

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: NEUROCIÊNCIAS

JOCIANE DE CARVALHO MYSKIW

**PARTICIPAÇÃO DA PROTEÍNA mTOR HIPOCAMPAL NA
CONSOLIDAÇÃO E RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA DE
RECONHECIMENTO DE OBJETOS EM RATOS**

Porto Alegre

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

JOCIANE DE CARVALHO MYSKIW

**PARTICIPAÇÃO DA PROTEÍNA mTOR HIPOCAMPAL NA
CONSOLIDAÇÃO E RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA DE
RECONHECIMENTO DE OBJETOS EM RATOS**

Tese apresentada como requisito para obtenção do grau de Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Área de Concentração em Neurociências, da Faculdade de Medicina, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Dr. Martín Cammarota

Porto Alegre

2008

JOCIANE DE CARVALHO MYSKIW

**PARTICIPAÇÃO DA PROTEÍNA mTOR HIPOCAMPAL NA
CONSOLIDAÇÃO E RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA DE
RECONHECIMENTO DE OBJETOS EM RATOS**

Tese apresentada como requisito para obtenção do grau de Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Área de Concentração em Neurociências, da Faculdade de Medicina, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovado em _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Martín Cammarota – PUCRS

Prof. Dr. Iván Izquierdo – PUCRS

Profa. Dra. Lia Rejane Bevilaqua – IPA

Profa. Dra. Mirna Wetters Portugues – PUCRS

Profa. Dra. Juliana Sartori Bonini – UCPEL

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Irene e Hélio**, pelos ensinamentos, sinceridade e honestidade que tive desde a minha infância; por sempre me apoiarem nas minhas decisões, mesmo que não fossem muito fáceis.

Ao meu esposo, grande amor, amigo e companheiro **Mauro**, por acreditar que é possível crescer e buscar sempre mais conhecimento, lutar e correr atrás do que se quer e principalmente pelo patrocínio, sem você nada disso seria possível.

Ao **Martín**, por ter me concedido a oportunidade de trabalhar sob sua orientação; por sua ajuda, dedicação e confiança em meu trabalho, mesmo estando muito ocupado; cuidando sempre do bem estar e do andamento de tudo e todos no laboratório; por ser um exemplo de profissionalismo.

Ao “mestre”, **Iván Izquierdo**, por ter me proporcionado a oportunidade de fazer parte do Centro de Memória, foi inspirada pelo seu trabalho que me motivaram a vir a este programa de pós-graduação, seu conhecimento científico é imensurável.

A minha amiga e irmã de coração, **Janine**, pelo carinho, dedicação e ajuda sempre que necessário; por tudo o que me ensinaste, me ajudou muito na realização do doutorado.

Ao **Lucas**, amigo e parceiro, que abriu mão de seus finais de semana para me ajudar na realização deste trabalho.

Aos amigos que fazem parte do Centro de Memória, que são a minha “grande família” em Porto Alegre, pois todos participaram diretamente da minha vida, por isso agradeço a eles: **Júlia, Cristiane, Clarice, Siomara, Fernando, Ramón, Pâmela, Carolina, Weber, Juliana, Natália, Gabriela, Andressa, Letícia**. Agradeço pela amizade, companhia, força e ajuda sem as quais a realização deste trabalho teria sido impossível ou, pelo menos, muito difícil.

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul pelo fornecimento da bolsa e da infra-estrutura, permitindo a dedicação e execução deste trabalho.

RESUMO

Depois de adquiridas as memórias atravessam um período de filtragem e fixação progressivo dependente de síntese protéica, o qual denomina-se consolidação. Evidências experimentais sugerem que as memórias consolidadas não são imutáveis senão que, após serem evocadas, tornam-se novamente lábeis e para persistirem necessitam da ocorrência de outro processo também dependente de síntese protéica, chamado reconsolidação. No presente trabalho mostramos que, quando infundido na região CA1 do hipocampo dorsal 0, 180 ou 360 mas não 540 minutos após o treino na tarefa de reconhecimento de objetos, o inibidor de mTOR RAPA prejudica significativamente a memória de longa duração sem afetar a retenção da memória de curta duração. A administração intra-hipocampal de RAPA 24 horas antes da respectiva sessão comportamental não altera a atividade locomotora e exploratória nem o estado de ansiedade dos animais e não prejudica o aprendizado de tarefas espaciais e aversivas que dependem da integridade funcional do hipocampo. Isto sugere que o efeito que a RAPA tem sobre a retenção da memória de reconhecimento deve-se, efetivamente, ao bloqueio do processo de consolidação e não a um dano irreversível na funcionalidade do hipocampo nem a um prejuízo comportamental inespecífico. Quando infundida na região CA1 do hipocampo dorsal após reativação da memória de reconhecimento na presença de objetos familiares, a RAPA não afeta a retenção ulterior do traço mnemônico. No entanto, quando esta droga foi administrada após exposição a um objeto familiar e um novo, prejudicou a retenção da memória de ambos os objetos. O efeito amnésico da RAPA independe do tempo transcorrido entre as sessões de reativação e teste, e não ocorre após a simples exposição ao contexto ou a objetos desconhecidos. Nossos resultados indicam que a ativação de mTOR é requerida na região CA1 do hipocampo dorsal para a consolidação da memória de reconhecimento de objetos e sugerem que a inibição desta cinase após a reativação da memória em questão prejudica sua persistência.

Palavras-chave: Memória, mTOR, Consolidação, Reconsolidação, Hipocampo, Síntese Protéica, Reconhecimento de Objetos.

ABSTRACT

Evidence indicates that activation of the neuronal protein synthesis machinery is required in areas of the brain relevant to memory for consolidation and persistence of the mnemonic trace. Here, we report that inhibition of hippocampal mTOR, a protein kinase involved in the initiation of mRNA translation, immediately or 180 min but not 540 min after training impairs consolidation of long-term object recognition memory without affecting short-term memory retention or exploratory behavior. When infused into dorsal CA1 after long-term memory reactivation in the presence of familiar objects the mTOR inhibitor rapamycin (RAP) did not affect retention. However, when given immediately after exposing animals to a novel and a familiar object, RAP impaired memory for both of them. The amnesic effect of the post-retrieval administration of RAP was long-lasting, did not happen after exposure to two novel objects or following exploration of the training arena in the absence of other stimuli, suggesting that it was contingent with reactivation of the consolidated trace in the presence of a behaviorally relevant and novel cue. Our results indicate that mTOR activity is required in the dorsal hippocampus for consolidation of object recognition memory and suggest that inhibition of this kinase after memory retrieval in the presence of a particular set of cues hinders persistence of the original recognition memory trace.

Keywords: Memory, mTOR, Consolidation, Reconsolidation, Hippocampus, Protein Synthesis, Object Recognition.

LISTAS DE FIGURAS

FIGURA 1 – Figura ilustrativa da via de sinalização mTOR.	18
FIGURA 2 – Foto de um animal sendo submetido à cirurgia estereotáxica para a implantação de cânulas de infusão na região CA1 do hipocampo dorsal. No detalhe, foto do aparelho estereotáxico.	20
FIGURA 3 – Fotografia ilustrando o procedimento de infusão de fármacos através das cânulas-guia esterotaxicamente implantadas. A cânula de infusão é introduzida na luz da cânula guia, atingindo a região-alvo onde se deseja que o fármaco seja infundido.	22
FIGURA 4 – Fotografia de um animal sendo treinado na tarefa de reconhecimento de objetos.	23
FIGURA 5 – Esquema ilustrativo dos protocolos de treino e teste no paradigma de reconhecimento de objetos.	24
FIGURA 6 – Esquema ilustrativo do protocolo de reativação da memória de reconhecimento de objetos com objetos familiares.	25
FIGURA 7 – Esquema ilustrativo dos protocolos de reativação da memória de reconhecimento de objetos com estímulo novo.	26
FIGURA 8 – Fotografia de um rato explorando o campo aberto.	27
FIGURA 9 – Fotografia de um rato sendo submetido à tarefa de Labirinto em Cruz Elevado.	27
FIGURA 10 – Vista geral da sala do LAM do Centro de Memória do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS.	28
FIGURA 11 – Fotografia de um rato sobre a plataforma de escape no LAM.	29
FIGURA 12 – Fotografia da caixa de Esquiva Inibitória.	30
FIGURA 13 – Desenho do cérebro de rato adquirido do Atlas de Paxinos e Watson, 1986, mostrando a localização da implantação das cânulas de infusão na região CA1 do hipocampo dorsal.	31
FIGURA 14 – Atividade da mTOR no hipocampo dorsal é requerido durante uma restrita janela temporal após o treino para a consolidação da memória de reconhecimento de objetos.	34
FIGURA 15 – Inibição pós-treino da mTOR no hipocampo não afeta a memória de curta duração para a tarefa de reconhecimento de objetos.	35
FIGURA 16 – A inibição da mTOR hipocampal 24 horas antes do treino não afeta a aquisição nem a retenção de memórias dependentes do hipocampo.	37
FIGURA 17 – Inibição hipocampal de mTOR após uma sessão de reativação envolvendo exposição a objetos familiares não afeta a posterior retenção da memória de reconhecimento de longa duração.	39
FIGURA 18 – Inibição da mTOR hipocampal depois da reativação da memória na presença de um objeto familiar e um objeto novo prejudica a memória desses objetos sem afetar a memória do outro objeto familiar não apresentado durante a sessão de reativação.	42

FIGURA 19 – O efeito amnésico produzido pela inibição hipocampal de mTOR depois da sessão de reativação da memória na presença de um objeto familiar e um objeto novo.	43
FIGURA 20 – A inibição de mTOR hipocampal 24 horas após a sessão de treino na ausência de eventos comportamentais relevantes não afeta a retenção da memória de reconhecimento de objetos.	45
FIGURA 21 – A inibição da mTOR hipocampal 24 horas após a sessão de treino na ausência de eventos comportamentais relevantes não afeta a retenção da memória de reconhecimento de objetos.	47
FIGURA 22 – A inibição da mTOR hipocampal após uma sessão de pseudoreativação envolvendo exposição a dois objetos novos não afeta a memória de reconhecimento original.	49
FIGURA 23 – A inibição da mTOR hipocampal depois de uma segunda sessão de reativação, na presença de objetos familiares, não tem efeito sobre a persistência da memória.	52
FIGURA 24 – A inibição da mTOR hipocampal, depois de uma segunda sessão de reativação, na presença de objetos familiares, não tem efeito sobre a persistência da memória.	53
FIGURA 25 – A inibição da mTOR hipocampal após a sessão de reativação na presença de um objeto novo afeta a memória para o objeto familiar lembrado durante a reativação.....	55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Infusão de rapamicina na região CA1 do hipocampo dorsal não afeta a atividade locomotora e exploratória ou o estado de ansiedade.....	36
--	----

LISTA DE SIGLAS

BDNF	brain-derived neurotrophic factor
DMSO	dimethyl sulfoxide
eIF4E-BP1	eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1
GβL	G-protein β-subunit-like protein
mRNA	messenger ribonucleic acid
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
NMDA	N-methyl-d-aspartic acid
PDK1	phosphoinositide-dependent protein kinase 1
PI3K	phosphoinositide-3' kinase
PIP3	phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pten	phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten
RAPA	Rapamycin
Rheb	Ras homologue enriched in brain
S6k	ribosomal S6 kinase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	MATERIAIS E MÉTODOS	20
2.1	Animais Experimentais	20
2.2	Cirurgia Estereotáxica	20
2.3	Manipulação	21
2.4	Intervenção farmacológica.....	21
2.5	Paradigma de reconhecimento de objetos	22
2.5.1	<i>Protocolo de Aquisição do paradigma de reconhecimento de objetos</i>	<i>23</i>
2.5.2	<i>Protocolo de reativação da memória de reconhecimento.....</i>	<i>24</i>
2.5.3	<i>Protocolo de reativação da memória de reconhecimento de objetos com estímulo novo.....</i>	<i>25</i>
2.6	Campo Aberto	26
2.7	Labirinto em Cruz Elevado	27
2.8	Labirinto Aquático de Morris – LAM.....	27
2.9	Protocolo de aprendizado do Labirinto Aquático de Morris	29
2.10	Esquiva Inibitória	29
2.11	Controle histológico da região estudada.....	31
2.12	Análise Estatística dos Dados	31
3	RESULTADOS.....	33
4	DISCUSSÃO	56
5	CONCLUSÕES	61
6	REFERÊNCIAS.....	63
	ANEXO	78

1 INTRODUÇÃO

A memória se refere à capacidade de aquisição, armazenamento e conservação de informações, que possam ser recuperadas e utilizadas posteriormente; é o arcabouço que mantém a história pessoal e torna possível modificações comportamentais ao longo da vida (Izquierdo, 2002; Squire e Kandel, 2003). A maior parte do que um ser humano adulto sabe sobre o mundo não estava em seu cérebro no momento de seu nascimento, mas foi adquirida por meio de experiências e mantida pela memória (Squire e Kandel, 2003).

A fase de **aquisição** da memória se refere ao momento em que seres humanos e outros organismos adquirem as informações a respeito do mundo, uma obtenção de novas informações, habilidades ou experiências (Squire, 1987), pode-se dizer então que não existe memória sem que antes aconteça o aprendizado ou fase de aquisição, pois eventos ocorridos no passado orientam a percepção do presente e são estratégias determinantes de adaptação e sobrevivência de todas as espécies, e indispensáveis para determinar a individualidade (Izquierdo, 2002; Szapiro et al., 2002).

Este acervo idiossincrático de informações, apesar de ser denominado genericamente pela palavra memória, é diferente de acordo com o seu *conteúdo* (podendo ser classificado como memórias explícitas ou declarativas e implícitas ou não-declarativas) e quanto ao *tempo que perdura* (podendo ser classificado como memórias de trabalho, curta ou longa duração e remotas).

As **memórias explícitas** são adquiridas com plena intervenção da consciência e podem ser divididas em memórias episódicas e semânticas. As memórias episódicas são referentes a eventos aos quais indivíduos assistem ou participam (sua festa de formatura ou casamento, etc.) e as memórias semânticas são as de conhecimentos gerais, informações acerca do mundo (medicina, português, história, etc.). As **memórias implícitas**, por sua vez, referem-se àquelas memórias que são adquiridas de maneira inconsciente, mais ou menos automática e sem que o sujeito perceba de forma clara que as está aprendendo: resulta difícil, se não impossível, descrever coerentemente (tornar explícito) cada passo da aquisição da habilidade de andar de bicicleta. As memórias implícitas englobam as memórias

de procedimentos, de habilidades motoras, as que comumente são chamadas de “hábitos” e a informação obtida a partir de aprendizados simples, como aquelas decorrentes do treinamento em tarefas de condicionamento e habituação. A formação desses dois tipos de memória depende de estruturas encefálicas diferentes. As memórias explícitas requerem a integridade do lobo temporal medial, que compreende o hipocampo, o giro denteado e o complexo subicular juntamente com os córtices entorrinal, perirrinal e parahipocampal; já as memórias implícitas envolvem diferentes estruturas como a amígdala, os gânglios da base e o cerebelo (Albright et al., 2000; Lees e Jones, 2000; Izquierdo, 2002; Squire et al., 2007).

As **memórias de trabalho** são utilizadas para entender o ambiente externo ao indivíduo, e exercem função executiva auxiliando nas tomadas de decisões. A maior parte dos componentes das memórias de trabalho desaparece em segundos. Este tipo de memória não forma "arquivos", e parece depender basicamente da atividade elétrica de células de uma região cerebral denominada córtex pré-frontal (Izquierdo et al., 1998; Izquierdo, 2002). As **memórias de curta duração** persistem poucos minutos ou horas (Izquierdo et al., 1998; Alberini et al., 2006), não requerem síntese de mRNA (*messenger ribonucleic acid*) nem de proteínas e sua formação ocorre a partir da memória de trabalho; as **memórias de longa duração** requerem síntese de mRNA, síntese de proteínas e a participação de várias vias de sinalização metabólicas celulares vinculadas a esses processos. Estas memórias duram muitos dias ou meses e, quando perduram por muitos anos, costumam ser denominadas de **memórias remotas** (Abel e Kandel, 1998; Mayford e Kandel, 1999; Lees e Jones, 2000; McGaugh, 2000; Albright, et al., 2000; Cammarota et al., 2000; Kandel, 2001; Izquierdo, 2002; Alberini et al., 2006).

As memórias de curta e de longa duração utilizam as mesmas estruturas nervosas 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, ou seja, o armazenamento das informações recém adquiridas é chamado de **consolidação**. Biologicamente, o processo de consolidação consiste em um conjunto complexo e altamente regulado de reações bioquímicas interdependentes que ocorrem em neurônios de algumas regiões cerebrais, levando a uma progressiva estabilização pós-aquisição das memórias de longa duração (Dudai, 2004). Enquanto estão sendo consolidadas, as memórias encontram-se lábeis e são sensíveis a inibidores de

síntese protéica ou eventos traumáticos (Taubenfeld et al., 2001; Izquierdo, 2002; Squire e Kandel, 2003).

Originalmente, a consolidação era considerada como sendo um processo unidirecional, no qual o traço, uma vez consolidado, tornava-se permanente e resistente a intervenções, não podendo sofrer modificações. Vários estudos, porém, têm modificado este conceito (Misanin et al., 1968; Mactutus et al., 1979; Judge e Quartermain, 1982), pois, um mecanismo de armazenamento de informações que operasse dessa maneira acarretaria enorme prejuízo, já que é de extrema importância para o sistema nervoso central a capacidade de adaptação às circunstâncias ao meio em contínua transformação. Além disso, a simples passagem do tempo pode ser capaz de enfraquecer algumas memórias, tornando-as menos acessíveis e diminuindo a probabilidade de serem expressas (Sara, 2000).

