when given around the time of reactivation. These experiments were carried out in the light of previous evidence indicating that mTOR in the BLA is involved in regulating reconsolidation-like processes [14, 15]. Rats were given NOR training followed by a reactivation session 24 h later. Fifteen min before (pre-reactivation infusions), immediately after (post-reactivation infusions), or 6 h (delayed infusion controls) after reactivation, vehicle or rapamycin was infused into the BLA. An additional retention test trial was carried out 48 h after training. There were no significant differences between groups treated with vehicle and rapamycin in training or 24-h test latencies. Intra-BLA rapamycin infused either before (Fig. 2A) or immediately after (Fig. 2B) reactivation produced an impairment in NOR memory in the 48-h test compared to controls (both p s < 0.01). In contrast, rapamycin failed to affect 48-h retention when infused 6 h after reactivation (Fig. 2C). Moreover, the impairing effect of rapamycin was dependent on memory retrieval; a “no reactivation” control experiment showed that intra-BLA rapamycin given 24 h

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

after training in the absence of reactivation had no effect on 48-h retention (Fig. 2D). Together, these results indicate that rapamycin infused into the BLA either before or shortly after reactivation impairs retention of NOR memory tested in a subsequent retention trial.

Fig. 2 should be inserted here

3.3. Pre- or posttraining intra-DH infusion of rapamycin impairs NOR memory retention

We went on to compare the effects induced by intra-BLA infusions of rapamycin with those of infusions given into the DH. Rats were trained in NOR and tested for retention 3 and 24 h later. Fifteen min before training, vehicle or rapamycin was infused into the DH. There were no significant differences between groups in performance in the training or 3-h retention test trials. However, rapamycin-treated rats showed significantly reduced NOR retention in the 24-h retention test ($p < 0.05$; Fig. 3A). Rapamycin also produced a significant impairment of 24-retention when infused immediately after training ($p < 0.05$; Fig. 3B). The findings suggest that mTOR inhibition in the DH impairs consolidation of NOR memory.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Fig. 3 should be inserted here

3.4. Intra-DH infusion of rapamycin before reactivation impairs retention of NOR memory

In the final set of experiments, we examined the effects of intra-hippocampal rapamycin given before or after reactivation on NOR memory. Rats were trained in NOR and given intra-DH infusions of vehicle or rapamycin 15 min before, immediately after, or 6 h after the reactivation session carried out 24 h after training. A retention test was given 24 h after reactivation. There were no significant differences between rats treated with vehicle and rapamycin in training or 24 h test latencies. Intra-DH rapamycin significantly impaired 48-h retention when infused before reactivation ($p < 0.05$; Fig. 4A). In contrast, 48-h performance in rats given rapamycin after reactivation did not differ from that of control rats (Fig. 4B). As with intra-BLA infusions, a “delayed injection” control experiment showed that intra-DH rapamycin did not affect NOR retention when infused 6 h after reactivation (Fig. 4C). Finally, the impairing effect of pre-activation rapamycin required memory retrieval, as shown by a “no reactivation” control experiment (Fig. 4D). The results indicate that rapamycin infused into the DH before reactivation impairs NOR memory tested in a subsequent retention trial.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Fig. 4 should be inserted here

3.5. Total exploration time

Total time exploring both objects during NOR training, reactivation, and retention test trials is shown in Table 1 (rats given intra-BLA infusions) and Table 2 (rats given intra-DH infusions). There were no significant differences between rats given rapamycin and controls in total exploration during training or reactivation sessions, indicating that the effects of rapamycin could not be attributed to altered locomotion, exploratory activity, or motivation during those sessions. However, rats given rapamycin into either the BLA or DH after training, and rats given intra-BLA rapamycin after reactivation showed decreased exploration in the retention test trial (all p s < 0.05).

Table 1 should be inserted here

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Table 2 should be inserted here

3.6. Histology

Fig. 5 shows a schematic drawing of the extent of the dye spread within the BLA and DH of rats in which infusion placements were considered correct. Seventeen rats cannulated in the BLA and 6 rats cannulated in the DH were excluded because of incorrect infusion placements.

Fig. 5 should be inserted here

4. Discussion

Previous studies have indicated that NOR, generally considered a memory task that does not involve explicit emotional arousal, is regulated by stress hormones and BLA activation, particularly under conditions in which rats are not extensively habituated to the context before training. For example,

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

consolidation of long-term memory for NOR is enhanced by systemic administration of adrenaline or glucocorticoids, as well as by intra-BLA infusion of noradrenaline after training, whereas posttraining intra-BLA infusion of the beta-adrenoceptor antagonist propranolol impairs NOR retention [3-6]. However, the role of molecular mechanisms proposed to mediate synaptic plasticity in NOR memory has not been previously examined in the BLA.

Evidence has indicated that inhibition of mTOR by rapamycin within the BLA impairs both consolidation and reconsolidation of memory for aversive conditioning [14, 15]. However, the possible role of amygdalar mTOR in memory for tasks that do not involve explicit fear-eliciting stimuli had not been previously investigated. Our results provide the first evidence indicating that mTOR activation in the BLA is required for formation and long-term stabilization of memories for low-arousing training experiences. The cellular mechanisms underlying the effects of amygdalar mTOR inhibition on memory remain to be clarified. mTOR in neurons is better known as a key regulator of local protein synthesis induced by synaptic activity [9]. However, the BLA has been proposed as a brain area involved in modulating synaptic plasticity and memory consolidation in other brain areas, rather than a site for protein-synthesis-dependent memory storage [1]. Thus, it is possible that mechanisms other than an inhibition of protein synthesis and plasticity within the BLA are involved in the memory-impairing effects of intra-BLA rapamycin.

mTOR acts as a central component of two multi-protein complexes, mTORC1 and mTORC2, leading to alterations in the activity of protein kinase pathways such as phosphoinositide 3-kinase (PI3K), as well as in the phosphorylation state of the eukaryotic initiation factor 4E binding protein (4E-

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

BP1) and p70s6 kinase (p70s6K). Rapamycin inhibits mTORC1 by associating with the intracellular protein FKBP12, and together they bind the FKBP12-rapamycin-binding (FRB) domain of mTOR, preventing mTOR-protein complex formation [7-9]. Importantly, the PI3K/mTOR pathway has been shown to cross-talk with other protein kinase pathways. For example, both cross-activation and cross-inhibition between the PI3K/mTOR and Ras/extracellular-regulated kinase (ERK)/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways have been reported [23]. Since the PI3K and ERK/MAPK pathways act downstream of neurotransmitter and hormone receptors and play a role in BLA activity related to its modulatory role in memory consolidation [1, 24, 25], it is possible that mTOR inhibition alters the activity of neurochemical systems involved in regulating BLA activity and memory formation through mechanisms that do not require long-term synaptic plasticity dependent on protein synthesis. Alternatively, mTOR inhibition might affect more general aspects of neuronal metabolism. mTOR has emerged as a regulator of glucose uptake and glycolysis, lipid synthesis, and mitochondrial metabolism [26]. It is possible that alterations in cellular metabolism produced by mTOR inhibition in BLA neurons affect the memory-modulatory function of the BLA.

Several studies using lesions, pharmacological inhibitors, or genetic manipulations have suggested a role for the DH in NOR memory formation, although the nature of its involvement remains controversial [22, 27-29]. One previous study has examined the effects of intra-DH infusions of rapamycin on consolidation and reconsolidation of NOR [17]. Here we replicated some of those experiments using modified experimental conditions, in order to allow for a comparison between the effects of intra-BLA and intra-DH infusions of

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

rapamycin on NOR memory. Consistently with the findings by Myskiw et al. [17], we found that NOR memory was impaired by rapamycin infused into the DH immediately after training. We also found an impairing effect of intra-DH rapamycin given before either training or reactivation. The finding that post-reactivation intra-DH infusion of rapamycin had no effect on retention could be confounded by the relatively low mean exploratory preference towards the novel object (60.02%) displayed by control rats during the retention test in that specific experiment. However, there was not even a trend for a difference between controls and rapamycin-treated rats in retention levels ($p = 0.94$). In addition, a lack of effect of intra-DH post-reactivation rapamycin would be consistent with the previous results observed by Miskyw et al. [17] in experiments in which rats were presented with familiar objects during NOR reactivation.

The findings that rapamycin impaired retention when given before or after reactivation into the BLA and before reactivation into the DH are consistent with a role for mTOR signaling in reconsolidation of NOR memory. We have recently reported evidence indicating that rapamycin inhibition of mTOR in the BLA or DH hinders reconsolidation of inhibitory avoidance [14]. Moreover, a previous study has suggested that mTOR in the DH is required for NOR reconsolidation under specific training and reactivation conditions [17]. However, in the present study we have not verified whether the memory impairment produced by rapamycin given around the time of reactivation is long-lasting or undergoes spontaneous recovery, which could confound the interpretation of the results as reconsolidation deficits (for a review, see [30]). On the basis that reconsolidation can taken as a phase of a “lingering consolidation” process and

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

a mechanism that allows the strengthening of consolidation of recently formed memories [30-32], it is possible that rapamycin given at reactivation inhibits the long-term stabilization or a late phase of consolidation of NOR memory. Further studies are required to examine the nature of mTOR involvement in reconsolidation of NOR memory.