Memórias já consolidadas tornam-se novamente lábeis e susceptíveis a interrupções quando **evocadas** (Przybylski e Sara, 1997; Debiec et al., 2002; Milekic e Alberini, 2002), processo este também conhecido como reativação, recordação, lembrança ou recuperação (Izquierdo, 2002). Além disso, a consolidação de memórias de longa duração conta com modificações sinápticas, morfológicas e funcionais, que parecem formar a base da evocação (Szapiro et al., 2002), já a formação de novas memórias tem como pano de fundo a evocação de experiências ocorridas no passado, e esse vínculo é “necessário” para que novas memórias possam ser adquiridas, pois são as memórias já consolidadas que organizam e fornecem significado para as experiências perceptuais do presente (Sara, 2000).

Após a evocação, memórias já estabilizadas retornam ao estado vulnerável, e para que persistam, precisam passar por um novo processo de estabilização, dependente de síntese protéica, chamado de **reconsolidação** (Misanin et al., 1968; Judge e Quartermain, 1982; Sara, 2000; Nader et al., 2000a; Debiec et al., 2002; Kida et al., 2002; Pedreira et al., 2002; Nader 2003; Sangha et al., 2003; Eisenberg e Dudai 2004; Lee et al. 2004; Stollhoff et al., 2005; Inda et al., 2005; Gainutdinova et al., 2005). A reconsolidação pode fornecer uma janela de oportunidades para a manutenção, o fortalecimento, e atualização (integração de novas informações) do traço mnemônico evocado (Nader et al., 2000b; Sara, 2000; Dudai, 2002; Frenkel et al., 2005; Rodriguez-Ortiz et al., 2005; Tronson et al., 2006; Rossato et al., 2006, 2007).

A reconsolidação reforça a proposta de que a memória é um processo dinâmico e que novas memórias são formadas com base na reativação de informações já consolidadas. Assim, a evocação pode mudar o conteúdo informacional do “traço original” desta memória, podendo ser vista de um ponto neurobiológico como emergente e dinâmica, conferindo uma propriedade adaptativa ao sistema nervoso central (Sara, 2000).

Enquanto a consolidação foi detectada em todos os tipos de formação de memórias de longa duração (Dudai, 2004), a reconsolidação não é unânime, pois vários pesquisadores falharam em detectá-la em paradigmas comportamentais bem conhecidos (Dawson e McGaugh, 1969; Cammarota et al., 2004; Hernandez e Kelley, 2004; Lattal e Abel, 2004; Mileusnic et al., 2005; Power et al., 2006). Mas, vários tratamentos que bloqueiam consolidação também são capazes de prejudicar a reconsolidação, o que levou a hipótese de que a reconsolidação envolve a recapitulação dos acontecimentos moleculares que ocorrem durante a consolidação (Sara, 2000). No entanto, importantes diferenças bioquímicas e farmacológicas entre os dois processos foram encontradas (Anokhin et al., 2002; Lee et al., 2004; Boccia et al., 2006; Bucherelli et al., 2006), indicando que, apesar de existirem algumas semelhanças, consolidação e reconsolidação não são processos idênticos (Lee et al., 2004; Alberini, 2006).

Mesmo assim, os processos de consolidação e reconsolidação parecem partilhar de alguns mecanismos em comum como, por exemplo, o requerimento de síntese protéica para a persistência de memórias, na amígdala e no hipocampo (Debiec et al., 2002). Existem indícios de que algumas vias de sinalização que controlam a tradução do mRNA estão envolvidas na consolidação de memórias bem como na persistência do traço após sua evocação (Mathies, 1989; Raught et al., 2001; Steward e Schuman, 2001; Jacinto e Hall, 2003; Bekinschtein et al., 2007; Cammarota et al., 2007; Da Silva et al., 2008).

A mTOR (sigla derivada do nome em inglês *mammalian target of rapamycin*) é uma enzima capaz de fosforilar proteínas em resíduos serina ou treonina. Esta cinase pode agir como mediadora da via de sinalização que compreende tanto a PI3K (*phosphoinositide-3' kinase*) quanto a Akt, modulando o crescimento e a proliferação celular através da regulação do estado de fosforilação de p70S6K (*ribosomal S6 kinase*) e do fator de iniciação eucariótico 4E-BP1 (*4E binding protein 1*), ambos envolvidos no início da tradução do mRNA. A atividade da mTOR pode

ser modulada em resposta a vários estímulos, como fatores tróficos, mitógenos, hormônios, aminoácidos, o estado energético ou estresse celular (Sabatini, 2006; Avruch et al., 2005; Hay e Sonenberg, 2004; Kimura et al., 2003; O'Shea et al., 2005; Reiling e Sabatini, 2006). A mTOR pode ser ativada por várias cascatas de sinalização envolvidas na plasticidade sináptica, incluindo as mediadas por receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo NMDA (*N-methyl-d-aspartic acid receptors*; Gong et al., 2006; Huang et al., 2007) e pelo fator de crescimento BDNF (*brain derived neurotrophic factor*; Takei et al., 2004; Hay e Sonenberg, 2004; Inamura et al., 2005).

Estudos mostram que a mTOR é importante para a diferenciação e desenvolvimento de neurônios, crescimento e direcionamento de axônios, arborização dendrítica, bem como sinaptogênese. No sistema nervoso central, esta proteína cinase é crucial para plasticidade sináptica, aprendizado e formação de memórias (Swiech et al., 2008). A via de sinalização mTOR encontra-se afetada no sistema nervoso central em várias condições neuropatológicas, como tumores cerebrais, esclerose tuberosa, displasia cortical e doenças neurodegenerativas, como Alzheimer, Parkinson e Doença de Huntington (An et al., 2003; Chan et al., 2004; Inoki et al., 2005; Ljungberg et al., 2006; Malagelada et al., 2006; Ravikumar et al., 2004; Lafay-Chebassier et al., 2005).

Os mamíferos possuem dois distintos complexos de mTOR que são denominados mTORC1 e mTORC2 (Sarbasov et al., 2005; Guertin e Sabatini, 2005; Bhaskar e Hay, 2007). Para a formação do mTORC1, a subunidade catalítica da mTOR interage com *raptor*, uma proteína que funciona recrutando substratos para mTOR, e GβL (*G-protein β-subunit-like protein*), um regulador da atividade cinase de mTOR (Loewith et al., 2002; Kim et al., 2002; Hara et al., 2002; Kim et al., 2003; Sabatini, 2006). O mTORC1 é fortemente inibido por rapamicina e é um dos efetores da via de sinalização da Akt. O mTORC1 controla a ativação da S6K (*ribosomal S6 kinase*), proteína responsável pela regulação da biogênese ribossômica, assim como do fator de iniciação eucariótico 4EB-P1, que possui um importante papel na regulação da tradução de proteínas (Guertin e Sabatini, 2005; Shaw e Cantley, 2006; Wullschleger et al., 2006; Yang e Guan, 2007; Wang et al., 2008). TSC1 (*tuberous sclerosis 1*) e TSC2 (*tuberous sclerosis 2*) são reguladores negativos de mTORC1, os quais agem inibindo a Rheb (*Ras homologue enriched in brain*), uma pequena proteína ligada a GTP que ativa mTORC1 (Sabatini, 2006). O

complexo mTORC1 está envolvido no controle de uma ampla variedade de processos celulares, como transcrição, tradução, biogênese ribossômica, autofagia e ciclo celular.

Já, o complexo mTORC2 é formado por mTOR e GβL (também conhecido como mLST8), mas ao invés de *raptor* contêm outras duas proteínas, *riCTOR* e mSin1 (também conhecida como *mitogen-activated-protein-kinase-associated protein 1*; Sarbassov et al., 2004; Jacinto et al., 2004; Sarbassov et al., 2005, Sabatini, 2006). O mTORC2 é insensível à rapamicina e é capaz de fosforilar diretamente a enzima Akt no sítio hidrofóbico C-terminal, e, para uma ativação mais completa desta cinase, conta com a ajuda de PDK1 (*phosphoinositide-dependent protein kinase 1*). Não se sabe como o mTORC2 é regulado, mas sua atividade responde a fatores de crescimento e é mediado por receptores de tirosina cinase (TK – *tyrosine kinase*). O mTORC2 pode ser considerado acima de mTORC1 na via de sinalização por ser capaz de ativar diretamente Akt e, conseqüentemente, levar à inibição do complexo TSC1-TSC2, que causa a ativação de Rheb e mTORC1 (Sabatini, 2006). O complexo mTORC2 está envolvido na regulação do citoesqueleto e da atividade da proteína cinase PKCα (Sarbassov et al., 2004; Guertin e Sabatini, 2005; Sarbassov et al., 2005; Wullschleger et al., 2006; Yang e Guan, 2007).

A ativação dos complexos mTOR pode ser desencadeada através da ativação de receptores de tirosina cinase, por fatores tróficos ou hormônios. Como mostrado na Figura 1 (página 18), quando receptores de tirosina cinase são ativados, ocorre o recrutamento de domínios SH2 contendo proteínas adaptadoras e conseqüente ativação de Ras (*21kDa guanine-nucleotide binding proteins*), e ambos podem levar a ativação de PI3K que, uma vez fosforilada, pode aumentar a produção de PIP3 (phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate) através da fosforilação de PI (phosphorylating phosphatidylinositol), PIP (phosphatidylinositol-4-phosphate) e PIP2 (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate). O fosfolípido PIP3 é regulado negativamente pela fosfatase PTEN (*phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten*), principal regulador negativo da via de sinalização PI3K/Akt. A conseqüência imediata para o aumento dos níveis de PIP3, é que este começa a agir como segundo mensageiro e atua recrutando proteínas cinases como PDK1 (*phosphoinositide-dependent protein kinase 1*) e Akt para a membrana celular. A proteína cinase Akt pode ser fosforilada por PDK1, PDK2 e mTORC2 (Sarbassov et al., 2005; Hresko e Mueckler, 2005), tornando-se ativa, podendo fosforilar e inativar

o complexo TSC2-TSC1 (Dan et al., 2002; Inoki et al., 2002; Manning et al., 2002). A inativação deste complexo resulta em um aumento dos níveis de Rheb-GTP na célula, que tem um efeito estimulatório sobre a atividade do mTORC1 (Garami et al., 2003; Inoki et al., 2003; Tee et al., 2003) que, por sua vez, pode fosforilar proteínas, como p70S6K e o fator de iniciação eucariótico 4E-BP1 (Burnett et al., 1998; Hay e Sonenberg, 2004; Harris e Lawrence, 2003; Jacinto et al., 2004; Sarbassov et al., 2005). A p70S6K quando fosforilada é ativada, podendo levar a fosforilação da proteína ribossomal S6, resultando em uma melhor tradução do mRNA (Fumagalli e Thomas, 2000; Terada et al., 1995; Jefferies et al., 1997), já o 4E-BP1 quando fosforilado é inativado e causa a dissociação entre o 4E-BP e eIF4E (*eukaryotic initiation factor 4E-binding*; Lin et al., 1994; Pause et al., 1994). Esta dissociação permite que o eIF4E recrute um complexo de iniciação para múltiplos fatores de tradução do mRNA (Lawrence e Abraham, 1997). A ativação dos complexos mTOR tem como consequência o aumento da síntese de proteínas, modulando o crescimento e a proliferação celular.

O mTORC1 pode ser inibido diretamente por rapamicina (Schreiber, 1991; Ferrari et al., 1993; Pearson et al., 1995; Sugiyama et al., 1996), um macrolídeo obtido da bactéria *Streptomyces hygroscopicus*, que no ano de 1999 foi aprovado para utilização em pacientes transplantados (Vezina et al., 1975; Sehgal et al., 1975; Schreiber, 1991; Dutcher, 2004) por suas propriedades imunossupressoras e anticancerígenas (Sabatini, 2006). A rapamicina exerce seu efeito principalmente por se ligar ao domínio N-terminal da mTOR, inibindo sua atividade enzimática (Swiech et al., 2008) e enfraquecendo a interação entre mTOR e *raptor* (Kim et al., 2002), consequentemente, suprimindo a fosforilação de seus principais alvos, a proteína cinase p70S6K e o fator de iniciação eucariótico 4E-BP1. Em contrapartida, a rapamicina não se liga diretamente ao mTORC2 (Sarbassov et al., 2004; Jacinto et al., 2004), mas é capaz de bloquear a ligação dos componentes deste complexo, *riCTOR* (Sarbassov et al., 2006) e mSin (Frias et al., 2006).

A rapamicina pode prevenir formas de plasticidade sináptica dependentes de síntese proteica, como a potenciação de longa duração (LTP - *long-term potentiation*) (Karpova et al., 2006; Tang et al., 2002) dependente de mGluR (metabotropic glutamate receptor), NMDAR (*N-methyl-D-aspartic acid*) e BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) em hipocampo de ratos (Hou e Klann, 2004; Tang et al., 2002); bloquear a facilitação de longa duração em *Aplysia* (Casadio et al., 1999);

inibir a ativação de p70S6K dependente de NMDAR-PI3K e mTOR durante a fase tardia da LTP (Cammalleri et al., 2003). A rapamicina é capaz de impedir a ativação da via de sinalização mTOR/S6K, ativada por BDNF, prejudicando a síntese de proteínas em neurônios hipocampais (Tang et al., 2002; Sanna et al., 2002; Cammalleri et al., 2003; Takei et al., 2004). Ao inibir a mTOR, a rapamicina prejudica a retenção de memórias espaciais e aversivas em ratos (Dash et al., 2006; Parsons et al., 2006a; Bekinschtein et al., 2007).

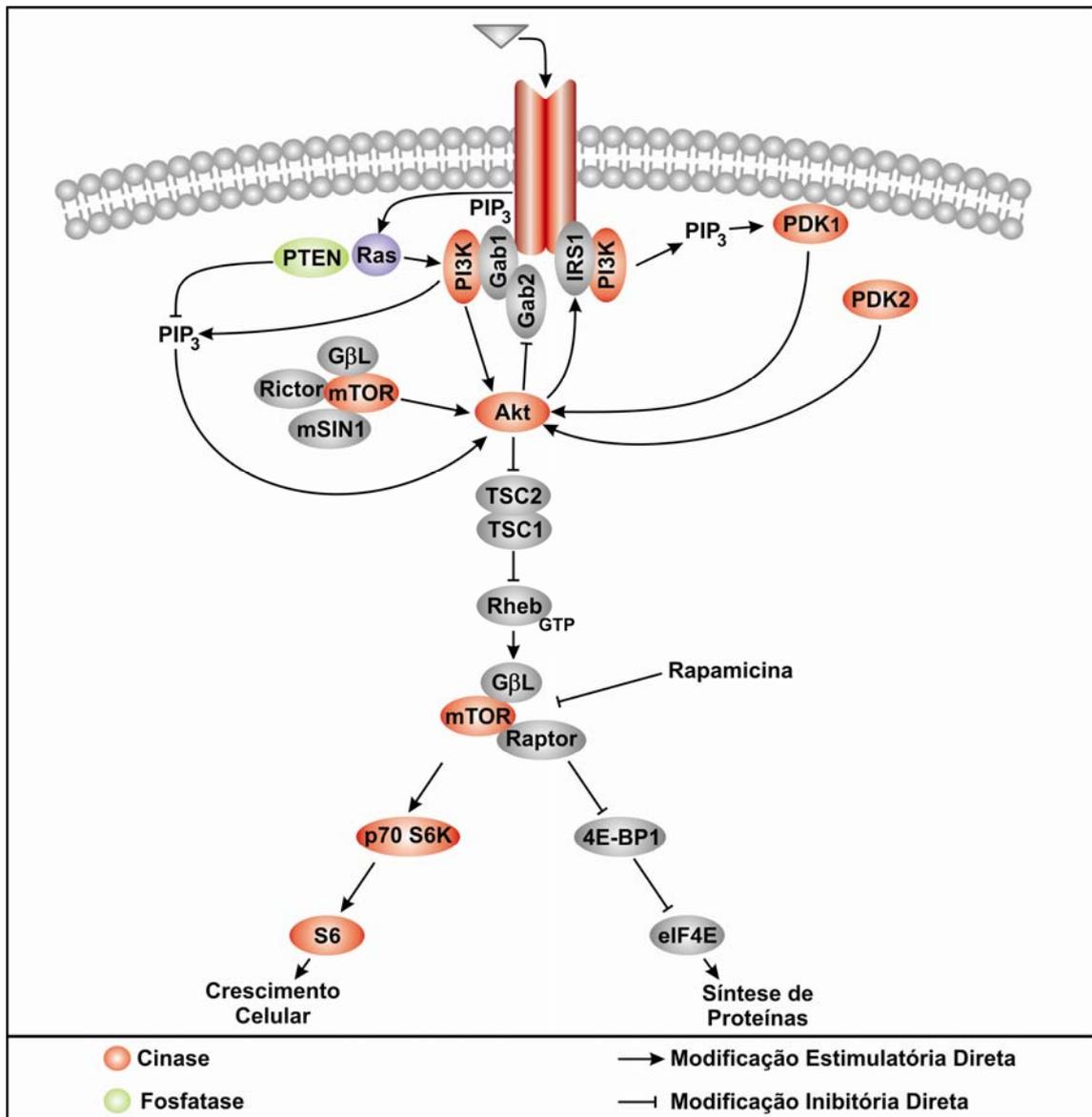


FIGURA 1 – Figura ilustrativa da via de sinalização mTOR.

A memória de reconhecimento de objetos permite discriminar características, elementos, situações e/ou artefatos familiares e novos, sendo que estas podem ser

de um item individual como um objeto ou de um ambiente completo ou mesmo de uma cena constituída de um arranjo espacial de muitos itens, uma capacidade obviamente significativa no que diz respeito à sobrevivência (Wan et al., 1999). Este paradigma comportamental possui várias vantagens: não depende de nenhum sistema de recompensa; não há estímulos aversivos (como choque); não requer restrição a alimento ou água, além de poder utilizar uma grande variedade de aparatos e objetos, ser feita tanto com ratos como camundongos; e não necessitar de um treinamento preliminar extenso já que o aprendizado se dá após uma única sessão.

Análises neurofisiológicas de pacientes acometidos de amnésia e experimentos comportamentais realizados em animais de laboratório sugerem que a integridade funcional do lobo temporal, mais especificamente da formação hipocampal, é essencial para codificar e armazenar memórias de reconhecimento (Ennaceur e Delacour, 1988; Logothetis e Sheinberg, 1996; Clark et al., 2000; Riesenhuber e Poggio, 2002). Experimentos farmacológicos indicam que o processo de consolidação da memória de reconhecimentos de objetos requer síntese protéica em diferentes estruturas do lobo temporal e sugerem que a evocação torna o traço de reconhecimento suscetível à intervenções farmacológicas (Kelly et al., 2003; Akirav e Maroun, 2006; Rossato et al., 2007). Porém, pouco se sabe a respeito dos mecanismos que regulam a síntese protéica no hipocampo durante o processamento da memória de reconhecimento de objetos e, com o intuito de suprir esta lacuna, o presente estudo teve como objetivo **verificar a participação da proteína mTOR na consolidação e reconsolidação da memória de reconhecimento de objetos em ratos.**

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais Experimentais

Foram utilizados ratos Wistar machos de 2,5 a 3 meses de idade, pesando em média 250g. Os animais foram mantidos em caixas moradias em número de 5 por caixa, em ambiente climatizado (temperatura de 22-24°C), com ciclo claro/escuro de 12 horas, com água e comida *ad libitum*. Uma vez adquiridos da FEPPS (Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde do Rio Grande do Sul, Porto Alegre), os animais foram mantidos no biotério do Centro de Memória do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS.

2.2 Cirurgia Estereotáxica

Os animais utilizados foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas guia de 0,2mm de calibre posicionadas 1,0mm acima da região CA1 do hipocampo dorsal, seguindo as coordenadas (A -4.2, L± 3.0, V - 2.0mm a partir do bregma) do Atlas de Paxinos e Watson (1986), conforme ilustra a Figura 2.

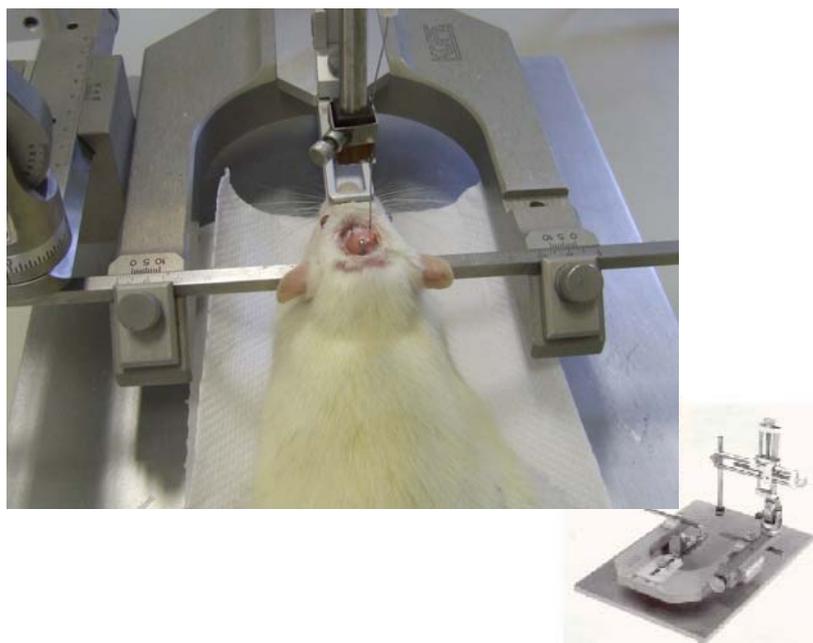


FIGURA 2 - Foto de um animal sendo submetido à cirurgia estereotáxica para a implantação de cânulas de infusão na região CA1 do hipocampo dorsal. No detalhe, foto do aparelho estereotáxico.

Todo o procedimento foi realizado com os animais previamente anestesiados com ketamina (“Francotar”; Virba, ou “Vetanarcol”; König), juntamente com Xilazina, um sedativo/miorrelaxante/analgésico (“Coopazine”; Coopers), ambos administrados intra-peritonealmente (*i.p.*), nas doses de 75mg/Kg e 10 mg/Kg, respectivamente.

2.3 Manipulação

Quatro dias após a cirurgia, os animais foram submetidos a duas sessões de manipulação. Durante cada sessão estes foram levados do biotério até a sala onde os experimentos foram realizados, retirados da caixa moradia e manuseados durante 5 minutos. Após 24 horas da última sessão de manipulação os animais foram submetidos aos paradigmas comportamentais.

2.4 Intervenção farmacológica

O fármaco utilizado neste estudo foi a Rapamicina, adquirido da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), dissolvido em DMSO (*dimethyl sulfoxide*) e mantido em alíquotas protegidas da luz a uma temperatura de -20°C. Imediatamente antes de ser utilizado, alíquotas foram diluídas na concentração trabalho em salina 0,9%.

Para o tratamento farmacológico, utilizou-se uma micro-seringa Hamilton acoplada a um tubo de polietileno com uma agulha de infusão (0,05mm de diâmetro). Foram infundidos bilateralmente 0,8µl por hemisfério cerebral de veículo (0,1% de DMSO em solução salina 0,9%) ou rapamicina (20pmol) a uma velocidade de 0,5 µl/min. com o auxílio de uma bomba de infusão (KDScientific). Ao término, as agulhas de infusão foram mantidas no interior das cânulas-guia por pelo menos mais 60 segundos, a fim de evitar refluxo de líquido (Figura 3). A dose utilizada de rapamicina foi determinada em estudos piloto.



FIGURA 3 - Fotografia ilustrando o procedimento de infusão de fármacos através das cânulas-guia esterotaxicamente implantadas. A cânula de infusão é introduzida na luz da cânula guia, atingindo a região-alvo onde se deseja que o fármaco seja infundido.

2.5 Paradigma de reconhecimento de objetos

Quando roedores são apresentados a objetos familiar e novo, eles despendem maior tempo explorando o objeto novo. Este comportamento típico tem sido utilizado em um paradigma comportamental conhecido como reconhecimento de objetos (Ennaceur e Delacour, 1988), o qual vem sendo amplamente utilizado para avaliar os mecanismos envolvidos na formação de memórias declarativas (Reed et al., 1999; Moses et al., 2005; Mandolesi et al., 2003).

O aparato para estudar reconhecimento de objetos consiste de um campo aberto retangular com 60cm de comprimento por 40cm de profundidade e 50cm de altura, o qual se encontra em uma sala com baixa luminosidade e isolada acusticamente. A parte frontal do campo aberto é construída de vidro para a melhor observação do animal. Antes de serem submetidos à tarefa de reconhecimento, animais passaram por um processo de habituação ao dispositivo experimental que durou 4 dias e consistiu de uma sessão comportamental diária de 20 minutos, na qual os animais foram colocados individualmente no campo aberto para que o explorassem livremente (Akirav e Maroun, 2006; Kelly et al., 2003).

Os objetos estímulo utilizados na tarefa de reconhecimento foram confeccionados em metal, vidro ou cerâmica. Nenhum dos objetos possuía significância comportamental para os animais experimentais, os quais não demonstraram preferência por algum deles durante estudos piloto realizados oportunamente. Cada objeto foi preso ao assoalho do campo aberto pela base. A

arena do campo aberto, assim como os objetos estímulo, foram limpos com uma solução de etanol a 70% entre a passagem de cada animal para garantir a ausência de pistas olfativas. A exploração foi definida como cheirar ou tocar os objetos de estímulo com o focinho ou as patas dianteiras. Sentar no objeto ou permanecer ao redor dele não foram considerados comportamentos exploratórios. O tempo gasto explorando cada objeto foi medido por um observador e foi expresso como porcentagem do tempo total de exploração (Figura 4).



FIGURA 4 - Fotografia de um animal sendo treinado na tarefa de reconhecimento de objetos.

2.5.1 Protocolo de Aquisição do paradigma de reconhecimento de objetos

No dia 1 (Sessão de treino), animais foram individualmente colocados no campo aberto, este contendo 2 objetos diferentes (A e B), sendo permitido explorá-los livremente durante 5 minutos.

O teste de retenção foi realizado 180 minutos (para analisar a memória de curta duração) ou 24 horas após a sessão de treino (para analisar a memória de longa duração). Nestas sessões, em teste de 5 minutos de duração, os animais foram individualmente re-introduzidos no campo aberto, onde um dos objetos apresentados durante o treino foi aleatoriamente substituído por um objeto novo (A e C).

Foi infundido bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal (0,8µl por lado) veículo (VEH; 0,1% DMSO em salina 0,9%) ou rapamicina (RAPA; 20pmol) em distintos tempos (0, 180, 360 ou 540 minutos) depois do treino (Figura 5).

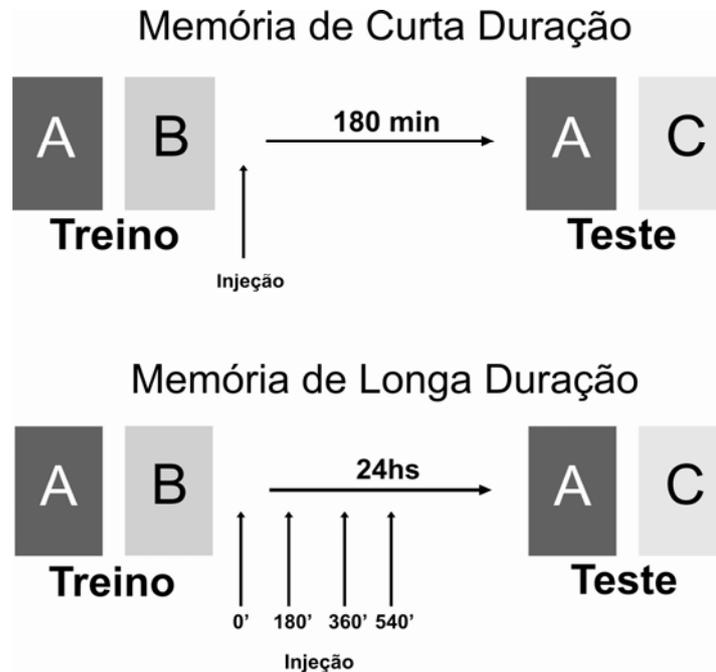


FIGURA 5 – Esquema ilustrativo dos protocolos de treino e teste no paradigma de reconhecimento de objetos.

2.5.2 Protocolo de reativação da memória de reconhecimento

No dia 1 (Sessão de treino), os animais foram expostos a dois objetos diferentes (A e B) por 5 minutos. Vinte quatro após os animais foram expostos aos mesmos dois objetos (A e B) por 5 minutos para reativar o traço mnemônico (Sessão de reativação). Foi infundido bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal (0,8µl por lado) veículo (VEH; 0,1% DMSO em salina 0,9%) ou rapamicina (RAPA; 20pmol) em distintos tempos (0, 180 ou 360 minutos) após a sessão de reativação. Após 24 horas (Sessão de teste), os animais foram re-introduzidos no campo aberto, onde um dos objetos apresentados durante o treino foi aleatoriamente substituído por um objeto novo (A e C), conforme ilustra a Figura 6.

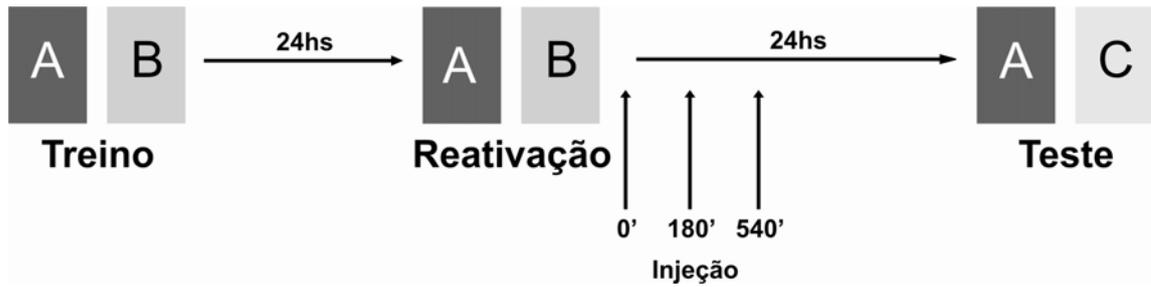
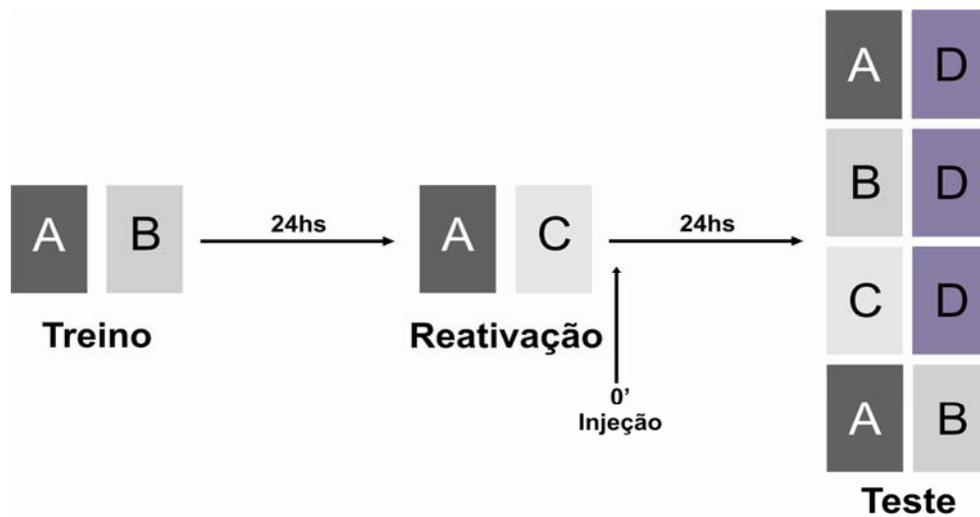


FIGURA 6 – Esquema ilustrativo do protocolo de reativação da memória de reconhecimento de objetos com objetos familiares.

2.5.3 Protocolo de reativação da memória de reconhecimento de objetos com estímulo novo

No dia 1 (Sessão de treino), os animais foram expostos a dois objetos diferentes (A e B) por 5 minutos. Vinte quatro após, os ratos foram expostos a um objeto familiar (A) e um objeto novo (C) por 5 minutos para reativar o traço mnemônico (Sessão de reativação). Foi infundido bilateralmente, na região CA1 do hipocampo dorsal (0,8µl por lado) veículo (VEH; 0,1% DMSO em salina 0,9%) ou rapamicina (RAPA; 20pmol), imediatamente após a sessão de reativação. Após 24 ou 120 horas (Sessão de teste), os animais foram divididos em 4 grupos e reintroduzidos no campo aberto na presença de diferentes combinações de objetos (Figura 7).



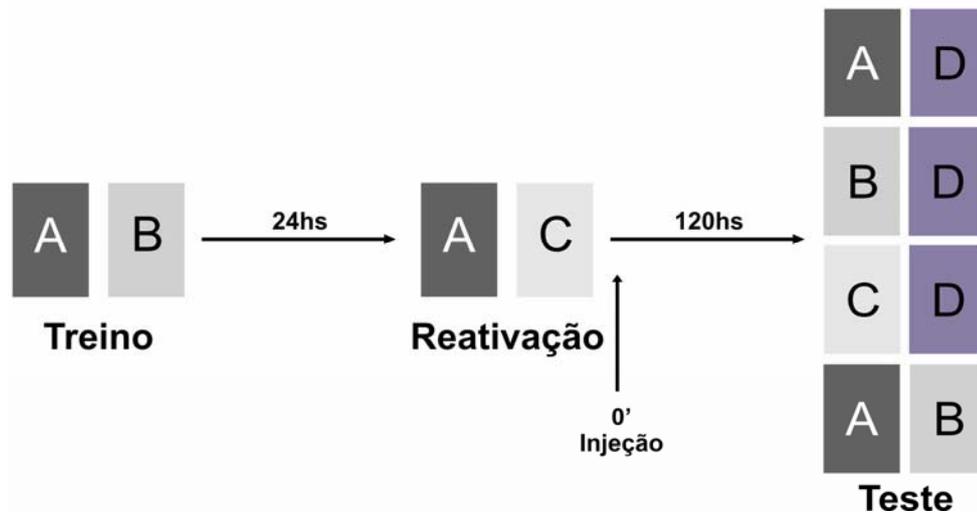


FIGURA 7 – Esquema ilustrativo dos protocolos de reativação da memória de reconhecimento de objetos com estímulo novo.

2.6 Campo Aberto

Para avaliar a atividade locomotora e o comportamento exploratório de animais, utilizou-se a tarefa denominada de campo aberto. O aparelho utilizado para esta tarefa consiste em uma caixa de madeira com dimensões de 60cm de comprimento por 40cm de profundidade e 50cm de altura com a sua parede frontal de vidro transparente (Figura 8). O assoalho da caixa foi dividido em 12 quadrantes iguais. Durante o experimento, o animal foi individualmente colocado no aparato para que o explorasse livremente por 5 minutos. Registrou-se o número de linhas cruzadas (em inglês *crossing*) e o número de elevações sobre as duas patas traseiras (em inglês *rearings*), comportamentos que nos roedores denotam atividade locomotora e exploratória, respectivamente (Bonini et al., 2006; Da Silva et al., 2006).