Several results control for the specificity of the rapamycin-induced impairments in NOR memory found in our experiments. First, pretraining infusions of rapamycin did not affect short-term retention measured 3 h after training; second, rapamycin did not affect retention when given at a later time interval (6 h) after reactivation; and finally, there were no significant differences between groups in total exploration during training and reactivation sessions (although there was considerable variability in exploration times among experiments as well as among behavioral sessions within the same experiment). The reduced exploration time observed in rapamycin-treated rats during the retention test trials in some experiments might be related to the memory impairment itself. One possibility is that rats with impaired memory spend relatively more time exploring the training arena than the objects. It is also possible that rats with impaired memory have increased anxiety when exposed to the training context and objects during test, leading to reduced locomotion and exploration. It is unlikely that rapamycin infusions induced a late alteration in locomotion or motivation, because infusions given 6 h after reactivation had no effect on retention test performances.

5. Conclusions

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

In conclusion, the present findings provide evidence that mTOR signaling in both the BLA and DH is required for consolidation of NOR memory. In addition, mTOR may play a role in reconsolidation-like processes or long-term stabilization of recognition memory. The findings support the view that signaling mechanisms involved in regulating protein synthesis, synaptic plasticity, and cell metabolism in the BLA modulate memory for low-arousing tasks.

Acknowledgements

This research was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) grant 303703/2009-1 to R.R.), National Institute for Translational Medicine (INCT-TM), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), HCPA institutional research fund (FIPE/HCPA), and the South American Office for Anticancer Drug Development.

References

- [1] McGaugh JL. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu Rev Neurosci* 2004;27:1-28.
- [2] Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* 1988;31:47-59.
- [3] Dornelles A, de Lima MN, Graziotin M, Presti-Torres J, Garcia VA, Scalco FS, Roesler R, Schröder N. Adrenergic enhancement of consolidation of object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem* 2007;88:137-42.
- [4] Okuda S, Roozendaal B, McGaugh JL. Glucocorticoid effects on object recognition memory require training-associated emotional arousal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:853-8.
- [5] Roozendaal B, Castello NA, Vedana G, Barsegyan A, McGaugh JL. Noradrenergic activation of the basolateral amygdala modulates consolidation of object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem* 2008;90:576-9.
- [6] Roozendaal B, Okuda S, Van der Zee EA, McGaugh JL. Glucocorticoid enhancement of memory requires arousal-induced noradrenergic activation in the basolateral amygdala. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:6741-6.
- [7] Fingar DC, Blenis J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* 2004;23:3151-71.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

[8] Guertin DA, Sabatini DM. The pharmacology of mTOR inhibition. *Sci Signal* 2009;2:pe24.

[9] Hoeffler CA, Klann E. mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease. *Trends Neurosci* 2010;33:67-75.

[10] Bekinschtein P, Katze C, Slipczuk LN, Igaz LM, Cammarota M, Izquierdo I, Medina JH. mTOR signaling in the hippocampus is necessary for memory formation. *Neurobiol Learn Mem* 2007;87:303-7.

[11] Blundell J, Kouser M, Powell CM. Systemic inhibition of mammalian target of rapamycin inhibits fear memory reconsolidation. *Neurobiol Learn Mem* 2008;90:28-35.

[12] Gafford GM, Parsons RG, Helmstetter FJ. Consolidation and reconsolidation of contextual fear memory requires mammalian target of rapamycin-dependent translation in the dorsal hippocampus. *Neuroscience* 2011;182:98-104.

[13] Glover EM, Ressler KJ, Davis M. Differing effects of systemically administered rapamycin on consolidation and reconsolidation of context vs. cued fear memories. *Learn Mem* 2010;17:577-81.

[14] Jobim PF, Pedrosa TR, Christoff RR, Werenicz A, Maurmann N, Reolon GK, Roesler R. Inhibition of mTOR by rapamycin in the amygdala or hippocampus impairs formation and reconsolidation of inhibitory avoidance memory. *Neurobiol Learn Mem* 2011;DOI: 10.1016/j.nlm.2011.10.002.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

[15] Parsons RG, Gafford GM, Helmstetter FJ. Translational control via the mammalian target of rapamycin pathway is critical for the formation and stability of long-term fear memory in amygdala neurons. *J Neurosci* 2006;26:12977-83.

[16] Slipczuk L, Bekinschtein P, Katche C, Cammarota M, Izquierdo I, Medina JH. BDNF activates mTOR to regulate GluR1 expression required for memory formation. *PLoS One*. 2009;4:e6007.

[17] Myskiw JC, Rossato JI, Bevilaqua LR, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. On the participation of mTOR in recognition memory. *Neurobiol Learn Mem* 2008;89:338-51.

[18] Roesler R, Schröder N, Vianna MR, Quevedo J, Bromberg E, Kapczinski F, Ferreira MB. Differential involvement of hippocampal and amygdalar NMDA receptors in contextual and aversive aspects of inhibitory avoidance memory in rats. *Brain Res* 2003;975:207-13.

[19] Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (6th ed.) 2007;San Diego:Academic Press.

[20] de Lima MN, Presti-Torres J, Garcia VA, Guimarães MR, Scalco FS, Roesler R, Schröder N. Amelioration of recognition memory impairment associated with iron loading or aging by the type 4-specific phosphodiesterase inhibitor rolipram in rats. *Neuropharmacology* 2008;55:788-92.

[21] Reolon GK, Maurmann N, Werenicz A, Garcia VA, Schröder N, Wood MA, Roesler R. Posttraining systemic administration of the histone deacetylase

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

inhibitor sodium butyrate ameliorates aging-related memory decline in rats. *Behav Brain Res* 2011;221:329-32.

[22] de Lima MN, Luft T, Roesler R, Schröder N. Temporary inactivation reveals an essential role of the dorsal hippocampus in consolidation of object recognition memory. *Neurosci Lett* 2006;405:142-6.

[23] Mendoza MC, Er EE, Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci* 2011;36:320-8.

[24] Lin CH, Yeh SH, Lin CH, Lu KT, Leu TH, Chang WC, Gean PW. A role for the PI-3 kinase signaling pathway in fear conditioning and synaptic plasticity in the amygdala. *Neuron* 2001;31:841-51.

[25] Walz R, Roesler R, Quevedo J, Sant'Anna MK, Madruga M, Rodrigues C, Gottfried C, Medina JH, Izquierdo I. Time-dependent impairment of inhibitory avoidance retention in rats by posttraining infusion of a mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor into cortical and limbic structures. *Neurobiol Learn Mem* 2000;73:11-20.

[26] Yecies JL, Manning BD. mTOR links oncogenic signaling to tumor cell metabolism. *J Mol Med* 2011;89:221-8.

[27] Broadbent NJ, Gaskin S, Squire LR, Clark RE. Object recognition memory and the rodent hippocampus. *Learn Mem* 2009;17:5-11.

[28] Gaskin S, Tremblay A, Mumby DG. Retrograde and anterograde object recognition in rats with hippocampal lesions. *Hippocampus* 2003;13:962-9.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

[29] Rampon C, Tang YP, Goodhouse J, Shimizu E, Kiyin M, Tsien JZ. Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nat Neurosci* 2000;3:238-44.

[30] Amaral OB, Osan R, Roesler R, Tort AB. A synaptic reinforcement-based model for transient amnesia following disruptions of memory consolidation and reconsolidation. *Hippocampus* 2008;18:584-601.

[31] Alberini CM. The role of reconsolidation and the dynamic process of long-term memory formation and storage. *Front Behav Neurosci* 2011;5:12.

[32] Dudai Y, Eisenberg M. Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron* 2004;44:93-100.

Table 1. Total time exploring both objects during NOR training, reactivation, and retention test trials in rats given infusions of vehicle or rapamycin into the BLA.

Group	Mean \pm S.E.M. total time (s) exploring both objects			
Pretraining infusions				
	n	Training	3 h test	24 h test
Vehicle	10	15.84 \pm 1.12	24.44 \pm 2.80	18.34 \pm 2.99
Rapamycin	11	17.38 \pm 1.50	29.83 \pm 1.04	13.15 \pm 1.50
Posttraining infusions				
	n	Training		24 h test
Vehicle	8	23.98 \pm 1.50		32.88 \pm 5.64
Rapamycin	8	27.83 \pm 0.59		28.37 \pm 2.98 *
Pre-reactivation infusions				
	n	Training	Reactivation	48 h test
Vehicle	8	25.58 \pm 1.24	38.06 \pm 3.14	32.43 \pm 2.37
Rapamycin	7	24.05 \pm 2.85	50.77 \pm 3.83	30.61 \pm 4.11
Post-reactivation infusions				
	n	Training	Reactivation	48 h test
Vehicle	8	22.67 \pm 1.64	41.49 \pm 4.33	30.23 \pm 1.97
Rapamycin	9	22.61 \pm 1.70	49.87 \pm 3.61	21.52 \pm 2.25 *
Delayed infusion control				
	n	Training	Reactivation	48 h test
Vehicle	9	23.41 \pm 1.54	24.70 \pm 2.59	23.70 \pm 2.73
Rapamycin	7	21.45 \pm 3.09	22.02 \pm 2.03	19.18 \pm 1.12
No reactivation control				
	n	Training		48 h test
Vehicle	11	16.06 \pm 1.94		21.87 \pm 1.71
Rapamycin	11	14.84 \pm 1.23		22.81 \pm 1.63

* p < 0.05 compared to controls within the same behavioral session.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Table 2. Total time exploring both objects during NOR training, reactivation, and retention test trials in rats given infusions of vehicle or rapamycin into the DH.