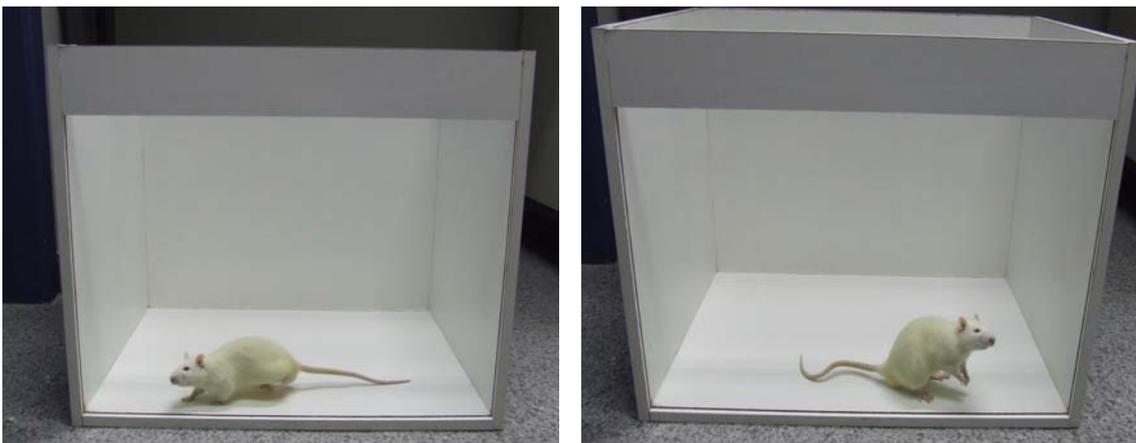


FIGURA 8 - Fotografia de um rato explorando o campo aberto.

2.7 Labirinto em Cruz Elevado

Para avaliar o estado de ansiedade dos animais utilizou-se a tarefa do labirinto em cruz elevado. O aparato consiste em uma plataforma em cruz com 40cm de comprimento em cada braço, posicionada a 1m de altura do chão. Dois braços contralaterais do labirinto possuem paredes elevadas, sendo denominados fechados, e os outros dois não possuem paredes, sendo denominados abertos (Figura 9). Os animais foram individualmente colocados no centro do labirinto e deixados para explorá-lo por 5 minutos. Registrou-se o tempo de permanência e o número de entradas nos braços abertos e fechados. Quanto mais ansioso estiver o animal, maior o tempo de permanência nos braços fechados e o número de entradas nestes braços (Bevilaqua et al., 2003; Kerr et al., 2005; Da Silva et al., 2006).



FIGURA 9 - Fotografia de um rato sendo submetido à tarefa de Labirinto em Cruz Elevado.

2.8 Labirinto Aquático de Morris – LAM

O LAM foi desenvolvido há quase 20 anos por Richard G. Morris (1986) como um instrumento para investigar aprendizado espacial em roedores. A relativa simplicidade do LAM é, indubitavelmente, umas das razões para seu sucesso. Esta tarefa está baseada em uma capacidade universal, a utilização de dicas ambientais para encontrar um alvo que, ao permitir o escape de uma situação desprazerosa, atua como reforço positivo. O LAM é o modelo comportamental mais amplamente

usado para analisar a participação do hipocampo no processamento de informação espacial.

O LAM utilizado para este estudo encontra-se em uma sala ampla, bem iluminada (iluminação indireta) e sem janelas, a qual foi especialmente construída nas instalações do Centro de Memória do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS. O labirinto consiste de uma piscina circular feita de concreto rebocado e impermeabilizado pintada da cor preta (com 2m de diâmetro e 0,6m de altura). A piscina está dividida em 4 quadrantes imaginários idênticos (Figura 10). Submersa a 2cm da água (mantida entre 21–23°C durante todo o experimento), oculta da vista do sujeito experimental, encontra-se uma plataforma de escape de 12cm de diâmetro. A superfície da plataforma é abrasiva para permitir que o animal suba nela assim que a detectar. O LAM está rodeado de numerosos elementos claramente visíveis, de cores e formas contrastantes, comportamentalmente neutros (figuras, desenhos geométricos e abstratos, etc.), pendurados nas paredes da sala. Estes elementos servem como dicas de localização espacial e sua posição pode ser mudada à vontade do experimentador (Figura 10).

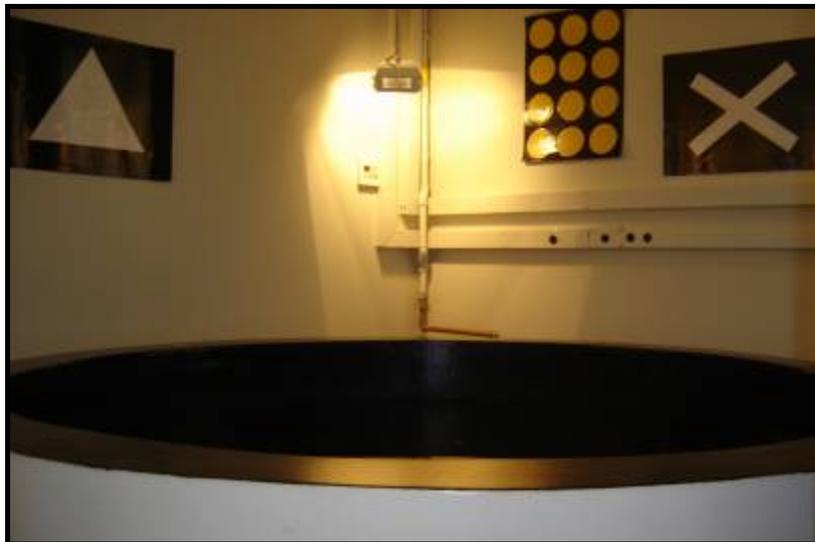


FIGURA 10 - Vista geral da sala do LAM do Centro de Memória do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS.

Foi infundido, bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal (0,8µl por lado), veículo (VEH; 0,1% DMSO em salina 0,9%) ou rapamicina (RAPA; 20pmol) 24 horas antes da primeira sessão de treinamento ao LAM.

2.9 Protocolo de aprendizado do Labirinto Aquático de Morris

A sessão de treinamento do LAM consistiu de 1 sessão diária de 8 largadas durante 5 dias. A plataforma de escape foi mantida na mesma posição durante os 5 dias de treino. Cada uma das 8 largadas diárias foi iniciada de uma posição distinta da piscina de acordo com um padrão pseudo-aleatório gerado por um sistema computadorizado desenvolvido no Centro de Memória da PUCRS. A duração máxima da largada foi de 60 segundos e, se o animal não encontrasse a plataforma neste período, foi conduzido até ela pelo experimentador, permanecendo sobre a mesma durante 30 segundos. A retenção da memória no LAM foi avaliada em um teste de retenção de 60 segundos, com ausência da plataforma de escape, realizado 24 horas após o último dia de treino. O tempo que o animal permaneceu nadando no quadrante alvo (QA, quadrante onde a plataforma de escape esteve localizada durante o treino) foi utilizado como o principal indicador de retenção da memória espacial (Figura 11).

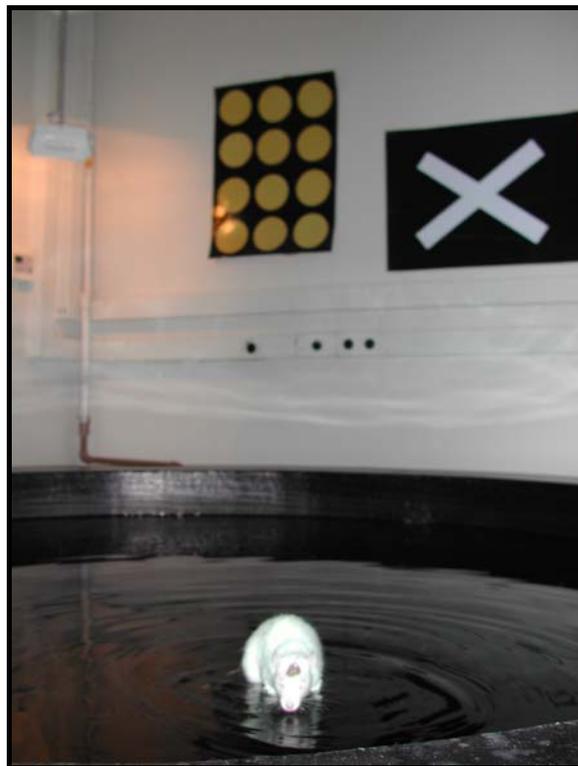


FIGURA 11 - Fotografia de um rato sobre a plataforma de escape no LAM.

2.10 Esquiva Inibitória

O aparelho utilizado para o treino na tarefa de esquiva inibitória de uma única sessão consiste em uma caixa de madeira de 50,0 x 25,0 x 25,0cm, com a parte

frontal de acrílico. O assoalho do aparelho é formado por barras de bronze paralelas. No lado esquerdo da caixa, há uma plataforma de 5,0cm de altura por 8,0cm de largura (Figura 12). Os animais receberam infusão bilateral, na região CA1 do hipocampo dorsal (0,8 μ l por lado), de veículo (VEH; 0,1% DMSO em salina 0,9%) ou rapamicina (RAPA; 20pmol) 24 horas antes da sessão de treinamento da tarefa de esquiva inibitória.

Os animais foram inicialmente submetidos a uma sessão de treinamento individual, na qual foram colocados sobre a plataforma, na lateral esquerda do aparato, para que explorassem a mesma. Quando desciam da plataforma com as quatro patas sobre as barras de bronze eletrificáveis, recebiam um choque elétrico de 0,5mA por 2 segundos (Camarota et al., 2003). Posteriormente foram retirados e colocados novamente na caixa moradia.

Para avaliar a retenção da memória de longa duração na tarefa de esquiva inibitória, os animais foram submetidos a uma sessão de teste comportamental 24 horas após o treino. O procedimento utilizado na sessão de teste foi idêntico àquele empregado na sessão de treino, exceto que, ao descer da plataforma, o animal não recebia choque. Para as sessões de teste e treino foram adotados tempos máximos de descida, sendo 20 segundos para a sessão de treino e 180 segundos para a sessão de teste, após os quais os animais eram devolvidos à sua caixa moradia. Aqueles animais que, durante a sessão de treino, não desceram da plataforma antes de transcorridos 20 segundos foram eliminados do estudo.



FIGURA 12 - Fotografia da caixa de Esquiva Inibitória.

2.11 Controle histológico da região estudada

Após o término dos experimentos comportamentais os animais previamente operados foram avaliados histologicamente, quanto a colocação de suas cânulas e a região cerebral atingida pela infusão, visando garantir que apenas os dados comportamentais de animais que efetivamente receberam a administração correta dos fármacos fossem incluídos na análise estatística final.

Para isso, após os procedimentos comportamentais os animais foram submetidos à infusão bilateral de uma solução de azul de metileno a 4% através das cânulas; quinze minutos depois, foram sacrificados e seus cérebros removidos e colocados em uma solução de formol 4% por um período de 4 dias, quando então se procedeu a análise histológica, considerando-se somente os animais com a localização dentro de 2mm² do local desejado (Figura 13).

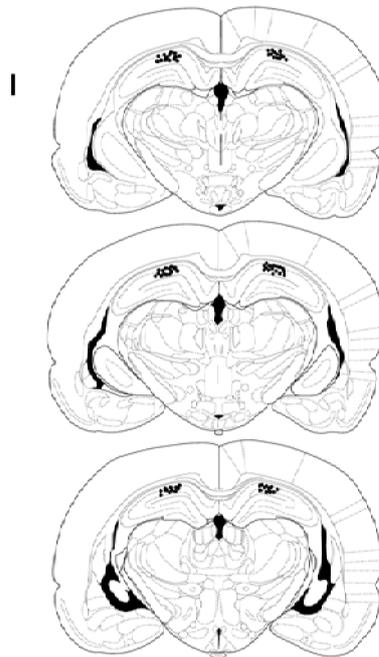


FIGURA 13 - Desenho do cérebro de rato adquirido do Atlas de Paxinos e Watson, 1986, mostrando a localização da implantação das cânulas de infusão na região CA1 do hipocampo dorsal.

2.12 Análise Estatística dos Dados

A análise foi realizada em um computador Pentium IV 2.8 GHz utilizando os *softwares* Graph-Pad Prisma 4.1 e Microsoft Office Excel. Para a análise dos dados

da tarefa de reconhecimento de objetos e para aqueles obtidos no LAM, no campo aberto e no labirinto em cruz foram utilizados testes de estatística paramétrica (ANOVA de uma ou duas vias, seguidas do contraste adequado ou teste *t* de Student). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão e, no caso dos gráficos referentes à tarefa de reconhecimento de objetos, foram representados como porcentagem do tempo total de exploração de cada objeto naquela sessão de treino ou teste. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

Os dados obtidos na tarefa de esquiva inibitória foram analisados mediante estatística não paramétrica (teste de *Mann-Whitney* seguido do teste de *Dunn*) já que a variável em estudo (a latência de descida da plataforma) não segue uma distribuição normal nem cumpre com o requerimento de homocedasia (igualdade das variâncias).

3 RESULTADOS

Com o objetivo de verificar se a ativação da proteína cinase mTOR é necessária na região CA1 do hipocampo dorsal para o processo de consolidação da memória de reconhecimento de objetos, ratos foram treinados na tarefa de reconhecimento de objetos. No dia 1 (Sessão de treino) os animais foram expostos a dois objetos distintos (A e B) por 5 minutos e, imediatamente, 180, 360 ou 540 minutos após a sessão de treino, foram infundidos com veículo ou RAPA (20pmol/0,8µl/lado) na região CA1 do hipocampo dorsal. A retenção da memória de longa duração foi avaliada 24 horas após a sessão de treino (Sessão de teste, Dia 2). Durante a sessão de teste os animais foram expostos por 5 minutos ao objeto familiar A, juntamente com o objeto novo C, independentemente do tempo transcorrido entre a finalização da sessão de treino e o momento da infusão. Os animais que receberam infusão bilateral de RAPA na região CA1 do hipocampo, imediatamente, 180 ou 360, mas não 540 minutos após a sessão de treino, passaram a mesma quantidade de tempo explorando o objeto familiar e o objeto novo durante a sessão de teste (Figura14), enquanto os animais que receberam infusão de RAPA 540 minutos depois da sessão de treino passaram mais tempo explorando o objeto novo que o familiar, comportamento este, parecido ao do grupo controle, sugerindo que a atividade da mTOR na região CA1 do hipocampo dorsal é necessária durante uma restrita janela temporal pós-treino para a consolidação da memória de reconhecimento de objetos.

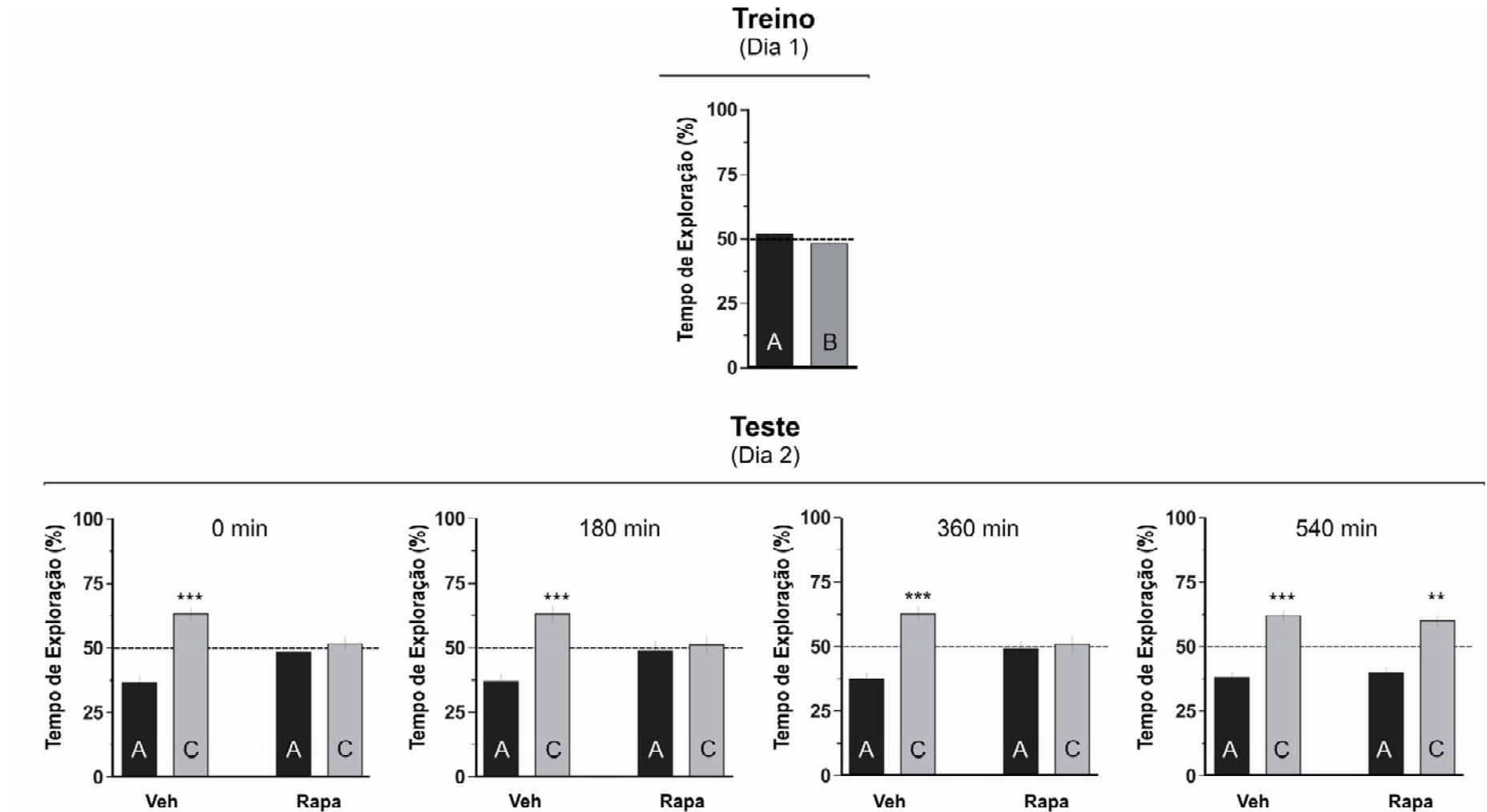


FIGURA 14 - Atividade da mTOR no hipocampo dorsal é requerida durante uma restrita janela temporal após o treino para a consolidação da memória de reconhecimento de objetos. No dia 1 (Sessão de treino) os ratos foram expostos a dois diferentes objetos (A e B) por 5 minutos, imediatamente, 180, 360 ou 540 depois receberam infusão bilateral (0,8 µl/lado) de veículo (0,1% de DMSO em salina; Veh) ou rapamicina (20 pmol/lado; Rapa) na região CA1 do hipocampo dorsal. No dia 2 (Sessão de teste) os animais foram expostos a um objeto familiar (A) e um objeto novo (C) por 5 minutos. Os dados (média ± erro padrão) são expressos como porcentagem do tempo total de exploração. *** $p < 0,01$ e ** $p < 0,05$ no teste t de Student para amostra única, valor de referência = 50 (n=13 por grupo).