Group	Mean + S.E.M. total time (s) exploring both objects			
Pretraining infusions				
	n	Training	3 h test	24 h test
Vehicle	9	45.94 ± 5.29	10.69 ± 2.40	27.82 ± 3.49
Rapamycin	8	54.19 ± 8.53	11.37 ± 1.59	23.18 ± 1.91
Posttraining infusions				
	n	Training		24 h test
Vehicle	12	15.36 ± 2.15		25.34 ± 4.77
Rapamycin	9	15.21 ± 1.16		12.63 ± 1.65 *
Pre-reactivation infusions				
	n	Training	Reactivation	48 h test
Vehicle	13	25.43 ± 2.41	34.43 ± 4.43	30.71 ± 4.05
Rapamycin	11	28.78 ± 2.06	36.70 ± 3.98	24.60 ± 2.86
Post-reactivation infusions				
	n	Training	Reactivation	48 h test
Vehicle	9	26.60 ± 2.09	44.85 ± 3.64	27.09 ± 3.79
Rapamycin	11	26.37 ± 2.66	50.01 ± 3.93	30.09 ± 3.74
Delayed infusion control				
	n	Training	Reactivation	48 h test
Vehicle	8	15.24 ± 0.64	19.57 ± 1.37	18.15 ± 1.39
Rapamycin	7	14.03 ± 1.04	19.55 ± 2.10	13.74 ± 1.90
No reactivation control				
	n	Training		48 h test
Vehicle	12	20.28 ± 0.94		30.30 ± 3.17
Rapamycin	11	18.93 ± 1.16		33.91 ± 2.38

* p < 0.05 compared to controls within the same behavioral session.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Six h after reactivation, vehicle (n = 9) or rapamycin (n = 7) was infused into the BLA. There was no significant difference between groups. (D) No reactivation control. Rats were trained and tested for retention 48 h later. Twenty-four h after training, vehicle (N = 11) or rapamycin (N = 11) was infused into the BLA in the absence of reactivation. There was no significant difference between groups. Data are expressed as exploratory preferences, defined as mean \pm S.E.M. percent time exploring object A2 during training or the novel objects B or C during retention test trials.

Fig. 3. Inhibition of mTOR by rapamycin in the DH impairs formation of long-term recognition memory. (A) Rats were given NOR training and tested for retention 3 and 24 h later. Vehicle (n = 9) or rapamycin (n = 8) was infused into the DH 15 min before training. Rats given rapamycin showed significantly impaired retention compared to controls 24 h (* p < 0.05), but not 3 h after training. (B) Rats were infused with vehicle (n = 12) or rapamycin (n = 9) immediately after training. When tested for retention 24 h after training, rats given rapamycin had significantly impaired retention compared to controls (* p < 0.05). Data are expressed as exploratory preferences, defined as mean \pm S.E.M. percent time exploring object A2 during training or the novel objects B or C during retention test trials.

Fig. 4. Inhibition of mTOR by rapamycin in the DH before reactivation impairs recognition memory. (A) Rats were given NOR training followed by a memory reactivation session 24 h later. Fifteen min before reactivation, vehicle (n = 13) or rapamycin (n = 11) was infused into the DH. When tested for retention 24 h

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

after reactivation (48 h after training), rats given rapamycin had significantly lower latencies compared to vehicle-treated controls (* $p < 0.05$). (B) Rats were trained and given a reactivation session 24 h later. Vehicle ($n = 9$) or rapamycin ($n = 11$) was infused into the DH immediately after reactivation. When tested for retention 24 h later (48 h after training), both groups showed similar levels of exploratory preference. (C) Delayed infusion control. Rats were trained and given a reactivation session 24 h later. Six h after reactivation, vehicle ($n = 8$) or rapamycin ($n = 7$) was infused into the DH. There was no significant difference between groups. (D) No reactivation control. Rats were trained and tested for retention 48 h later. Twenty-four h after training, vehicle ($N = 12$) or rapamycin ($N = 11$) was infused into the DH in the absence of reactivation. There was no significant difference between groups. Data are expressed as exploratory preferences, defined as mean \pm S.E.M. percent time exploring object A2 during training or the novel objects B or C during retention test trials.

Fig 5. Infusion placements into the BLA and DH. Schematic diagrams of coronal sections of the rat brain, adapted from the atlas of Paxinos and Watson [19], depicting the diffusion of methylene blue in the (A) BLA and (B) DH for rats included in the statistical analysis.

Figure 1

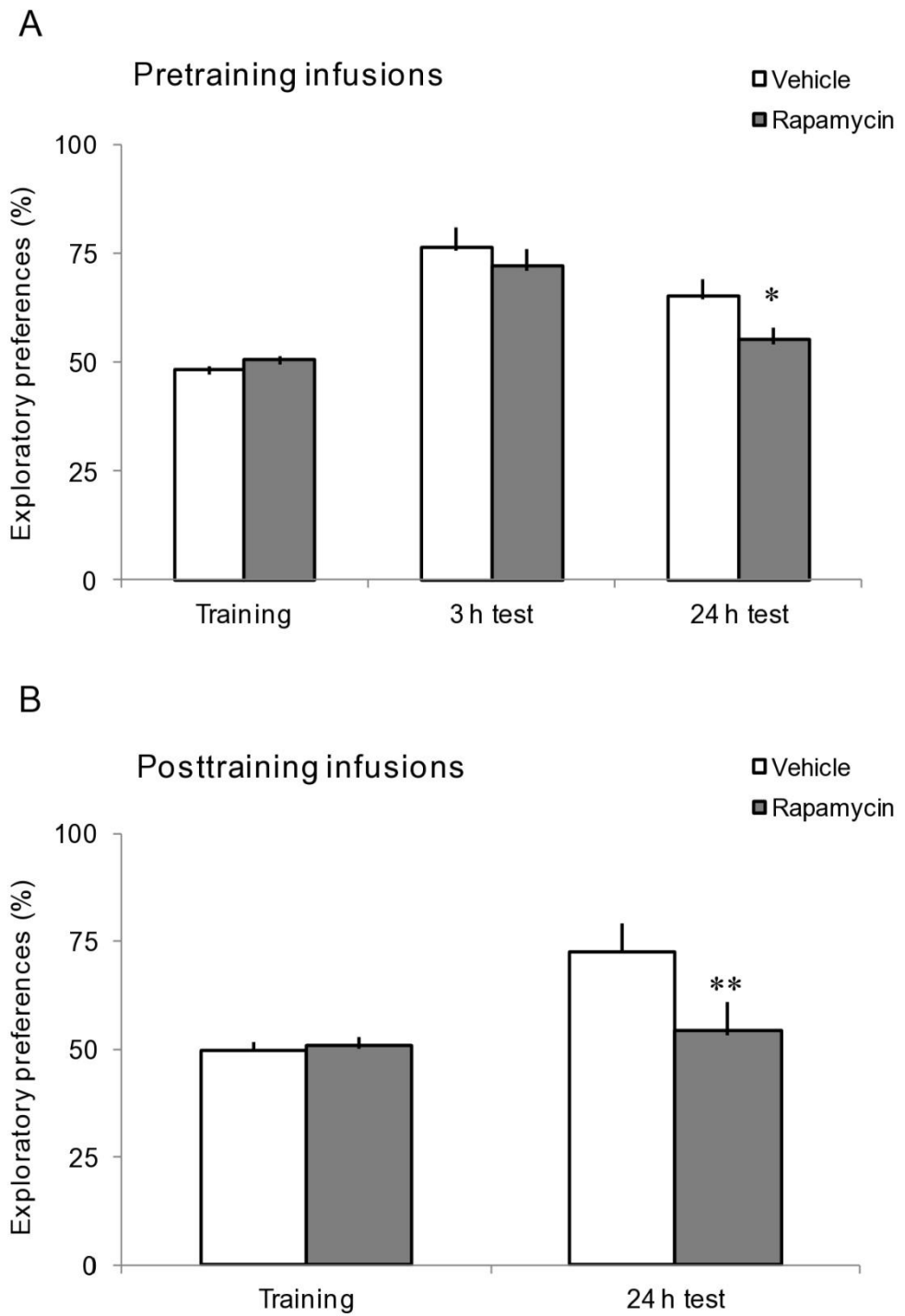


Figure 2

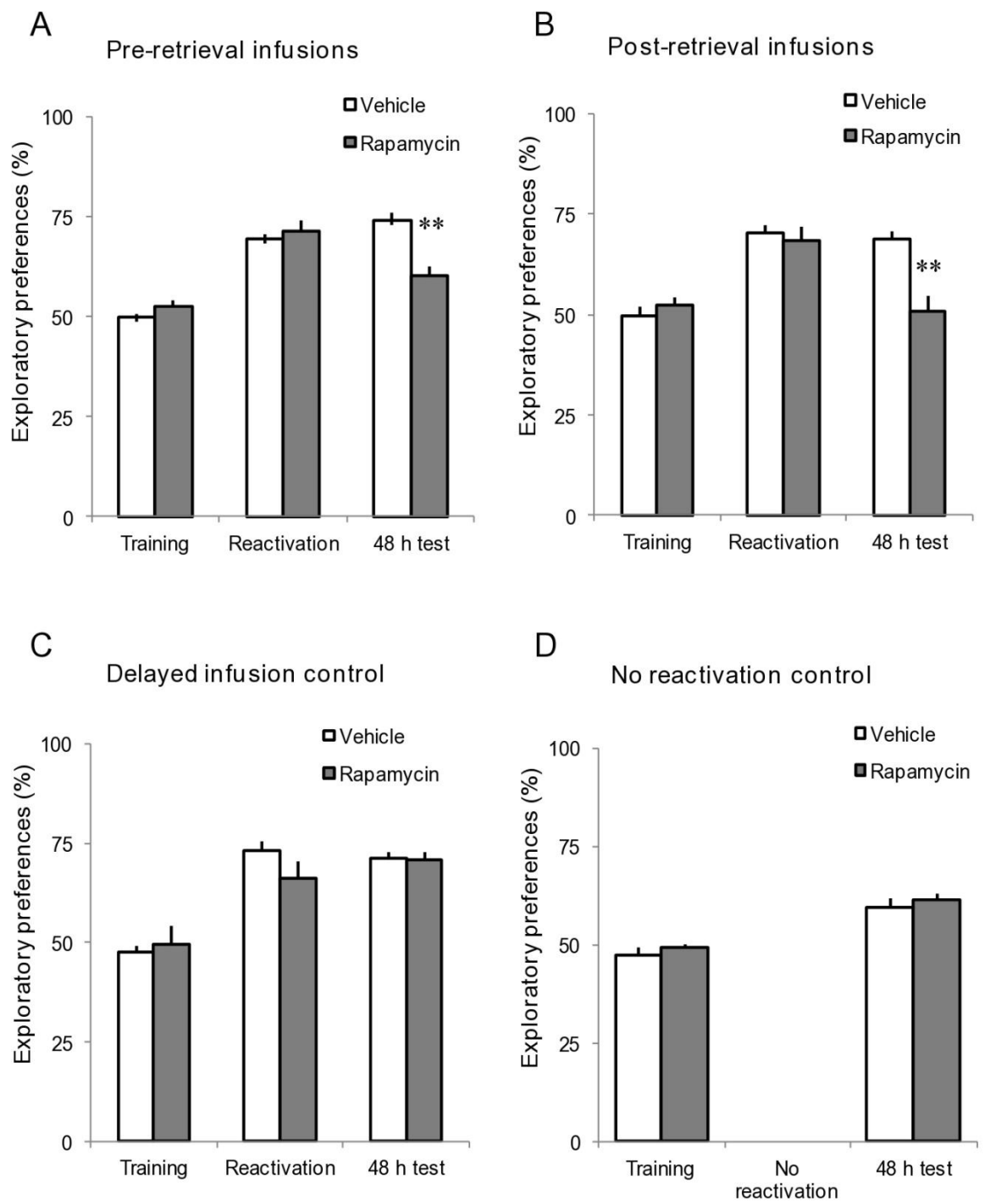


Figure 3

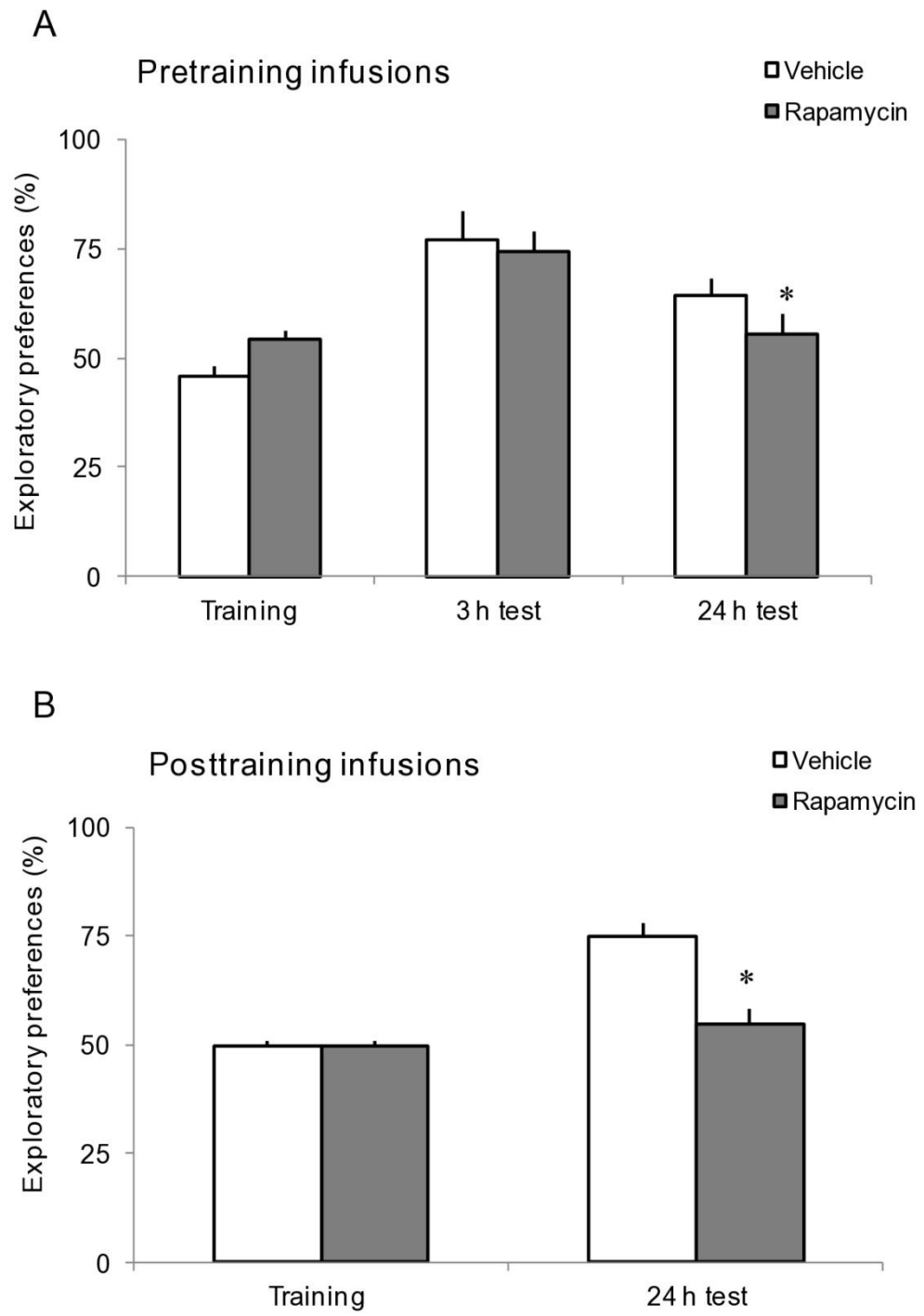


Figure 4

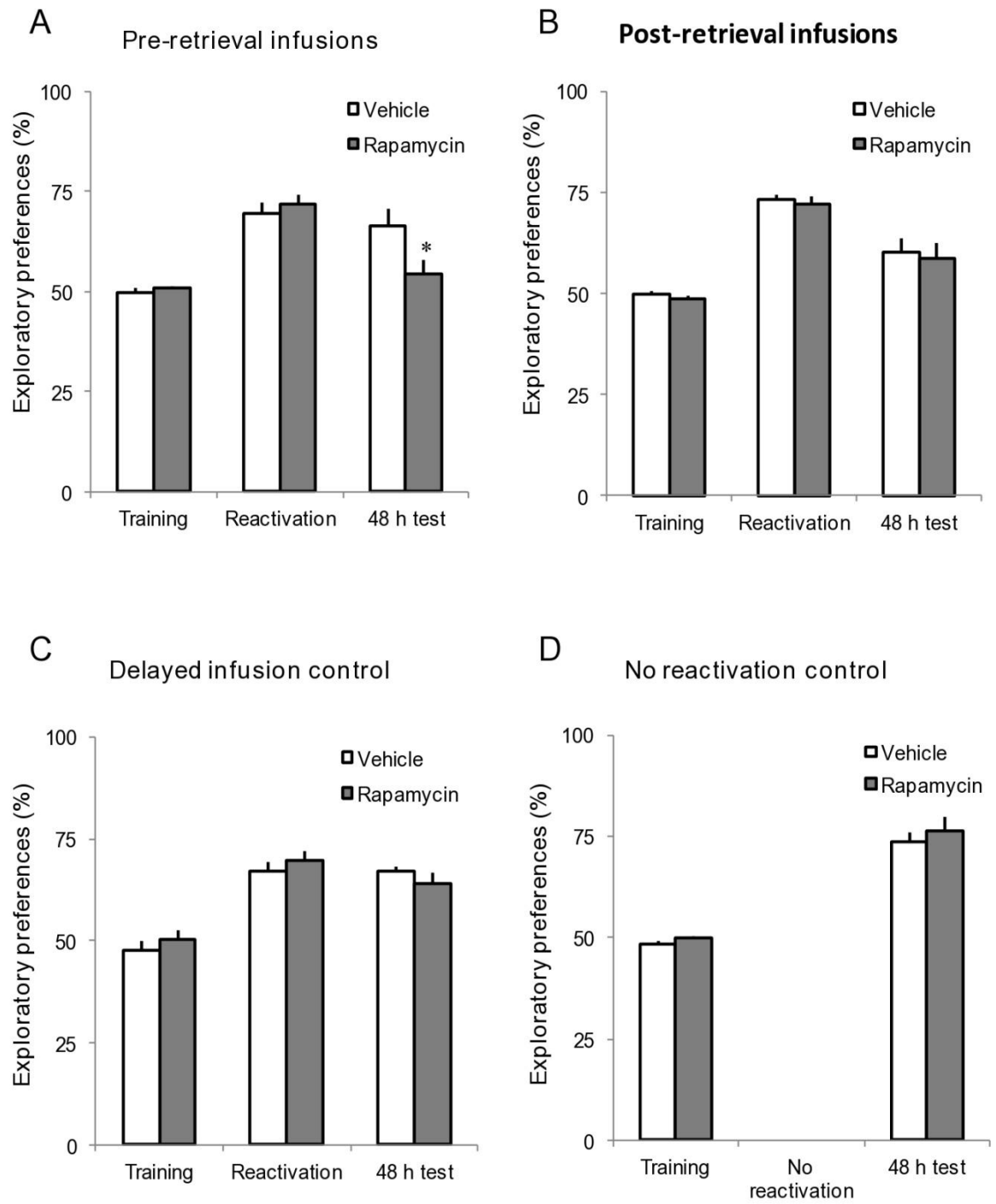
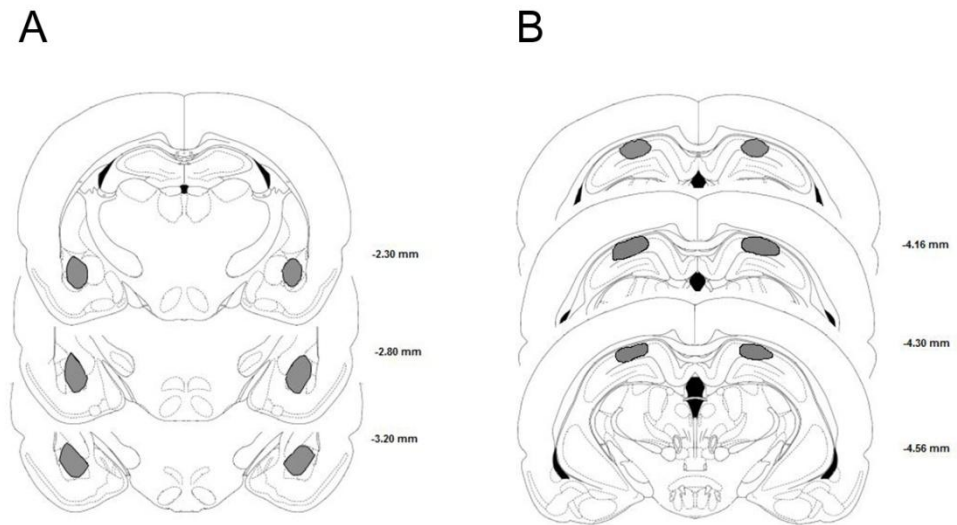