Com o objetivo de verificar se o efeito amnésico da RAPA deve-se efetivamente à inibição da consolidação da memória de longa duração de reconhecimento de objetos ou, pelo contrário, deve-se simplesmente a um efeito inibitório sobre a capacidade de expressão do traço, os animais foram expostos a dois objetos diferentes (A e B) por 5 minutos (Sessão de treino, Dia 1) e, imediatamente depois, foram infundidos com veículo ou RAPA (20pmol/0,8µl/lado). Passadas 3 horas da sessão de treino (Sessão de teste, Dia 2), os animais foram expostos ao objeto familiar A, juntamente com um objeto novo (C). Como se pode observar na Figura 15, tanto os animais controle quanto os tratados com RAPA mostraram preferência pelo objeto novo durante a sessão de teste, indicando que a inibição da proteína cinase mTOR no hipocampo imediatamente após a sessão de treino não afeta a retenção da memória de curta duração para a tarefa de reconhecimento de objetos, sugerindo que o efeito amnésico demonstrado para a memória de longa duração se deve efetivamente ao bloqueio do processo de consolidação.

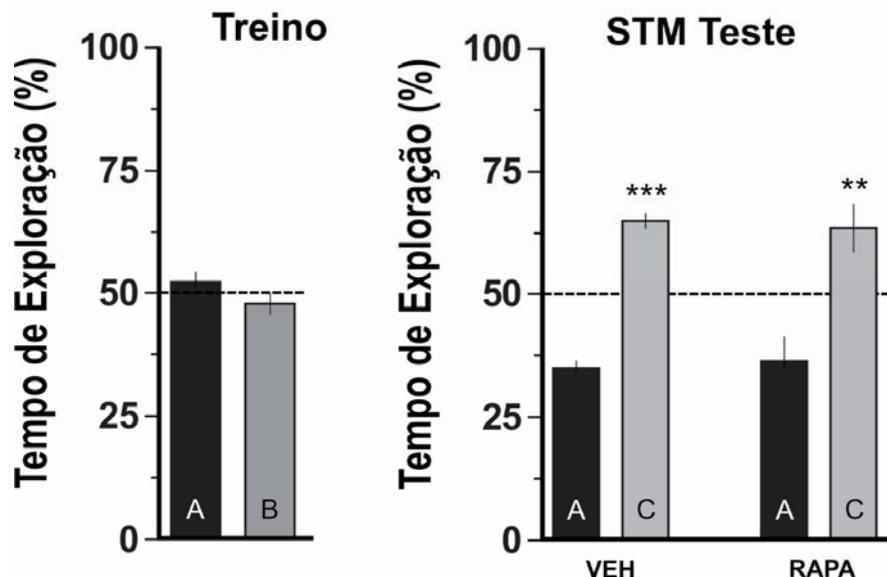


FIGURA 15 - Inibição pós-treino da mTOR no hipocampo não afeta a memória de curta duração para a tarefa de reconhecimento de objetos. No Dia 1 (Sessão de treino), os ratos foram expostos a dois objetos distintos (A e B) por 5 min e, imediatamente após, receberam infusão bilateral (0,8 µl/lado) de veículo (0,1% DMSO em salina; VEH), ou rapamicina (20 pmol/lado; Rapa) na região CA1 do hipocampo dorsal. Três horas depois da sessão de treino, os animais foram expostos a um objeto familiar (A) e um objeto novo (C) por 5 minutos (Sessão de Teste). Os dados (média ± erro padrão) são expressos como porcentagem do tempo total de exploração. *** $p < 0,01$ e ** $p < 0,05$ em teste t de Student para amostra única, valor de referência =50 (n=8 por grupo).

Para verificar se a infusão de RAPA na região CA1 do hipocampo exerce alguma ação no estado de ansiedade ou na atividade locomotora e exploratória dos

animais, que pudesse mascarar a evocação da memória de longa duração na tarefa de reconhecimento de objetos, os ratos foram infundidos com veículo ou RAPA (20pmol/0,8µl/lado) na região CA1 do hipocampo dorsal, 24 horas antes de serem submetidos a uma sessão comportamental nas tarefas de Labirinto em Cruz Elevado e Campo Aberto. Como pode ser observado na Tabela 1 o inibidor da mTOR não causou alterações no número total de entradas, no número total de entradas nos braços abertos ou na porcentagem de tempo de permanência nos braços abertos durante uma sessão de 5 minutos no Labirinto em Cruz Elevado. Da mesma forma, a infusão da RAPA intra-hipocampal não afetou o número total de cruzamentos e de elevações em uma sessão de exploração livre com duração de 5 minutos no Campo Aberto (Tabela 1). Esses resultados indicam que, quando infundida no hipocampo 24 horas antes da avaliação comportamental, a RAPA não modifica o estado de ansiedade nem a atividade locomotora e exploratória dos animais.

TABELA 1 Infusão de rapamicina na região CA1 do hipocampo dorsal não afeta o estado de ansiedade nem a atividade locomotora e exploratória.

	VEH	RAPA
Total de Entradas	23,4 ± 2,1	20,3 ± 1,9
Entrada nos braços abertos	10,2 ± 1,1	9,0 ± 1,0
Tempo nos braços abertos (%)	27,6 ± 3,9	29,8 ± 5,2
Cruzamentos	68,3 ± 6,6	64,3 ± 8,5
Elevações	28,2 ± 3,4	27,8 ± 3,3

Foi infundido, bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal, veículo (0,1% DMSO em salina; VEH) ou Rapamicina (20pmol/0,8µl/lado; Rapa), 24 horas antes de uma sessão comportamental de Labirinto em Cruz Elevado ou Campo Aberto. Os dados estão expressos como média (± erro padrão) do número total de entradas, número de entradas nos braços abertos e porcentagem de tempo nos braços abertos (Labirinto em Cruz; n=10 por grupo) e número de total de cruzamentos e elevações (Campo Aberto; n=10 por grupo). Um grupo distinto de animais foi utilizado para cada paradigma comportamental.

Para garantir que o efeito amnésico causado pela RAPA não se deve a um dano na funcionalidade hipocampal, esta foi infundida (20pmol/0,8µl/lado) na região CA1 do hipocampo dorsal 24 horas antes da primeira sessão de treino na tarefa do Labirinto Aquático de Morris (versão espacial). Os animais adquiriram (Figura 16a) e evocaram (Figura 16b) uma preferência espacial equivalente ao grupo controle. Do mesmo modo, quando treinados em uma tarefa de esquiva inibitória de sessão única, os animais que receberam RAPA intra-hipocampal 24 horas antes do treino aprenderam a resposta condicionada aversiva equivalente ao grupo controle (Figura 16c).

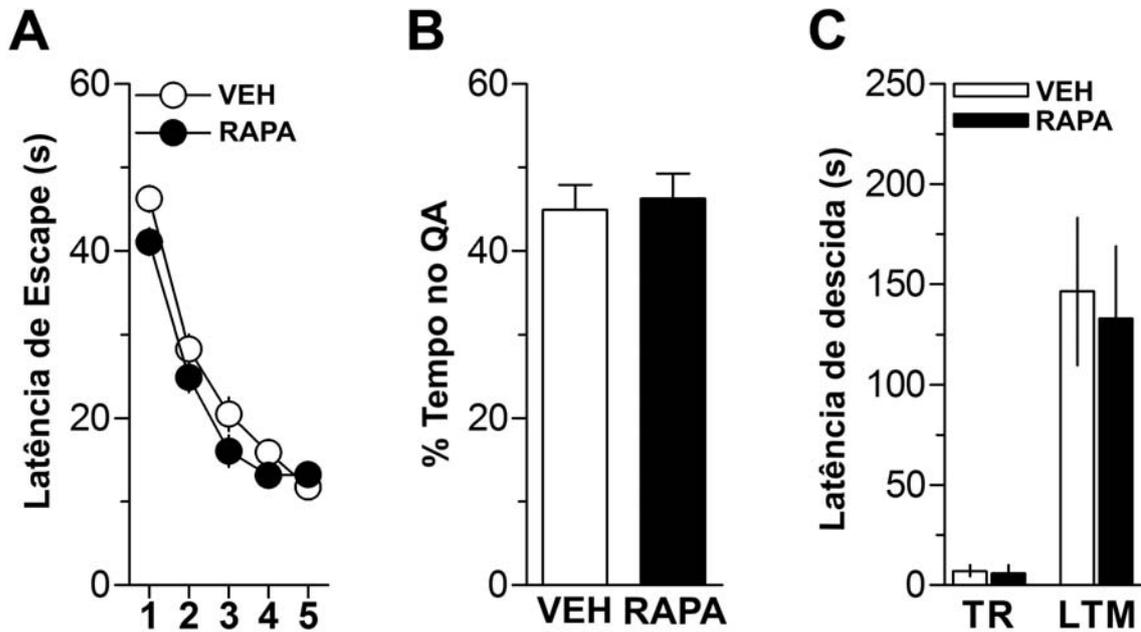


FIGURA 16 - A inibição da mTOR hipocampal 24 horas antes do treino não afeta a aquisição nem a retenção de memórias dependentes do hipocampo. A) Média das latências de escape durante os cinco dias de aquisição do aprendizado espacial para ratos que receberam veículo (0,1% de DMSO em salina; VEH; círculos brancos) ou rapamicina (20pmol/lado; Rapa; círculos pretos) na região CA1 do hipocampo dorsal 24 horas antes da primeira sessão de treino. Os dados estão apresentados como a média (\pm erro padrão) por bloco de 8 largadas; $n=8$ por grupo. B) Porcentagem do tempo total gasto no quadrante alvo (QA) durante um teste de 60s realizado 24 horas após o 5º dia de treino para os animais mostrados na FIG A. Os dados estão apresentados como a média (\pm erro padrão). $**p<0,05$ no teste t de Student para uma amostra (valor de referência=25%). C) Ratos com cânulas implantadas na região CA1 do hipocampo dorsal receberam infusão bilateral de veículo (0,1% de DMSO em salina; VEH) ou rapamicina (20pmol/lado; Rapa) na região CA1 do hipocampo dorsal e, 24 horas depois, foram treinados na tarefa da esquiwa inibitória de sessão única ($n=9$ por grupo). Os dados estão apresentados como mediana \pm intervalo interquartil da latência de descida durante a sessão de treino (TR) ou a sessão de teste da memória de longa duração (LTM) realizada 24 horas após o treino. Teste U de *Mann-Whitney*.

Muitas memórias tornam-se susceptíveis a interrupções farmacológicas quando reativadas. Acredita-se que a evocação inicia um processo dependente de síntese protéica denominada de reconsolidação, que pode operar para re-estabilizar o traço mnemônico evocado (Nader et al., 2000b; Przybyslawski et al., 1999; Przybyslawski e Sara, 1997; Sara, 2000; Kida et al., 2002) e/ou para permitir a incorporação de novas informações ao traço original (Rossato et al., 2006). Existem indícios de que a evocação da memória de reconhecimento de objetos induz um evento como reconsolidação (Kelly et al., 2003), requerendo síntese protéica em diferentes áreas do cérebro, particularmente no córtex pré-frontal ventro-medial (Akirav e Moroun, 2006) e no hipocampo (Rossato et al., 2007). No entanto, o papel desempenhado por essas duas áreas do cérebro durante o processo de reconsolidação da memória de reconhecimento de objetos, parece que são diferentes. A inibição de síntese protéica no córtex pré-frontal ventro-medial, após a evocação, causa amnésia quando a memória original é totalmente reativada (Akirov e Maroun, 2006), enquanto o hipocampo pode se tornar engajado na reconsolidação

quando ocorre evocação e ao mesmo tempo aquisição de novas informações (Rossato et al., 2007). Para analisar esta última afirmação e averiguar se a inibição da proteína cinase mTOR hipocampal, após a evocação, tem algum efeito sobre a persistência da memória de reconhecimento de objetos, ratos foram expostos a dois objetos diferentes (A e B) por 5 minutos (Sessão de treino; Dia 1). No dia 2 (Sessão de reativação) os animais foram re-expostos aos mesmos dois objetos por 5 minutos, com o intuito de reativar o traço da memória de reconhecimento. Imediatamente, 180 ou 540 minutos depois, os animais foram infundidos bilateralmente com veículo ou RAPA (20pmol/0,8µl/lado) na região CA1 do hipocampo dorsal. Se a atividade da mTOR no hipocampo for necessária para a reconsolidação da memória de reconhecimento sob estas condições, quando fosse feita a combinação de um objeto familiar com um objeto novo um dia após a reativação (Sessão de teste), os animais que recebessem RAPA (20pmol/lado) ao final da sessão de reativação não mostrariam nenhuma preferência por qualquer objeto e explorariam ambos igualmente. No entanto, como se pode observar na Figura 17, quando confrontados com um objeto familiar e um objeto novo 24 horas depois da sessão de reativação, os animais tratados com veículo ou RAPA exploraram preferencialmente o objeto novo, indicando que a inibição pós-reativação de mTOR não tem efeito sobre a memória para um objeto familiar. Nota-se que os animais passam mais tempo explorando o objeto novo que o familiar sem importar o tratamento recebido, indicando que a memória foi preservada.

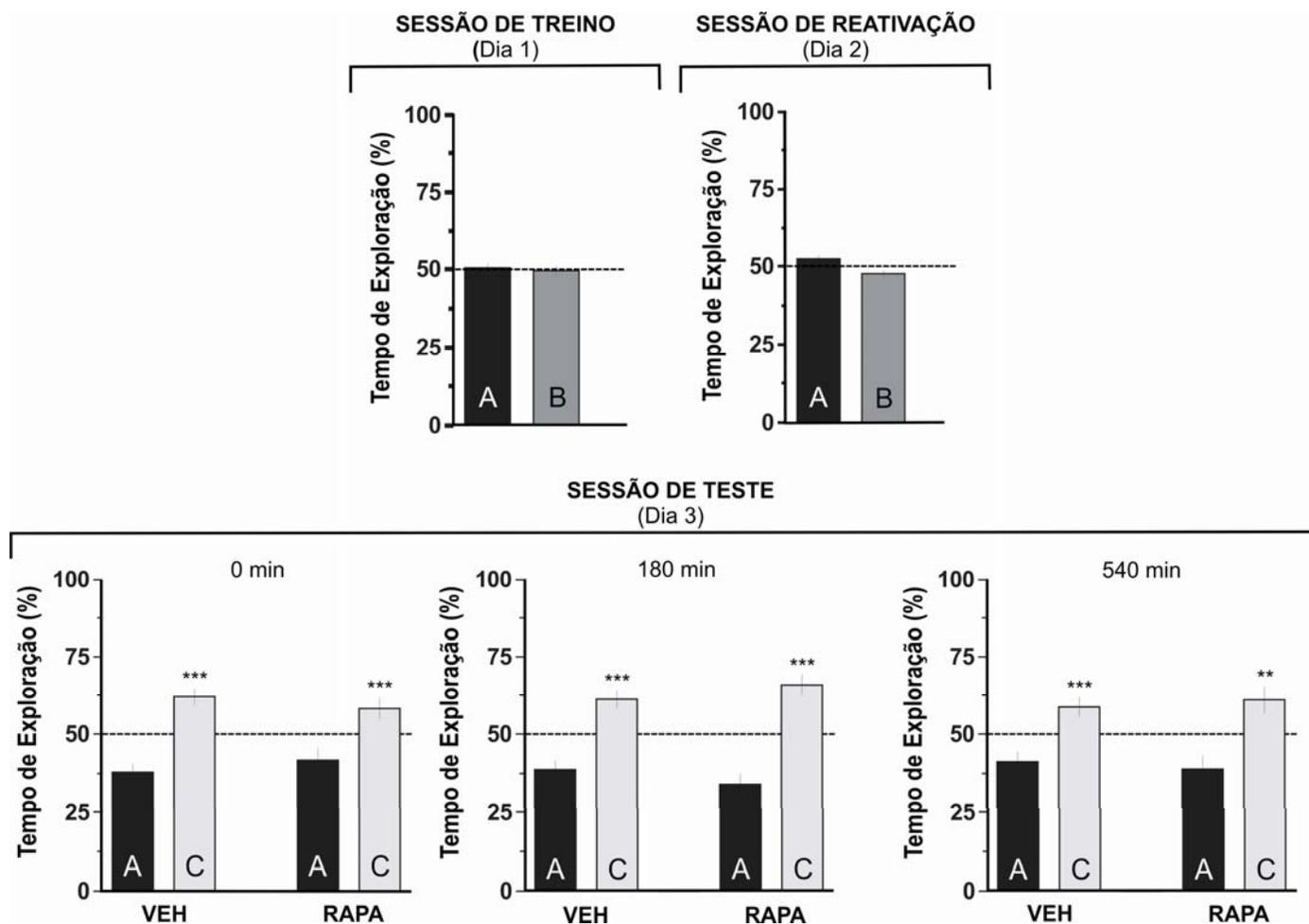


FIGURA 17 – Inibição hipocampal de mTOR após uma sessão de reativação envolvendo exposição a objetos familiares não afeta a posterior retenção da memória de reconhecimento de longa duração. Ratos com cânulas implantadas na região CA1 do hipocampo dorsal foram expostos a dois objetos distintos (A e B) por 5 minutos (Sessão de treino; Dia 1). Após 24 horas os animais foram re-expostos por 5 minutos aos mesmos dois objetos para reativação do traço mnemônico (Sessão de reativação; Dia 2) e, imediatamente, 180 ou 540 minutos depois, receberam uma infusão bilateral de veículo (0,1% de DMSO em salina; VEH) ou rapamicina (20 pmol/0,8µl/lado; Rapa) na região CA1 do hipocampo dorsal. A retenção da memória foi avaliada 24 horas depois mediante exposição dos animais ao objeto familiar A juntamente com um objeto novo C (Sessão de teste, Dia 3). Os dados (média ± erro padrão) são expressos como porcentagem do tempo total de exploração. *** $p < 0,01$ e ** $p < 0,05$ em teste t de Student para amostra única, valor de referência = 50 (n=10 por grupo).