Figure 5



Parte III

12. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nós demonstramos que a via de sinalização de mTOR na amígdala basolateral e no hipocampo dorsal é necessária para consolidação da memória de esQUIVA inibitória e de reconhecimento de objetos. Nós também mostramos que ao apresentar a caixa de esQUIVA inibitória junto com a descida à grade ou, no caso da tarefa de reconhecimento de objetos, um novo objeto, ao animal o traço da memória anteriormente consolidado, se torna novamente suscetível e pode ser prejudicado pela inibição de mTOR por rapamicina. O presente trabalho sugere que a tradução de proteínas, dependente de mTOR, está associada ao processo de formação e manutenção da memória. A respeito disso, outros estudos demonstraram que a via de mTOR no hipocampo e amígdala, além de outras regiões cerebrais, como o córtex auditório, é importante para outros tipos de memórias como memória auditiva, espacial e aversiva (Tischmeyer et al. 2003; Dash et al. 2006; Parsons et al. 2006a).

Nossos resultados com infusão intra-amigdalar indicam que (1) o bloqueio de mTOR amigdalar por rapamicina 15 minutos antes ou imediatamente depois do treino prejudica a consolidação da memória de longa duração de esQUIVA inibitória sem prejudicar a memória de curta duração. O mesmo acontece com a retenção da memória de reconhecimento de objetos. Estes resultados indicam a necessidade de mTOR na amígdala na fase inicial da consolidação destes dois tipos de memória. O desempenho dos animais não foi comprometido por qualquer efeito inespecífico da rapamicina uma vez que animais infundidos com veículo apresentaram semelhante performance. (2) O bloqueio de mTOR amigdalar por rapamicina 15 minutos antes e imediatamente após a reativação da memória de esQUIVA inibitória e da memória de reconhecimento de objetos prejudica a reconsolidação. O mesmo não acontece 6 horas depois da reativação, indicando que a participação de mTOR para a reconsolidação da memória acontece em uma janela temporal que inicia logo após a reativação da memória e termina em algum momento antes de 6 horas

depois da reativação em ambas as tarefas. Ainda é possível observar que (3) o efeito amnésico causado por rapamicina só acontece na presença de uma sessão de reativação do traço mnemônico. Uma vez que a rapamicina por si só não acarreta nenhum prejuízo na memória do animal, fica excluída a possibilidade de um efeito tardio na consolidação. (4) Uma vez que o déficit de memória causado por rapamicina não foi revertido pelo choque *reminder*, podemos considerar que o prejuízo da retenção da memória causado pela infusão de rapamicina não pode ser atribuído a facilitação da extinção, mas sim um déficit na reconsolidação da memória e pode ser devido a um bloqueio da tradução na amígdala basolateral.

Nossos resultados com infusão intra hipocampal indicam que (1) o bloqueio de mTOR por rapamicina 15 minutos antes e imediatamente depois do treino, prejudica a consolidação da memória de longa duração de esquiva inibitória sem prejudicar a memória de curta duração. Na tarefa reconhecimento de objetos, a infusão de rapamicina imediatamente, mas não quinze minutos antes do treino bloqueia a consolidação da memória. Estes resultados indicam a necessidade de mTOR no hipocampo na fase inicial da consolidação e que este envolvimento pode possuir diferenças temporais de acordo com o tipos de memórias (aversiva e de reconhecimento). O desempenho dos animais não foi comprometido por qualquer efeito inespecífico da rapamicina uma vez que animais infundidos com veiculo apresentaram a mesma performance. (2) O bloqueio de mTOR hipocampal por rapamicina 15 minutos antes, mas não imediatamente após a reativação da memória de esquiva inibitória prejudica a reconsolidação. O contrário acontece com na tarefa de reconhecimento de objetos, ou seja, a infusão de rapamicina quinze minutos antes, mas não imediatamente depois da reativação, bloqueia a reconsolidação da memória. Em ambas as tarefas, quando a infusão de rapamicina acontece 6 horas depois da reativação, a retenção da memória não é prejudicada. Estes resultados indicam que a participação de mTOR hipocampal para a reconsolidação da memória pode ser tempo e tarefa-dependente e que esta acontece em uma janela temporal que inicia logo após a reativação do traço mnemônico e termina em algum momento antes de 6 horas depois da reativação. Ainda é possível observar que (3) o efeito amnésico causado por rapamicina só acontece na presença de uma sessão de reativação do traço mnemônico. Como a rapamicina

por si só não acarreta nenhum prejuízo na memória do animal, fica excluída a possibilidade de um efeito tardio na consolidação. (4) O prejuízo da retenção da memória causado pela infusão de rapamicina não pode ser atribuído à facilitação da extinção, mas sim a um déficit na reconsolidação da memória e pode ser devido a um bloqueio da tradução no hipocampo dorsal.

Evidências experimentais sugerem que memórias consolidadas não são imutáveis, pois, após serem evocadas, tornam-se novamente lábeis e, para persistirem, necessitam da ocorrência de outro processo também dependente de síntese protéica, chamado de reconsolidação (Alberini, 2005). Estudos sugerem que o principal papel da reconsolidação é re-estabilizar o traço que fora alterado em consequência de sua reativação (Nader et al., 2000a; Milekic e Alberini, 2002; Tronson e Taylor, 2007). De fato, estudos mostram que a memória de esQUIVA inibitória e de reconhecimento de objetos, quando reativada, torna-se susceptível a inibidores de síntese protéica (Milekic et al. 2007; Myskiw et al. 2008). Rossato e colaboradores (2007) mostraram que a inibição de síntese protéica no hipocampo, prejudica a persistência da memória de reconhecimento de objetos quando a infusão do inibidor ocorre após a reativação do traço original da memória (Rossato et al. 2007). O hipocampo parece estar envolvido no processamento de informações relacionadas à detecção da novidades no ambiente (Moncada e Viola, 2006).

De maneira geral podemos sugerir, baseados em nossos resultados de esQUIVA inibitória que a janela temporal pós-aquisição em que a inibição de mTOR por rapamicina prejudica a síntese protéica no hipocampo pode ser curta em relação a amígdala, perdurando até somente alguns minutos depois da aquisição. Este déficit causado pela rapamicina pode ser devido a um bloqueio da tradução de novas proteínas na amígdala basolateral e no hipocampo dorsal. Ainda pertinente ao efeito da rapamicina sobre a reconsolidação da memória, parece haver uma dissociação entre o tempo de ativação de mTOR hipocampal, mas não amigdalár. Este fato também pode ser creditado ao distinto papel destas estruturas na memória de esQUIVA inibitória. A amígdala estaria mais associada ao componente aversivo da tarefa, enquanto o hipocampo, ao componente contextual (Roesler et al. 2003b). Esta dissociação sugere que a amígdala seja de fato, um sítio de modulação de memórias com componentes emocionais, e que a via de sinalização de mTOR seja requerida em ambas as

estruturas para a consolidação e reconsolidação da memória. Neste caso, a consolidação e a reconsolidação necessitam de síntese protéica tanto na amígdala quanto no hipocampo dependente de mTOR. Contudo, a rapamicina é considerada um inibidor de síntese protéica local. Como a amígdala basolateral parece ser mais sensível à inibição de mTOR do que o hipocampo dorsal, é tentador especular que a amígdala depende de síntese protéica local tanto para consolidação, quanto para reconsolidação da memória de longa duração. Fortalecendo essa suposição, um sugere que a reconsolidação na amígdala pode ser mantida por síntese protéica local (Parsons et al. 2006b).

Nossos resultados sugerem que a via de sinalização de mTOR na amígdala participa na formação e reconsolidação da memória aversiva de esquiva inibitória e na memória de reconhecimento de objetos. Essa participação é, de certa forma, esperada, uma vez que a amígdala é parte integrante do circuito neural associado a formação da memória (McIntyre et al. 2011) Contudo, neste estudo foi mostrado pela primeira vez que mTOR amigdalár é necessária para a consolidação da memória de esquiva inibitória e reconhecimento de objetos.

13. REFERÊNCIAS

Alberini CM. (2005) Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *TRENDS in Neurosciences*, 28(1): 51-56.

Alberini CM, Milekic MH, Tronel S. (2006) Mechanisms of memory stabilization and de-stabilization. *Cellular and molecular life sciences*, 63(9): 999-1008.

Alberini CM. (2009) Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiological Reviews*, 89(1): 121-45.

Amaral OB, Roesler R. (2008) Targeting the NMDA receptor for fear-related disorders. *Recent Patents on CNS Drug Discovery*, 3: 166-178.

Antion MD, Merhav M, Hoeffler CA, Reis G, Kozma SC, Thomas G, Schuman EM, Rosenblum K, Klann E. (2008) Removal of S6K1 and S6K2 leads to divergent alterations in learning, memory, and synaptic plasticity. *Learning & Memory*, 15: 29–38

Banko JL, Poulin F, Hou L, DeMaria CT, Sonenberg N, Klann E. (2005) The translation repressor 4E-BP2 is critical for eIF4F complex formation, synaptic plasticity, and memory in the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 25: 9581–9590.

Bekinschtein P, Katche C, Slipczuk LN, Igaz LM, Cammarota M, Izquierdo I, Medina JH. (2007) mTOR signaling in the hippocampus is necessary for memory formation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 87(2): 303-307.

Bidinosti M, Ran I, Sanchez-Carbente MR, Martineau Y, Gingras AC, Gkogkas C, Raught B, Bramham CR, Sossin WS, Costa-Mattioli M, DesGroseillers L, Lacaille JC, Sonenberg N. (2010) Postnatal Deamidation of 4E-BP2 in Brain

Enhances Its Association with Raptor and Alters Kinetics of Excitatory Synaptic Transmission. *Molecular Cell*, 37: 797–808.

Bishop NA, Lu T, Yankner BA. (2010) Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature*, 464: 529-535.

Blundell J, Kouser M, Powell CM. (2008) Systemic Inhibition of Mammalian Target of Rapamycin Inhibits Fear Memory Reconsolidation *Neurobiology Learning and Memory*, 90(1): 28–35.

Bouton ME. (2002) Context, Ambiguity, and Unlearning: Sources of Relapse after Behavioral Extinction. *Biological Psychiatry*, 52: 976–986.

Caccamo A, Maldonado MA, Majumder S, Medina DX, Holbein W, Magrí A, Oddo S. (2011) Naturally secreted amyloid-beta increases mammalian target of rapamycin (mTOR) activity via a PRAS40-mediated mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(11): 8924-8932.

Carroll M, Warren O, Fan X, Sossin WS. (2004) 5-HT stimulates eEF2 dephosphorylation in a rapamycin-sensitive manner in *Aplysia* neurites. *Journal of Neurochemistry*, 90: 1464–1476.

Carroll M, Dyer J, Sossin WS. (2006) Serotonin Increases Phosphorylation of Synaptic 4EBP through TOR, but Eukaryotic Initiation Factor 4E Levels Do Not Limit Somatic Cap-Dependent Translation in *Aplysia* Neurons. *Molecular and cellular biology*, 26(22): 8586–8598.

Casadio A, Martin KC, Giustetto M, Zhu H, Chen M, Bartsch D, Bailey CH, Kandel ER. (1999) A transient, neuron-wide form of CREB-mediated long-term facilitation can be stabilized at specific synapses by local protein synthesis. *Cell*, 99: 221–237.

Cortazar F, Molnar MZ, Isakova T, Czira ME, Kovesdy CP, Roth D, Mucsi I, Wolf M. (2011) Clinical Outcomes in Kidney Transplant Recipients Receiving Long-

Term Therapy With Inhibitors of the Mammalian Target of Rapamycin. *American Journal of Transplantation*. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2011.03826.

Craig PM, Moon TW. (2011) Fasted zebrafish mimic genetic and physiological responses in mammals: a model for obesity and diabetes? *Zebrafish*, 8(3): 109-117.

Dash PK, Orsi SA, Moore AN. (2006) Spatial memory formation and memory-enhancing effect of glucose involves activation of the tuberous sclerosis complex—mammalian target of rapamycin pathway. *The Journal of Neuroscience*, 26: 8048–8056.

Dudai Y. (2004) The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annual Review Of Psychology*, 55: 51-86.

Ehninger D, Han S, Shilyansky C, Zhou Y, Li W, Kwiatkowski DJ, Ramesh V, Silva AJ. (2008) Reversal of learning deficits in a Tsc2^{+/-} mouse model of tuberous sclerosis. *Nature Medicine*, 14: 843–848.

Eisenberg M, Dudai Y. (2004) Reconsolidation of fresh, remote, and extinguished fear memory in Medaka: old fears don't die. *European Journal of Neurosciences*, 20(12): 3397–3403.

Elstner M, Morris CM, Heim K, Bender A, Mehta D, Jaros E, Klopstock T, Meitinger T, Turnbull DM, Prokisch H. (2011) Expression analysis of dopaminergic neurons in Parkinson's disease and aging links transcriptional dysregulation of energy metabolism to cell death. *Acta Neuropathologica*, 122(1): 75-86.

Fingar DC, Blenis J. (2004) Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene*, 23: 3151–3171.

Frias MA, Thoreen CC, Jaffe JD, Schroder W, Sculley T, Carr SA, Sabatini DM. (2006) mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Current Biology*, 16: 1865–1870.

Gafford GM, Parsons RG, Helmstetter FJ. (2011) Consolidation and reconsolidation of contextual fear memory requires mammalian target of rapamycin dependent translation in the dorsal hippocampus. *Neuroscience*, 182: 98–104.

Garcia-Martinez JM, Alessi DR. (2008) mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochemical Journal*, 416: 375–385.

Gingras AC, Raught B, Gygi SP, Niedzwiecka A, Miron M, Burley SK, Polakiewicz RD, Wyslouch-Cieszynska A, Aebersold R, Sonenberg N. (2001) Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes & Development*, 15: 2852–2864.

Guertin DA, Sabatini, DM. (2005) An expanding role for mTOR in cancer. *Trends Molecular Medicine*, 11: 353–361.

Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K, Nadon NL, Wilkinson JE, Frenkel K, Carter CS, Pahor M, Javors AM, Fernandez E, Miller AR. (2009) Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature*, 460: 392-396.

Hay N, Sonenberg N. (2004) Upstream and downstream of mTOR *Genes & Development*, 18(16): 1926-1945.

Hoeffler CA, Tang W, Wong H, Santillan A, Patterson RJ, Martinez LA, Tejada-Simon MV, Paylor R, Hamilton SL, Klann E. (2008) Removal of FKBP12 enhances mTOR-Raptor interactions, LTP, memory, and perseverative/repetitive behavior. *Neuron*, 60: 832–845.

Hoeffler CA, Klann Eric. (2010) mTOR signaling: At the crossroads of plasticity, memory and disease. *Trends in Neurosciences*, 33(2): 67-75.

Izquierdo I, Barros DM, Souza TM, Souza MM, Izquierdo LA, Medina JH. (1998) Mechanisms for memory types differ. *Nature*, 393 (6686): 635-636.

Jacinto E. (2008) What controls TOR? *IUBMB Life*. 60, 483–496.

Jobim PFC, Pedrosa TR, Christoff RR, Werenicz A, Maurmann N, Reolon GK, Roesler R. (2011) Inhibition of mTOR by rapamycin in the amygdala or hippocampus impairs formation and reconsolidation of inhibitory avoidance memory. *Neurobiology of learning and memory*. DOI: 10.1016/j.nlm.2011.10.002.

Khan A, Pepio AM, Sossin WS. (2001) Serotonin activates S6 kinase in a rapamycinsensitive manner in *Aplysia* synaptosomes. *Journal of Neuroscience*. 21, 382–391.

Koike H, Iijima M, Chaki S. (2011) Involvement of the mammalian target of rapamycin signaling in the antidepressant-like effect of group II metabotropic glutamate receptor antagonists. *Neuropharmacology*, 61(8): 1419-23.

Lacaille JC, Sonenberg N. (2010) Postnatal deamidation of 4E-BP2 in brain enhances its association with raptor and alters kinetics of excitatory synaptic transmission. *Molecular Cell*, 37: 797–808.

Lang UE, Heger J, Willbring M, Domula M, Matschke K, Tugtekin SM. (2009) Immunosuppression Using the Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Inhibitor Everolimus: pilot study shows significant cognitive and affective improvement. *Transplantation Proceedings*, 41: 4285–4288.

Law K. (2005) Rapamycin: An anti-cancer immunosuppressant? *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 56(1): 47-60.

Luft T, Flores DG, Vianna MRM, Schwartsmann G, Roesler R, Izquierdo I. (2006) A role for hippocampal gastrin-releasing peptide receptors in extinction of aversive memory. *NeuroReport*, 17:935-939.

Luft T, Amaral OB, Schwartsmann G, Roesler R. (2008) Transient disruption of fear-related memory by post-retrieval inactivation of gastrin-releasing peptide or N-methyl-D-aspartate receptors in the hippocampus. *Current Neurovascular Research*, 5: 21-27.

Ma XM, Blenis J. (2009) Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10: 307–318.