Uma vez que nenhum efeito foi observado na administração intra-hipocampal de RAPA (20pmol/lado) no processo de reconsolidação do traço mnemônico quando este foi reativado na presença dos mesmos objetos estímulo e, sabendo que a possível função biológica do processo de reconsolidação não estaria restrita a estabilização do traço reativado, mas também envolvida na integração de novas informações às memórias já consolidadas (Rodriguez-Ortiz et al., 2005; Rossato et al., 2006; Rossato et al., 2007), procurou-se verificar se a inibição hipocampal da mTOR afeta a retenção da memória quando a reativação ocorre junto com a adição de novas informações ao traço consolidado. Para isso, ratos foram expostos a dois objetos diferentes (A e B) por 5 minutos (Sessão de treino; Dia1); 24 horas depois foram expostos por 5 minutos (Sessão de reativação; Dia 2) a um dos objetos que havia sido apresentado durante a sessão de treino (A) e um objeto novo (C), imediatamente depois os animais foram infundidos bilateralmente com veículo ou RAPA (20pmol/0,8µl/lado) na região CA1 do hipocampo dorsal, sendo posteriormente divididos randomicamente em quatro grupos experimentais. A retenção da memória foi testada 24 horas depois (Figura 18). Durante a sessão de teste, o grupo 1 foi exposto ao objeto A e o objeto novo D; o grupo 2 foi exposto aos objetos B e D; o grupo 3 aos objetos C e D e o grupo 4 foi exposto novamente aos objetos A e B. Os animais que recebem veículo intra-hipocampal após a reativação da memória exploraram igualmente os objetos A e B e passam mais tempo na sessão de teste explorando o objeto novo (D) que os outros objetos, mostrando que eles lembram do objeto A e do objeto B que foram apresentados no dia 1 (Sessão de treino), e adquirem a memória do objeto C apresentado durante a sessão de reativação no dia 2. No entanto, como pode ser observado na Figura 18, os animais que receberam RAPA imediatamente após a sessão de reativação passam a mesma quantidade de tempo explorando os objetos A e D e os objetos C e D, sugerindo que a infusão de RAPA na região CA1 do hipocampo dorsal, prejudica a retenção da memória do objeto A e bloqueia a formação da memória do objeto C. A memória para o objeto B, que não havia sido apresentado durante a sessão de reativação, não foi afetada pela infusão de RAPA, pois quando apresentado juntamente com o objeto novo D os animais passaram mais tempo explorando o objeto novo (Figura 18), indicando que a amnésia produzida por esta droga não é devido a uma ação inespecífica na performance da tarefa de reconhecimento de objetos ou durante o

processo de evocação, mas sim a um verdadeiro e duradouro prejuízo na retenção da memória para os objetos apresentados durante a sessão de reativação.

Para analisar se a amnésia induzida pela infusão intra-hipocampal de RAPA (20pmol/0,8µl/lado) foi temporária, os animais foram submetidos a uma sessão de treino (Dia 1); 24 horas depois foram submetidos a uma sessão de reativação (Dia 2) na presença de um objeto familiar e um objeto novo; e 120 horas depois passaram por uma sessão de teste (Dia 7). Como mostrado na Figura 19 o tempo transcorrido entre a sessão de reativação e a de teste não tem efeito sobre a amnésia provocada pela administração de RAPA após a sessão de reativação, sugerindo que este efeito não é revertido com o passar do tempo.

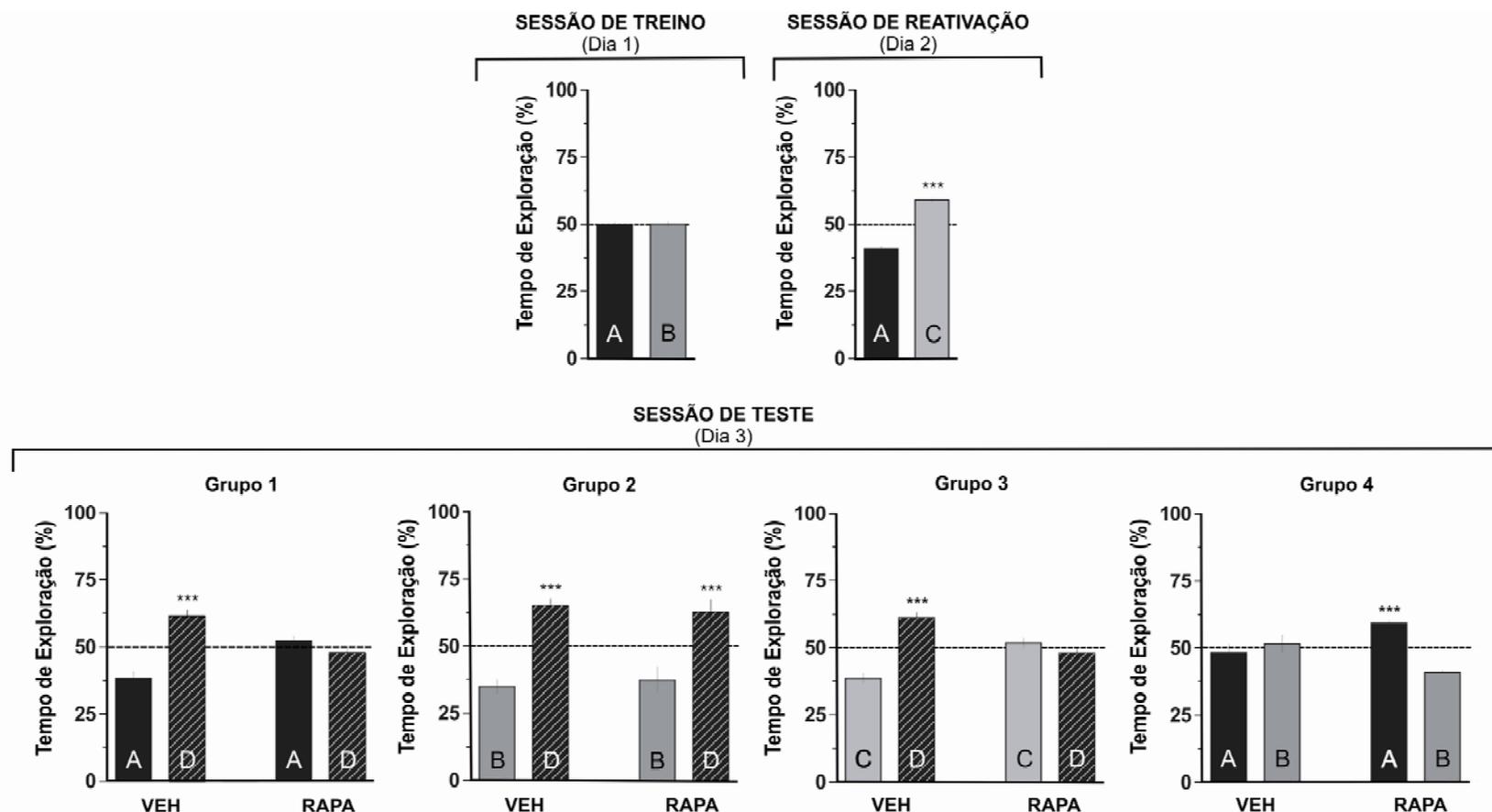


FIGURA 18 - Inibição da mTOR hipocampal depois da reativação da memória na presença de um objeto familiar e um objeto novo prejudica a memória desses objetos sem afetar a memória do outro objeto familiar não apresentado durante a sessão de reativação. Ratos com cânulas implantadas na região CA1 do hipocampo dorsal foram expostos a dois objetos distintos (A e B) por 5 minutos (Sessão de treino; Dia 1). Após 24 horas os animais foram re-expostos ao objeto A juntamente com o objeto novo C (Sessão de reativação; Dia 2). Após a sessão de reativação os ratos foram randomicamente divididos em quatro grupos e receberam, imediatamente após, uma infusão bilateral de veículo (0,1% de DMSO em salina; VEH) ou rapamicina (20pmol/0,8µl/lado; RAPA) na região CA1. Após 24 horas da sessão de reativação os animais foram submetidos a um teste de 5 minutos de duração (Sessão de teste; Dia 3) na presença de diferentes combinações de objetos como descrito a seguir: Grupo 1= Objeto A + Objeto D; Grupo 2= Objeto B + Objeto D; Grupo 3= Objeto C + Objeto D, Grupo 4= Objeto A + Objeto B onde o objeto D era o novo. Nota-se que RAPA prejudica a retenção da memória para o objeto novo C e também para o objeto familiar A (que foram apresentados durante a sessão de reativação), mas não prejudica a memória para o objeto familiar B, que não foi apresentado aos animais durante a reativação. Os dados (média ± erro padrão) são expressos como porcentagem do tempo total de exploração. *** $p < 0,01$ em teste t de Student para amostra única, valor de referência =50 (n=12 por grupo).

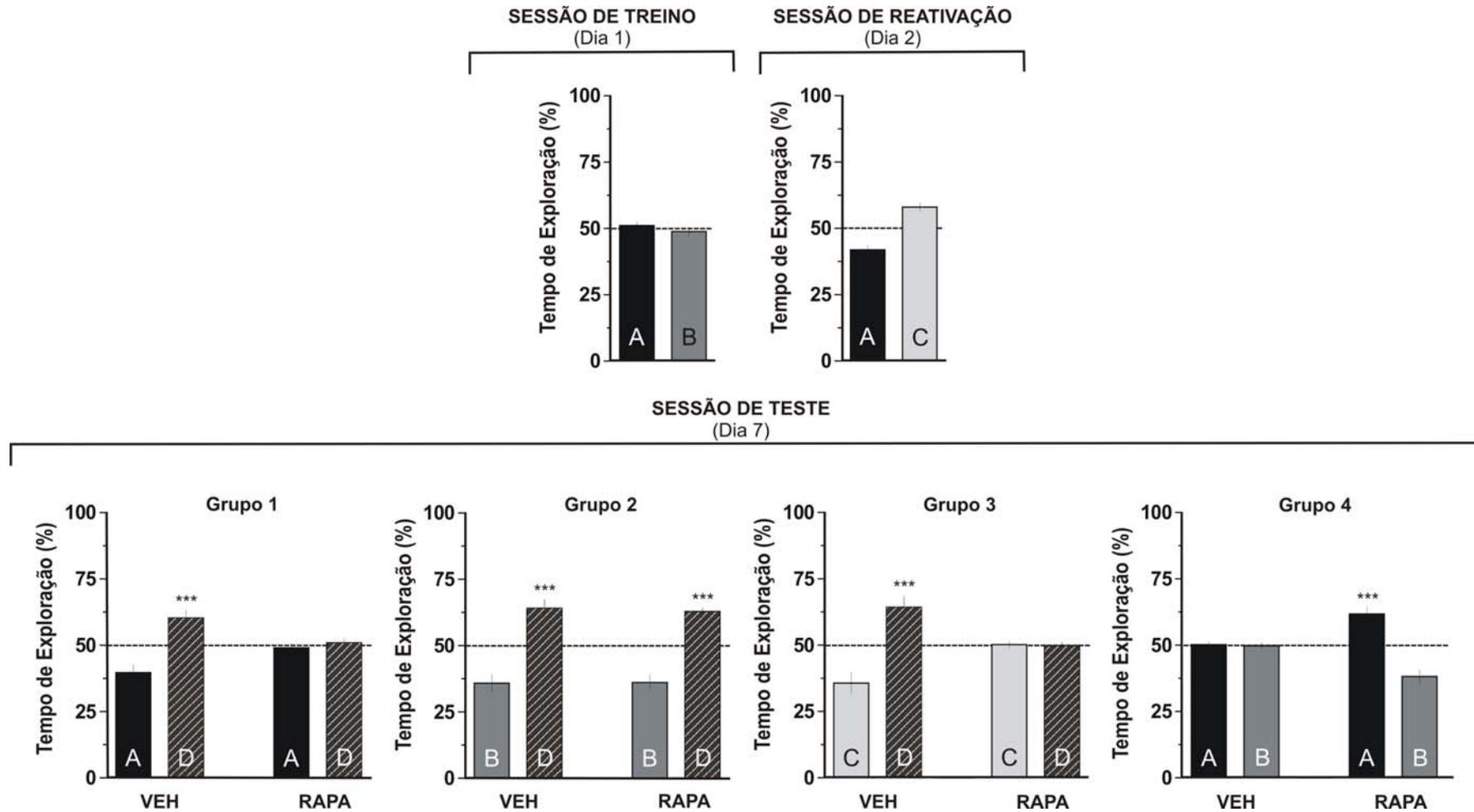


FIGURA 19 - O efeito amnésico produzido pela inibição hipocampal de mTOR depois da sessão de reativação da memória na presença de um objeto familiar e um objeto novo. Ratos com cânulas implantadas na região CA1 do hipocampo dorsal foram expostos a dois objetos diferentes (A e B) por 5 minutos (Sessão de treino; Dia1). Após 24 horas (Sessão de reativação; Dia 2) os animais foram expostos a um objeto familiar (A) e a um objeto novo (C). Imediatamente após a sessão de reativação os ratos foram randomicamente divididos em quatro grupos e receberam infusão bilateral de veículo (0,1% de DMSO em salina; VEH) ou rapamicina (20pmol/lado; RAPA) na região CA1 do hipocampo dorsal. Após 120 horas os animais foram submetidos a uma sessão de teste de 5 minutos de duração (Sessão de teste; Dia 7) na presença de diferentes combinações de objetos como descrito a seguir: Grupo 1= Objeto A + Objeto D; Grupo 2= Objeto B + Objeto D; Grupo 3= Objeto C + Objeto D e Grupo 4= Objeto A + Objeto B, onde o objeto D era o novo. Nota-se que RAPA prejudica a retenção da memória para o objeto novo C e também para o objeto familiar A (que foi apresentado durante a sessão de reativação), mas não prejudica a memória do objeto familiar B, ao qual os animais não foram expostos durante a sessão de reativação. Os dados (média ± erro padrão) são expressos como porcentagem do tempo total de exploração. *** $p < 0,01$ em teste t de Student para amostra única, valor de referência =50 (n=12 por grupo).

Com o objetivo de verificar se a mTOR é necessária para retenção da memória de reconhecimento de objetos 24 horas depois da sessão de treino, na ausência de qualquer estímulo comportamental específico, os animais foram expostos a dois objetos distintos (A e B) por 5 minutos (Sessão de treino; Dia 1). Após 24 horas (Dia 2) os animais foram randomicamente divididos em três grupos diferentes que receberam infusão bilateral de veículo ou RAPA (20pmol/lado) na região CA1 do hipocampo dorsal e retornaram às suas caixas moradia sem receber qualquer estímulo específico. Passadas 24 horas (Sessão de teste; Dia 3), o grupo 1 foi exposto aos objetos A e D; o grupo 2 aos objetos B e D; e o grupo 3 aos objetos C e D, por 5 minutos, sendo que o objeto D era o novo. Como se pode observar na Figura 20 os animais que receberam infusão intra-hipocampal de veículo ou RAPA passam mais tempo explorando o objeto novo D que o objeto familiar A e passaram à mesma quantidade de tempo explorando os objetos novos C e D, mostrando que a RAPA não tem efeito na retenção da memória quando administrada 24 horas após a sessão de treino na ausência de qualquer evento comportamental relevante.