Machado MS, Villela IV, Moura DJ, Rosa RM, Lopes NP, Braga AL, Roesler R, Saffi J, Henriques JAP. (2009) 3'3-ditrifluoromethyldiphenyl diselenide: a new organoselenium compound with interesting antigenotoxic and antimutagenic activities. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 673: 133-140.

Marin TM, Keith K, Davies B, Conner DA, Guha P, Kalaitzidis D, Wu X, Lauriol J, Wang B, Bauer M, Bronson R, Franchini KG, Neel BG, Kontaridis MI. (2011) Rapamycin reverses hypertrophic cardiomyopathy in a mouse model of LEOPARD syndrome-associated PTPN11 mutation. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(3):1026-1043.

Martins MR, Reinke A, Valvassori SS, Machado RA, Quevedo J, Schwartsmann G, Roesler R. (2005) Non-associative learning and anxiety in rats treated with a single systemic administration of the gastrin-releasing peptide receptor antagonist RC-3095. *Peptides*, 26: 2525-2529.

Maurmann N, Reolon GK, Rech S, Fett Neto AG, Roesler R. (2010) A valepotriate fraction of *Valeriana glechomifolia* shows sedative and anxiolytic properties and impairs recognition but not aversive memory in mice. *Evidence-based Compl. and Alt. Medicine*. DOI: 10.1093/ecam/nep232.

Mayer C, Zhao J, Yuan X, Grummt I. (2004) mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. *Genes & Development*, 18: 423–434.

McAlister VC, Mahalati K, Peltekian KM, Fraser A, MacDonald AS. (2002) A clinical pharmacokinetic study of tacrolimus and sirolimus combination immunosuppression comparing simultaneous to separated administration. *Therapeutic Drug Monitoring*, 24(3): 346–350.

McIntyre CK, McGaugh JL, Williams CL. (2011) Interacting brain systems modulate memory consolidation. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2011.11.001.

Meller CA, Henriques JA, Schwartsmann G, Roesler R. (2004) The bombesin/gastrin releasing peptide receptor antagonist RC-3095 blocks apomorphine but not MK-801-induced stereotypy in mice. *Peptides*, 25: 585-588.

McGaugh JL. (2000) Memory—a century of consolidation. *Science*, 287: 248–251.

Milekic MH, Alberini CM. (2002) Temporally graded requirement for protein synthesis following memory reactivation. *Neuron*, 36: 521–525.

Milekic MH, Pollonini G, Alberini CM. (2007) Temporal requirement of C/EBPbeta in the amygdala following reactivation but not acquisition of inhibitory avoidance. *Learning & Memory*, 14(7): 504-511.

Moncada D, Viola H. (2006) Phosphorylation state of CREB in the rat hippocampus: A molecular switch between spatial novelty and spatial familiarity? *Neurobiology of Learning and Memory*, 86: 9–18.

Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, Hutson TE, Porta C, Bracarda S, Grünwald V, Thompson JA, Figlin RA, Hollaender N, Urbanowitz G, Berg WJ, Kay A, Lebwohl D, Ravaud A. (2008) Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a

double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet*, 372(9637): 449-456.

Moses SN, Sutherland RJ, McDonald RJ. (2002) Differential involvement of amygdala and hippocampus in responding to novel objects and contexts. *Brain Research Bulletin*, 58(5): 517–527.

Myskiw JC, Rossato JI, Bevilaqua LR, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. (2008) On the participation of mTOR in recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 89(3): 338-351.

Nader K, Schafe GE, LeDoux JE. (2000a) Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, 406(6797): 722–726.

Nader K, Schafe GE, Le Doux JE. (2000b) The labile nature of consolidation theory. *Nature Reviews Neuroscience*, 1: 216–219.

Panja D, Dagate G, Bidinosti M, Wibrand K, Kristiansen M, Sonenberg N, Bramham CR. (2009) Novel translational control in Arc-dependent long term potentiation consolidation in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 284: 31498–31511.

Pardo Andreu GL, Maurmann N, Reolon GK, de Farias CB, Schwartzmann G, Delgado R, Roesler R. (2010) Mangiferin, a naturally occurring glucoxilxanthone improves long-term object recognition memory in rats. *European Journal of Pharmacology*, 635(1-3): 124-128.

Parsons RG, Gafford GM, Helmstetter FJ. (2006a) Translational control via the mammalian target of rapamycin pathway is critical for the formation and stability of long-term fear memory in amygdala neurons. *The Journal of Neuroscience*, 26: 12977–12983.

Parsons RG, Gafford GM, Baruch DE, Riedner BA, Helmstetter FJ. (2006b) Long-term stability of fear memory depends on the synthesis of protein but not mRNA in the amygdala. *The European Journal of Neuroscience*, 23(7):1853-1859.

Paxino G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 1997.

Picada JN, Schroder N, Izquierdo I, Henriques JAP, Roesler R. (2002) Differential neurobehavioral deficits induced by apomorphine and its oxidation product, 8-oxo-apomorphine-semiquinone, in rats. *European Journal of Pharmacology*, 443: 105-111.

Raught B, Gingras AC, Gygi SP, Imataka H, Morino S, Gradi A, Aebersold R, Sonenberg N. (2000) Serum-stimulated, rapamycin-sensitive phosphorylation sites in the eukaryotic translation initiation factor 4G1. *The EMBO Journal*, 19: 434–444.

Raught B, Gingras AC, Sonenberg N. (2001) The target of rapamycin (TOR) proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98: 7037–7044.

Reolon GK, Maurmann N, Pedroso T, Marcondes NA, Lima DB, Roesler R. Effects of Sodium Butyrate, a Histone Deacetylases Inhibitor, on Novel Object Recognition Memory in Rats. In: *Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular*, Porto Alegre, 2008.

Reolon GK, Maurmann N, Werenicz A, Garcia VA, Schröder N, Wood MA, Roesler R. (2011) Posttraining systemic administration of the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate ameliorates aging-related memory decline in rats. *Behavioral Brain Research*, 221(1): 329-332.

Reolon GK, Reinke A, Oliveira MR, Braga LM, Camassola M, Andrades M, Moreira JCF, Nardi NB, Roesler R, Dal Pizzol F. (2009) Alterations in oxidative

markers in the cerebellum and peripheral organs in MPS I mice. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 29: 443-448.

Roesler R, Vianna MR, de-Paris F, Quevedo J. (1999) Memory-enhancing treatments do not reverse the impairment of inhibitory avoidance retention induced by NMDA receptor blockade. *Neurobiology of Learning and Memory*, 72: 252-258.

Roesler R, Meller CA, Kopschina MI, Souza DO, Henriques JAP, Schwartzmann G. (2003a) Intrahippocampal infusion of the bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 impairs inhibitory avoidance retention. *Peptides*, 24: 1069-1074.

Roesler R, Schroder N, Vianna MR, Quevedo J, Bromberg E, Kapczinski F, Ferreira MB. (2003b) Differential involvement of hippocampal and amygdalar NMDA receptors in contextual and aversive aspects of inhibitory avoidance memory in rats. *Brain Research*, 975: 207-213.

Roesler R, Luft T, Oliveira SHS, Farias CB, Almeida VR, Quevedo J, Dal Pizzol F, Schroder N, Izquierdo I, Schwartzmann G. (2006a) Molecular mechanisms mediating gastrin-releasing peptide receptor modulation of memory consolidation in the hippocampus. *Neuropharmacology*, 51: 350-357.

Roesler R, Schwartzmann G, Lee GD, Longo DL, Ingram DK. (2006b) Cancer chemotherapy and cognitive function in rodent models: Memory impairment induced by cyclophosphamide in mice. *Clinical Cancer Research*, 12: 5000-5001.

Roesler R, Quevedo J. (2009) Retrieval mediated by hippocampal extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase is required for memory strengthening. *Neuroscience*, 160: 711-715.

Roesler R, McGaugh JL. (2010) Memory Consolidation. In: Koob G.F., Le Moal M. and Thompson R.F. (eds.) *Encyclopedia of Behavioral Neuroscience*, volume 2, pp. 206–214 Oxford: Academic Press.

Roosendaal B, Okuda S, Van der Zee EA, McGaugh JL. (2006) Glucocorticoid enhancement of memory requires arousal-induced noradrenergic activation in the basolateral amygdala. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(17): 6741–6746.

Roosendaal B, Castello NA, Vedana G, Barsegyan A, McGaugh JL. (2008) Noradrenergic Activation of the Basolateral Amygdala Modulates Consolidation of Object Recognition Memory. *Neurobiology of Learning Memory*, 90(3): 576–579.

Rossato JI, Bevilaqua LRM, Myskiw JC, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. (2007) On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Learning & Memory*, 14: 36–46.

Sabatini DM. (2006) mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nature Review Cancer*, 6: 729–734.

Sara SJ. (2000) Retrieval and reconsolidation: Toward a neurobiology of remembering. *Learning & Memory*, 7(2): 73–84.

Schiller D, Monfils MH, Raio CM, Johnson DC, LeDoux JE, Phelps EA. (2010) Preventing the return of fear in humans using reconsolidation update mechanisms. *Nature*, 463(7): 49-54.

Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, Sabatini DM. (2006) Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Molecular Cell*, 22: 159–168.

Slipczuk L, Bekinschtein P, Katche C, Cammarota M, Izquierdo I, Medina JH. (2009) BDNF activates mTOR to regulate GluR1 expression required for memory formation. *PLoS One*, 4(6): 1-13.

Squire LR. *Memory and Brain*. New York: Oxford University Press, 1987.

Squire LR, Kandel ER. *Memória: da mente às moléculas*. Porto Alegre: Artmed, 2003.

Squire LR, Zola-Morgan JT, Clark RE. (2007) Recognition memory and the medial temporal lobe: a new perspective. *Nature Reviews. Neuroscience*, 8(11): 872-883.

Stoica L, Zhu PJ, Huang W, Zhou H, Kozma SC, Costa-Mattioli M. (2011) Selective pharmacogenetic inhibition of mammalian target of Rapamycin complex I (mTORC1) blocks long-term synaptic plasticity and memory storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108:9 3791-3796.

Sunnen CN, Brewster AL, Lugo JN, Vanegas F, Turcios E, Mukhi S, Parghi D, D'Arcangelo G, Anderson AE. (2011) Inhibition of the mammalian target of rapamycin blocks epilepsy progression in NS-Pten conditional knockout mice. *Epilepsia*, 52(11): 2065-2075.

Swiech L, Perycz M, Malik A, Jaworski J. (2008) Role of mTOR in physiology and pathology of the nervous system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, 1784(1): 116-132.

Tang SJ, Reis G, Kang H, Gingras AC, Sonenberg N, Schuman EM. (2002) A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(1): 467–472.

Tischmeyer W, Schicknick H, Kraus M, Seidenbecher CI, Staak S, Scheich H, Gundelfinger ED. (2003) Rapamycin-sensitive signalling in long-term consolidation of auditory cortex-dependent memory. *European Journal of Neuroscience*, 18(4): 942-950.

Venturella R, Lessa D, Luft T, Roozendaal B, Schwartzmann G, Roesler R. (2005) Dexamethasone reverses the memory impairment induced by antagonism of hippocampal gastrin-releasing peptide receptors. *Peptides*, 26: 821-825.

Vézina C, Kudelski A, Sehgal SN. (1975). Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic.. *The Journal of. Antibiotics*, 28(10): 721-736.

Wang L, Harris TE, Lawrence JC. (2008) Regulation of Proline-Rich Akt Substrate of 40 kDa function by mammalian target of rapamycin complex 1-mediated phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(23): 15619-15627.

Woo SY, Kim DH, Jun CB, Kim YM, Haar EV, Lee SI, Hegg JW, Bandhakavi S, Griffin TJ. (2007) PRR5, a novel component of mTOR complex 2, regulates platelet-derived growth factor receptor beta expression and signaling, *The Journal of Biological Chemistry*, 282: 25604–25612.

Yellen P, Saqcena M, Salloum D, Feng J, Preda A, Xu L, Rodrik-Outmezguine V, Foster DA. (2011) High-dose rapamycin induces apoptosis in human cancer cells by dissociating mTOR complex1 and suppressing phosphorylation of 4E-BP1. *Cell Cycle*, 10(22): 3948 - 3956.

Xiangyu L, Zhenyu Y. (2009) Recent Patents and Patent Applications Relating to mTOR Pathway. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences* , 3: 44-52.

14. ANEXOS

14.1. PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A Comissão Científica e a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisaram o projeto:

Projeto: 09-641 **Versão do Projeto:** 27/01/2010

Pesquisadores:

RAFAEL ROESLER

PAULO FERNANDES COSTA JOBIM

Título: AVALIAÇÃO DO PAPEL DA PROTEÍNA MTOR HIPOCAMPAL E AMIGDALAR NA CONSOLIDAÇÃO, RECONSOLIDAÇÃO E EXTINÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA DE ESQUIVA INIBITÓRIA EM RATOS

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais. Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada imediatamente a CEUA/HCPA.

Porto Alegre, 22 de fevereiro de 2010.


Prof. Nadine Clausell
Coordenadora GPPG e CEP/HCPA

14.2. PRODUÇÃO CIENTÍFICA DO DOUTORADO

14.2.1. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS

Jobim PFC, Nunes LN, Giugliani R, da Cruz IB. (2010) Is there an association between cancer mortality and agrottoxics use? A contribution to the debate. *Revista de Ciências e Saúde Coletiva*, 15(1): 277-88.

Jobim PFC, Prado-Lima PA, Schwanke CH, Giugliani R, Cruz IB. (2008) The polymorphism of the serotonin-2A receptor T102C is associated with age. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 41(11): 1018-23.

14.2.2. ARTIGOS COMPLETOS SUMETIDOS

Werenicz A, Christoff RR, Blank M, **Jobim PFC**, Pedroso TR, Reolon GK, Schröder N, Roesler R. Administration of the phosphodiesterase type 4 inhibitor rolipram into the amygdala at a specific time interval after learning increases recognition memory persistence. *Learning & Memory* (2011).

14.2.3. RESUMOS PUBLICADOS EM EVENTOS

Investigation of trace elements participating during memory formation using PIXE. **Jobim PFC**, Santos CEI dos, Maurmann N, Pedroso TR, Debastiani R, Dias JF. 7th International Symposium on Bio-PIXE. Sendai-JP, 2011.

Efeitos da inibição de síntese protéica na amígdala basolateral sobre a reconsolidação da memória de esquivo inibitória. Carvalho LM, Werenicz A, Zambom J, Almeida D, Christoff RR, **Jobim PFC**, Roesler R. Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Porto Alegre-RS, 2011.

mTOR Participation in post-reactivation of novel object recognition memory. **Jobim PFC**, Werenicz A, Christoff RR, Pedroso TR, Roesler R. XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. Rio de Janeiro-RJ, 2011.

Importance of mRNA and protein synthesis for reconsolidation of aversive memory. Christoff RR, Maurmann N, **Jobim PFC**, Werenicz A, Carvalho LM, Pedroso TR, Roesler R. XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. Rio de Janeiro-RJ, 2011.

Investigation of changes in elemental concentration of brain tissues during fear memory corticalization using PIXE. **Jobim PFC**, Santos CEI, Maurmann N, Pedroso TR, Reolon GK, Roesler R, Dias JF. 20th International Conference on Ion Beam Analysis. Itapema-SC, 2011.

Memory enhancement by cisplatin in rats. Maurmann N, Reolon GK, Pedroso TR, **Jobim PFC**, Werenicz A, Marcondes N A, Paim L. 6º Congresso Brasileiro de Cérebro, Comportamento e Emoções. Gramado-RS, 2010.

Efeito da administração intra-amigdalar de mangiferina na memória de reconhecimento de objeto em ratos. Marcondes NA, Maurmann N, Werenicz A, Paim L, Pedroso TR, **Jobim PFC**, Reolon GK, Roesler R. 6º Congresso Brasileiro de Cérebro, Comportamento e Emoções. Gramado-RS, 2010.

Investigation of long-term memory formation using Particle-induced X-ray Emission. **Jobim PFC**, Santos CEI, Reolon GK, Maurmann N, Pedroso TR, Werenicz A, Marcondes NA, Paim L, Roesler R, Dias JF. 12th International Conference on Particle Induced X-Ray Emission and Its Analytical Applications. Guildford- UK, 2010.

Efeito da inibição de histonas desacetilases na memória de reconhecimento de objeto em ratos velhos. Werenicz A, Reolon GK, Maurmann N, Pedroso TR, **Jobim PFC**, Paim L, Roesler R. XXV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE. Àguas de Lindóia- SP, 2010.

Efeito da administração intra-hipocampal do extrato de mangiera indica na consolidação da memória de reconhecimento de objeto e da memória de esquia inibitória em ratos. Paim L, Maurmann N, Pedroso TR, Werenicz A, Christoff RR, **Jobim PFC**, Reolon GK, Roesler R. XXV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE. Águas de Lindóia-SP, 2010.

Papel da mTOR hipocampal na consolidação da memória aversiva de esquia inibitória em ratos. Paim L, **Jobim PFC**, Maurmann N, Reolon GK, Pedroso TR, Marcondes NA, Werenicz A, Roesler R. XXV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia. Águas de Lindóia-SP, 2010.

mTOR participation in consolidation and reconsolidation of aversive and recognition memory. Reolon GK, **Jobim PFC**, Maurmann N, Pedroso TR, Werenicz A, Marcondes NA, Paim L, Roesler R. 40° annual meeting of Neuroscience. San Diego - US, 2010.

Efeito da inibição de histonas desacetilases no hipocampo dorsal na memória aversiva em ratos. Werenicz A, Reolon GK, Marcondes NA, Maurmann N, **Jobim PFC**, Pedroso TR, Roesler R. XXI Salão de Iniciação Científica da UFRGS. Porto Alegre -RS, 2009.

Efeito da administração intra-hipocampal de mangiferina na memória aversiva de reconhecimento de objeto em ratos. Maurmann N, Marcondes NA, Werenicz A, Paim L, Pedroso TR, **Jobim PFC**, Reolon GK, Roesler R. XI Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Porto Alegre-RS, 2009.

Importância da síntese de mRNA na amígdala durante a reconsolidação da memória de esquia inibitória em ratos. Pedroso TR, Maurmann N, **Jobim PFC**, Marcondes NA, Werenicz A, Paim L, Reolon GK, Roesler R. Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Porto Alegre-RS, 2009.

Efeito da administração de butirato sódico (inibidor de histonas desacetilases) durante a pré-exposição ao contexto na memória de esquiva inibitória em ratos. Reolon GK, Pedroso TR, **Jobim PFC**, Marcondes NA, Maurmann N, Werenicz A, Roesler R. XI Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Porto Alegre-RS, 2009.

14.2.4. PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

7th International Symposium on Bio-PIXE (2011)

20th International Conference on Ion Beam Analysis (2011).

VI Oficina de Neurociências (2010).

12th International Conference on Particle Induced X-Ray Emission and its Analytical Applications (2010).