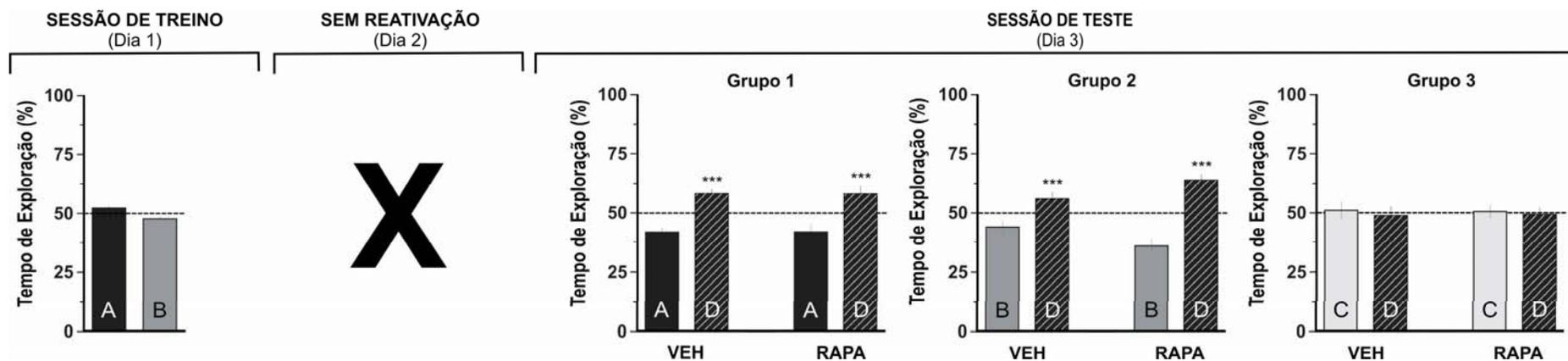
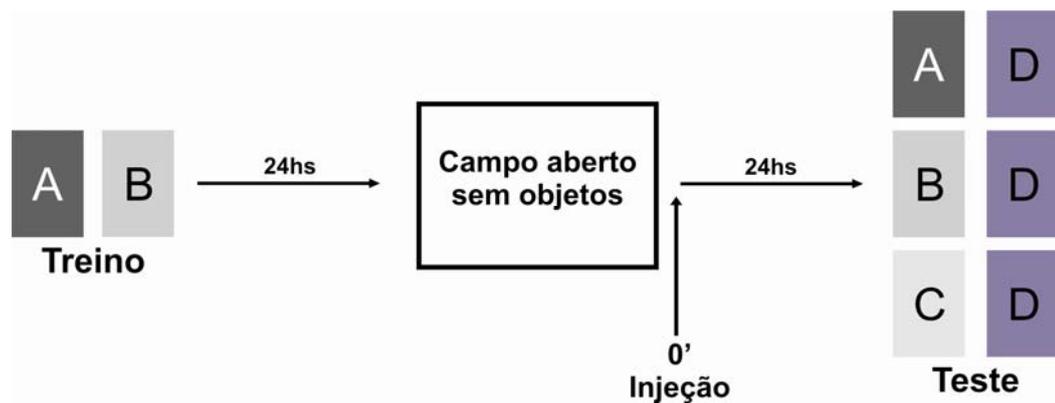


FIGURA 20 - A inibição de mTOR hipocampal 24 horas após a sessão de treino na ausência de eventos comportamentais relevantes não afeta a retenção da memória de reconhecimento de objetos. Ratos com cânulas implantadas na região CA1 do hipocampo dorsal foram expostos a dois objetos distintos (A e B) por 5 minutos (Sessão de treino; Dia 1). Após 24 horas da sessão de treino os animais foram randomicamente divididos em três grupos diferentes que receberam uma infusão bilateral de veículo (0,1% de DMSO em salina; VEH) ou rapamicina (20pmol/lado; RAPA) na região CA1, retornando às suas caixas moradia sem receber nenhum estímulo específico. Passadas 24 horas os animais foram submetidos a uma sessão de teste de 5 minutos de duração (Sessão de teste; Dia 3) na presença de diferentes combinações de objetos como descrito a seguir: Grupo 1= Objeto A + Objeto D; Grupo 2= Objeto B + Objeto D; Grupo 3= Objeto C + Objeto D, onde os objetos C e D foram os objetos novos. Os dados (média ± erro padrão) são expressos como porcentagem do tempo total de exploração. *** $p < 0,01$ em teste t de Student para amostra única, valor de referência =50 (n=10 por grupo). No topo da figura há uma representação esquemática do protocolo comportamental utilizado.

As informações contextuais apresentadas durante o treino podem atuar como lembretes, sugerindo que apenas a informação contextual, pode induzir a reativação da memória por si só (Spear, 1973; Sara, 2000). E, para determinar se a inibição da mTOR hipocampal afeta a memória de reconhecimento de objetos quando as informações contextuais são apresentadas sozinhas, os animais foram expostos a objetos distintos (A e B) por 5 minutos (Sessão de treino; Dia 1). Passadas 24 horas foram submetidos a uma sessão de reativação contextual (Dia 2), na qual os animais puderam explorar por 5 minutos a arena do campo aberto, onde havia ocorrido a sessão de treino, na ausência de objetos ou de qualquer outro estímulo comportamental. Imediatamente depois os animais foram randomicamente divididos em três grupos diferentes que receberam infusão bilateral de veículo ou RAPA (20pmol/0,8µl/lado) na região CA1 do hipocampo dorsal. Após 24 horas (Sessão de teste; Dia 3), o grupo 1 foi exposto aos objetos A e D; o grupo 2 aos objetos B e D; e o grupo 3 aos objetos C e D por 5 minutos, onde os objetos C e D eram novos. Como pode ser observado na Figura 21 os animais que receberam infusão intra-hipocampal de veículo ou RAPA passaram mais tempo explorando o objeto novo D que o objeto familiar A ou B e passam a mesma quantidade de tempo explorando os objetos novos C e D (Figura 21), sugerindo que somente a exposição ao contexto não é suficiente para reativar o traço e induzir reconsolidação da memória de reconhecimento de objetos.



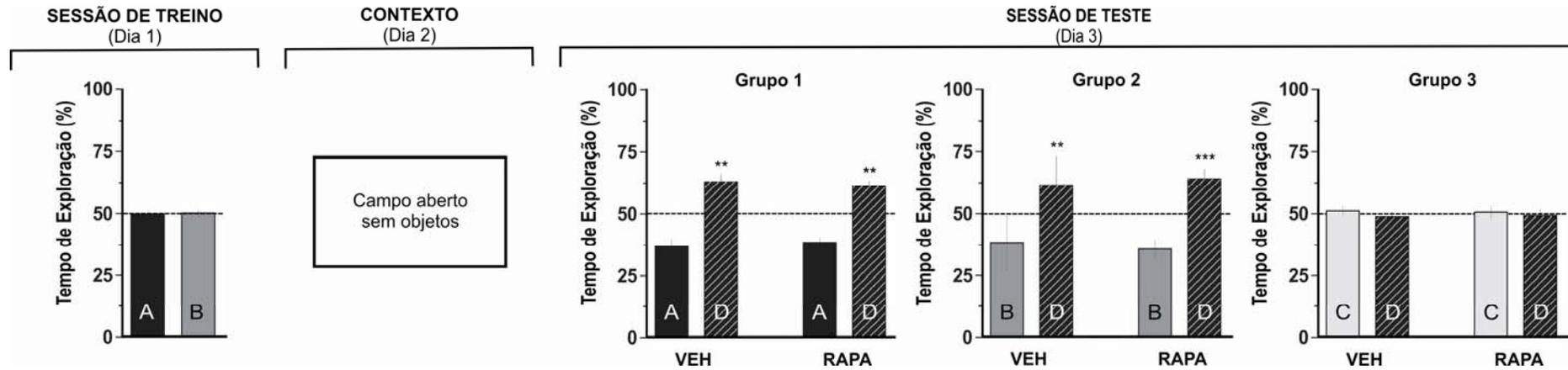
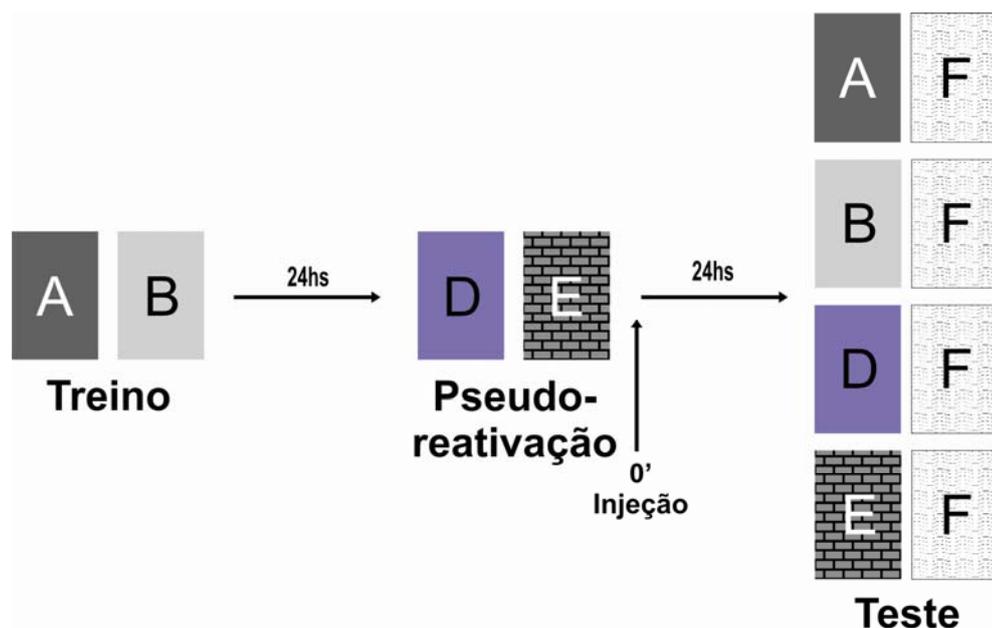


FIGURA 21 - A inibição da mTOR hipocampal 24 horas após a sessão de treino na ausência de eventos comportamentais relevantes não afeta a retenção da memória de reconhecimento de objetos. Ratos com cânulas implantadas na região CA1 do hipocampo dorsal foram expostos a dois objetos distintos (A e B) por 5 minutos (Sessão de treino; Dia 1). Após 24 horas os animais foram colocados na arena do campo aberto para que a explorassem livremente por 5 minutos, na ausência dos objetos (Sessão de reativação contextual; Dia 2). Imediatamente após a sessão de reativação os animais foram randomicamente divididos em três grupos e receberam infusão bilateral de veículo (0,1% de DMSO em salina; VEH) ou rapamicina (20pmol/lado) na região CA1 do hipocampo dorsal. Passadas 24 horas os animais foram submetidos a uma sessão de teste de 5 minutos de duração (Sessão de teste; Dia3) na presença de diferentes combinações de objetos como descrito a seguir: Grupo 1= Objeto A + Objeto D; Grupo 2= Objeto B + Objeto D; Grupo 3= Objeto C + Objeto D, onde os objetos C e D eram novos. Os dados (média \pm erro padrão) são expressos como porcentagem do tempo total de exploração. *** $p < 0,01$ e ** $p < 0,05$ em teste t de Student para amostra única, valor de referência =50 (n=10 por grupo). No topo da figura há uma representação esquemática do protocolo comportamental utilizado.

Com o objetivo de verificar se a inibição da mTOR hipocampal após uma sessão de pseudo-reativação afeta o traço da memória de reconhecimento original, os animais foram expostos a dois objetos distintos (A e B) por 5 minutos (Sessão de treino; Dia 1). Passadas 24 horas, estes foram expostos a dois objetos novos D e E (Sessão de pseudo-reativação; Dia 2) por 5 minutos. Imediatamente depois os animais foram randomicamente divididos em quatro grupos diferentes que receberam infusão bilateral de veículo ou RAPA (20pmol/lado) na região CA1 do hipocampo dorsal. Após 24 horas (Sessão de teste; Dia 3), o grupo 1 foi exposto aos objetos A e F; o grupo 2 aos objetos B e F; o grupo 3 aos objetos D e F; e o grupo 4 aos objetos E e F, por 5 minutos, onde F era o objeto novo. Como pode ser observado na Figura 22 os animais que receberam infusão intra-hipocampal de RAPA tiveram um prejuízo na retenção da memória para os dois objetos apresentados na sessão de pseudo-reativação, pois passaram a mesma quantidade de tempo explorando os objetos familiares (D e E) e o objeto novo F, porém, os animais foram capazes de lembrar dos objetos apresentados na sessão de treino (A e B), pois passaram mais tempo explorando o objeto novo F, sugerindo que a RAPA não tem efeito na persistência da memória original, mas bloqueia a retenção da memória para os objetos introduzidos durante a sessão de pseudo-reativação.



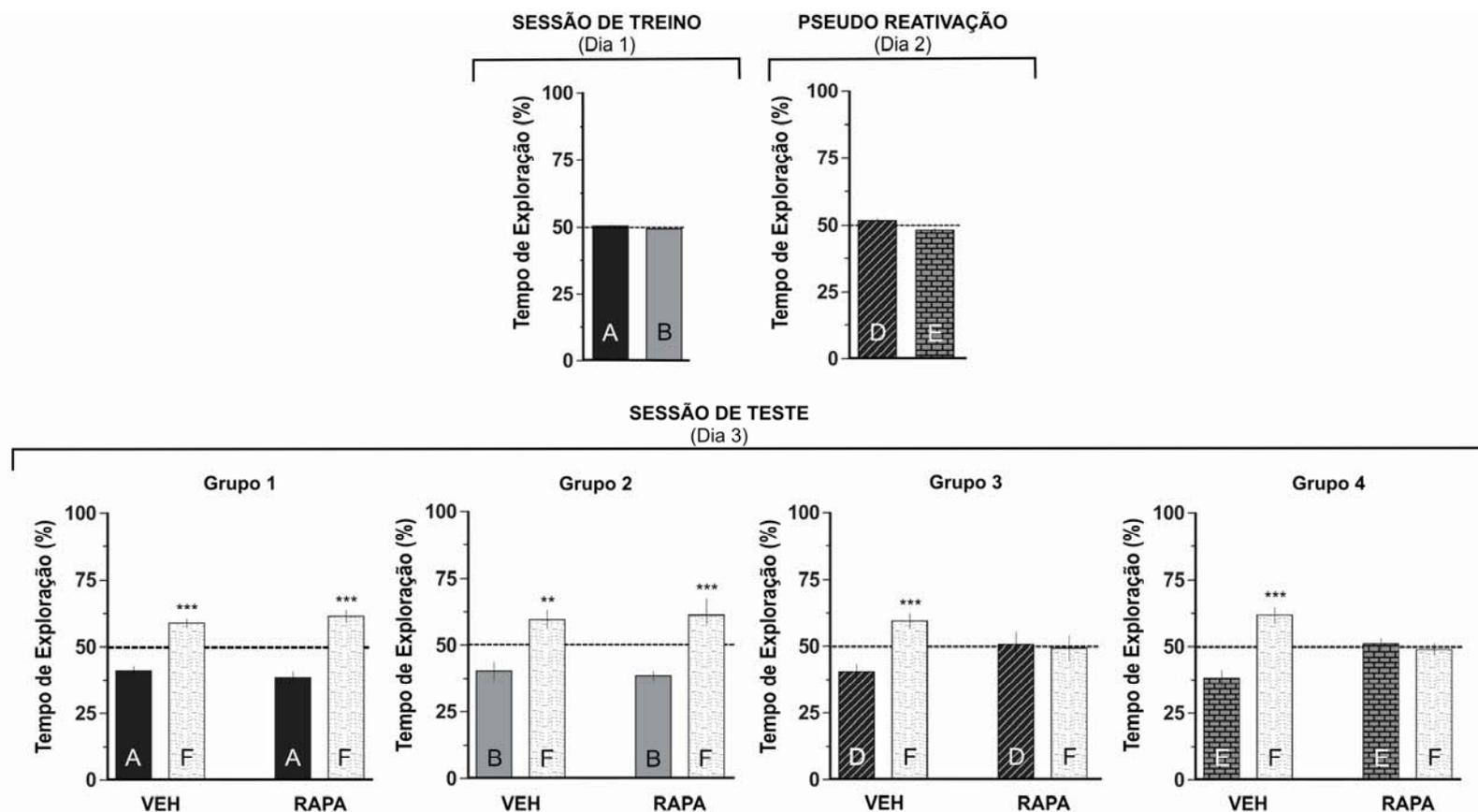


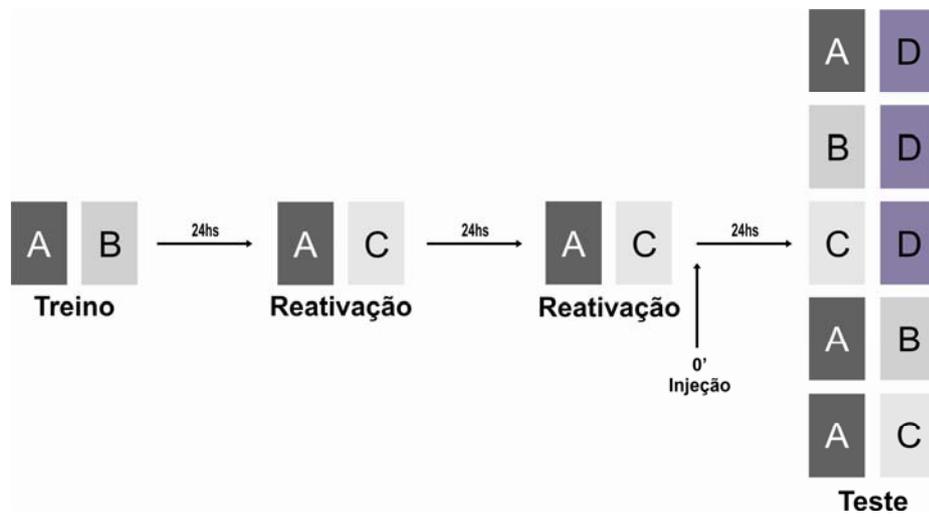
FIGURA 22 - A inibição da mTOR hipocampal após uma sessão de pseudo-reativação envolvendo exposição a dois objetos novos não afeta a memória de reconhecimento original.

Ratos com cânulas implantadas na região CA1 foram expostos a dois objetos distintos (A e B) por 5 minutos (Sessão de treino; Dia 1). Após 24 horas os animais foram expostos a dois objetos novos (D e E; Sessão de reativação; Dia 2). Após a sessão de reativação os animais foram randomicamente divididos em quatro grupos diferentes, recebendo, imediatamente depois, uma infusão bilateral de veículo (0,1% de DMSO em salina; VEH) ou rapamicina (20pmol/lado; RAPA) na região CA1 do hipocampo dorsal. Passadas 24 horas os animais foram submetidos a uma sessão de teste de 5 minutos de duração (Dia 3) na presença de diferentes combinações de objetos como descrito a seguir: Grupo 1= Objeto A + Objeto F; Grupo 2= Objeto B + Objeto F; Grupo 3= Objeto D + Objeto F; Grupo 4= Objeto E + Objeto F, onde F era o objeto novo. Nota-se que a RAPA prejudica a retenção da memória dos objetos D e E (que foram apresentados durante a sessão de pseudo-reativação), mas não prejudica a memória dos objetos familiares A e B, aos quais os animais foram expostos durante a fase de treino. Os dados (média ± erro padrão) são expressos como porcentagem do tempo total de exploração. *** $p < 0,01$ e ** $p < 0,05$ em teste *t* de Student para amostra única, valor de referência =50 (n=10 por grupo). No topo da figura há uma representação esquemática do protocolo comportamental utilizado.

Os resultados apresentados acima sugerem que a amnésia induzida pela inibição da mTOR hipocampal após a evocação da memória de reconhecimento de objetos possui duas características importantes: (1) a amnésia é possível com a presença de um objeto familiar e um novo no momento da evocação; e (2), a amnésia é específica para a memória do objeto familiar explicitamente evocada durante a reativação.

Para melhor investigar o papel da novidade na amnésia induzida pela administração de RAPA após a sessão de reativação, os ratos foram expostos a dois objetos diferentes (A e B) por 5 minutos (Sessão de treino; Dia 1). Após 24 e 48 horas (Sessão de reativação, Dia 2 e Dia 3, respectivamente) os animais foram expostos durante 5 minutos a um dos objetos familiares (A) e um objeto novo (C). Imediatamente após a segunda sessão de reativação, os animais foram randomicamente divididos em cinco grupos diferentes que receberam infusão bilateral de veículo ou RAPA (20pmol/lado) na região CA1 do hipocampo dorsal. Passadas 24 horas (Sessão de teste; Dia 4), o grupo 1 foi exposto aos objetos A e D; o grupo 2 aos objetos B e D; o grupo 3 aos objetos C e D; o grupo 4 aos objetos A e B; e o grupo 5 aos objetos A e C por 5 minutos, onde o objeto D era o novo. Quando a retenção foi avaliada 24 depois, os animais que receberam infusão intra-hipocampal de RAPA comportaram-se como o grupo controle, sugerindo que a inibição da mTOR hipocampal, após a segunda sessão de reativação, na presença de objetos familiares, não tem efeito sobre a persistência da memória (Figura 23). Essa hipótese foi confirmada em um conjunto diferente de experimentos, onde os animais foram expostos a dois objetos distintos (A e B) no primeiro dia (Sessão de treino); 24 horas depois (Sessão de reativação; Dia 2) os animais foram expostos durante 5 minutos a um dos objetos familiares (A) e um novo (C); passadas 24 horas (Sessão de reativação; Dia 3) os animais foram expostos durante 5 minutos aos mesmos objetos apresentados na sessão de treino (A e B). Imediatamente após a segunda sessão de reativação, os animais foram randomicamente divididos em cinco grupos diferentes que receberam infusão bilateral de veículo ou RAPA (20pmol/lado) na região CA1 do hipocampo dorsal. Após 24 horas (Sessão de teste; Dia 4), o grupo 1 foi exposto aos objetos A e D; o grupo 2 aos objetos B e D; o grupo 3 aos objeto C e D; o grupo 4 aos objetos A e B; e o grupo 5 aos objetos A e C por 5 minutos, onde D foi o objeto novo. Os animais que receberam infusão intra-

hipocampal de RAPA comportaram-se como o grupo controle, confirmando os resultados do experimento anterior (Figura 24)



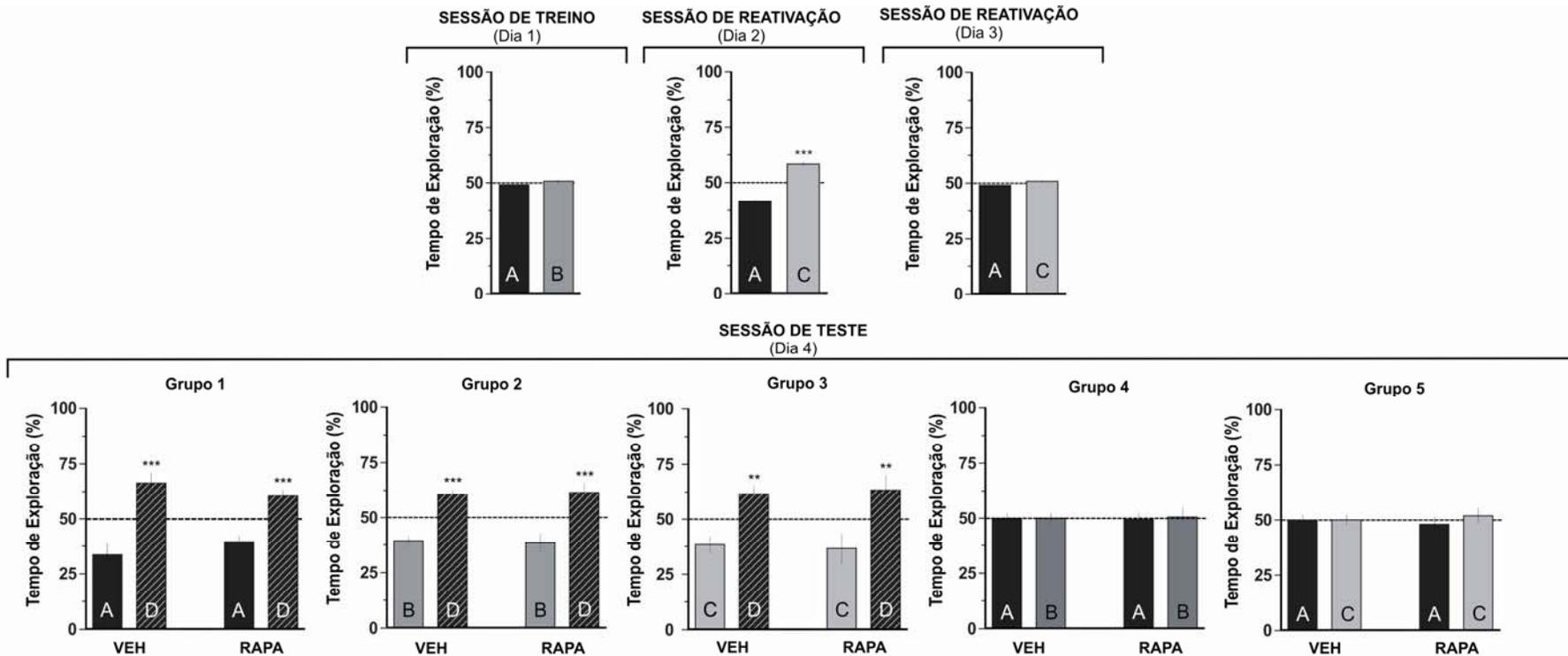


FIGURA 23 - A inibição da mTOR hipocampal depois de uma segunda sessão de reativação, na presença de objetos familiares, não tem efeito sobre a persistência da memória. Ratos com cânulas implantadas na região CA1 foram expostos a dois objetos distintos (A e B) por 5 minutos (Sessão de treino; Dia 1). Após 24 (sessão de reativação; Dia 2) e 48 horas (Sessão de reativação; Dia 3) os animais foram expostos por 5 minutos ao objeto familiar A e um objeto novo (C). Os ratos foram divididos aleatoriamente em cinco grupos e, imediatamente depois, receberam infusão intra-hipocampal de veículo (0,1% de DMSO em solução salina; VEH) ou rapamicina (20pmol/0,8µl/lado; RAPA). Passadas 24 horas os animais foram submetidos a uma sessão de teste por 5 minutos (Dia 4) na presença de diferentes combinações de objetos, como a seguir: Grupo 1 = objeto A + objeto D; Grupo 2 = objeto B + objeto D; Grupo 3 = objeto C + objeto D; Grupo 4 = objeto A + objeto B; e Grupo 5 = objeto A + objeto C, onde D era o objeto novo. Os dados (média ± erro padrão) são expressos como porcentagem do tempo total de exploração. ***p<0,01 e **p<0,05 em teste t de Student para amostra única, valor de referência =50 (n=10 por grupo). No topo da figura há uma representação esquemática do protocolo comportamental utilizado.

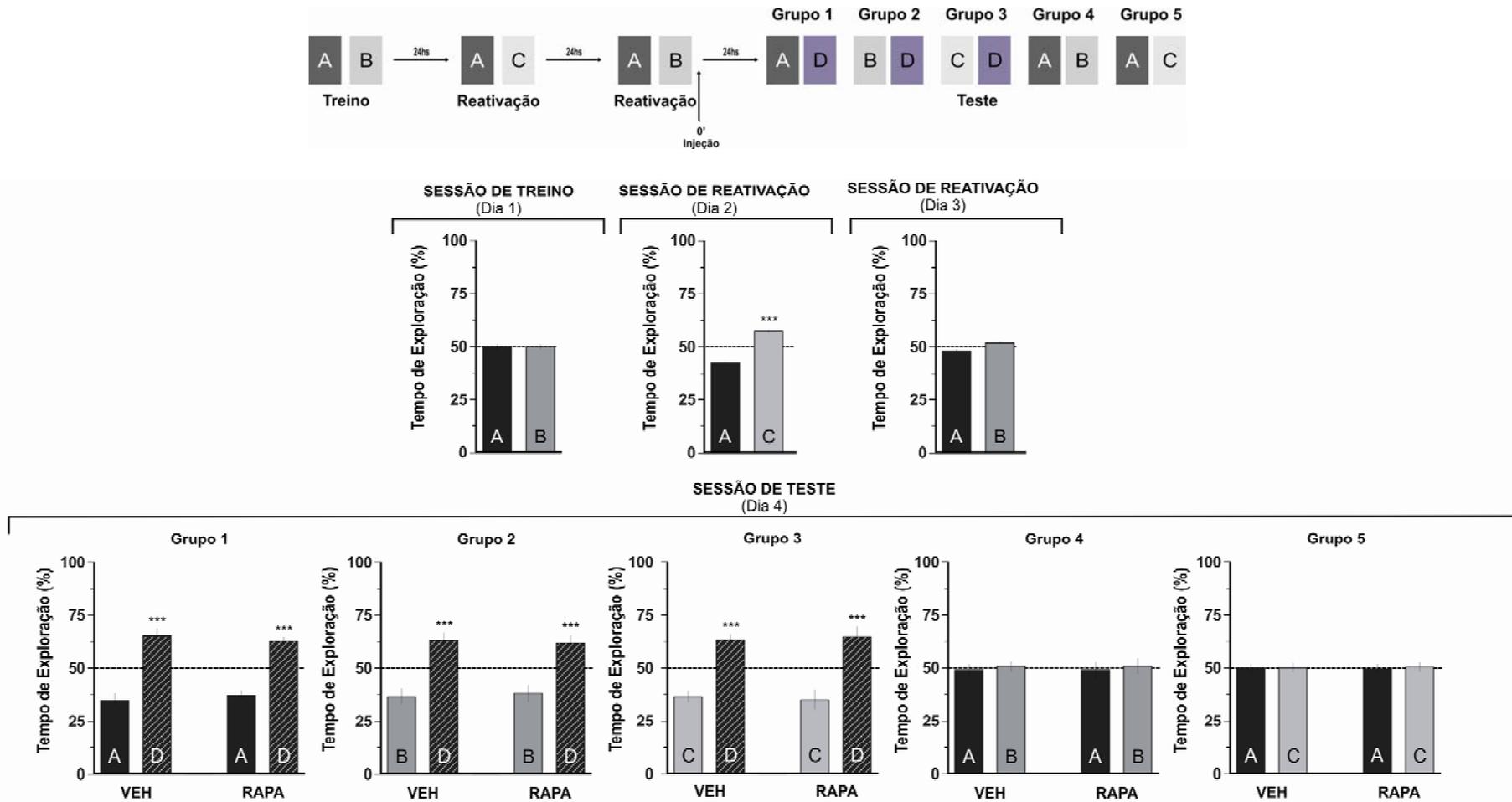
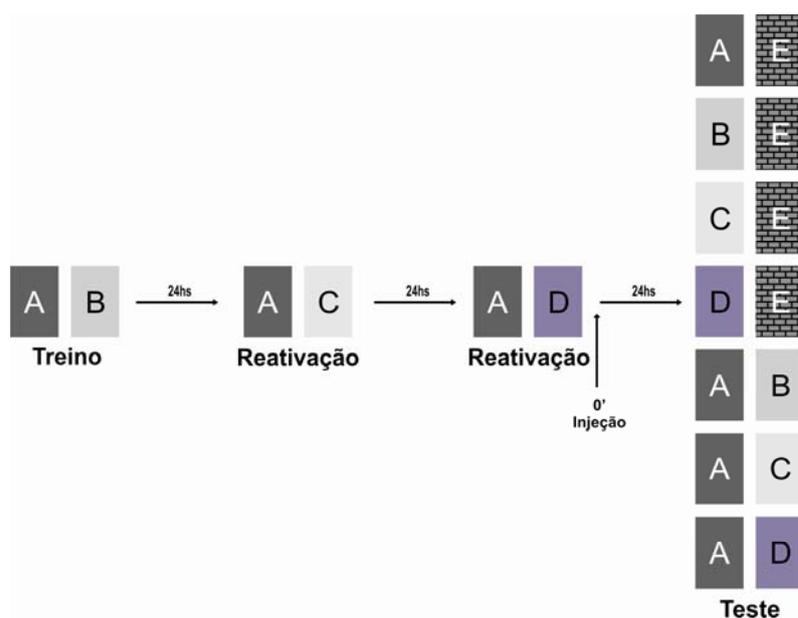


FIGURA 24 - A inibição da mTOR hipocampal, depois de uma segunda sessão de reativação, na presença de objetos familiares, não tem efeito sobre a persistência da memória. Ratos com cânulas implantadas na região CA1 foram expostos a dois objetos distintos (A e B) por 5 minutos (Sessão de treino; Dia 1). Após 24 horas (sessão de reativação; Dia 2) os animais foram expostos por 5 minutos ao objeto familiar A e um objeto novo (C). Passadas 24 horas (Sessão de reativação; Dia 3) os animais foram expostos por 5 minutos aos mesmos objetos apresentados na sessão de treino (A e B). Os ratos foram divididos aleatoriamente em cinco grupos e, imediatamente depois, receberam infusão intra-hipocámpica de veículo (0,1% de DMSO em solução salina; VEH) ou rapamicina (20pmol/0,8µl/lado; RAPA). Após 24 horas os animais foram submetidos a uma sessão de teste por 5 minutos (Dia 4) na presença de diferentes combinações de objetos, como a seguir: Grupo 1 = objeto A + objeto D; Grupo 2 = objeto B + objeto D; Grupo 3 = objeto C + objeto D; Grupo 4 = objeto A + objeto B; e Grupo 5 = objeto A + objeto C, onde D era o objeto novo. Os dados (média ± erro padrão) são expressos como porcentagem do tempo total de exploração. ***p<0,01 e **p<0,05 em teste t de Student para amostra única, valor de referência =50 (n=11 por grupo). No topo da figura há uma representação esquemática do protocolo comportamental utilizado.

Para analisar se a amnésia induzida pela infusão de RAPA, no hipocampo dorsal, é específica para o objeto familiar evocado durante a reativação da memória, ratos foram expostos a dois objetos distintos (A e B) no primeiro dia (Sessão de treino), 24 horas depois (Sessão de reativação, Dia 2) os animais foram expostos, durante 5 minutos, a um dos objetos familiares (A) e um objeto novo C (Figura 25). Passadas 24 horas (Sessão de reativação, Dia 3) os animais foram expostos por 5 minutos ao objeto familiar (A) e um objeto novo D. Imediatamente depois os animais receberam infusão bilateral de veículo ou RAPA (20pmol/lado) na região CA1 do hipocampo dorsal e foram randomicamente divididos em sete grupos: Grupo 1 foi exposto ao objeto A e o objeto novo E; Grupo 2 ao objeto B e o objeto novo E; Grupo 3 ao objeto C e o objeto novo E; Grupo 4 ao objeto D e o objeto novo E; Grupo 5 aos objetos A e B; Grupo 6 aos objetos A e C; e o Grupo 7 aos objetos A e D. Os animais foram testados 24 horas depois (Sessão de Teste, Dia 4; Figura 25). Os que receberam veículo passaram mais tempo explorando o objeto novo E quando apresentado com os objetos familiares e, exploraram igualmente os objetos A e B, A e C, A e D, indicando que lembram destes. Os animais que receberam infusão de RAPA também passaram mais tempo explorando o objeto novo E quando apresentado com os objetos familiares, exceto quando apresentado com o objeto familiar D, sugerindo que a infusão intra-hipocampal de RAPA prejudica a formação da memória para este objeto.



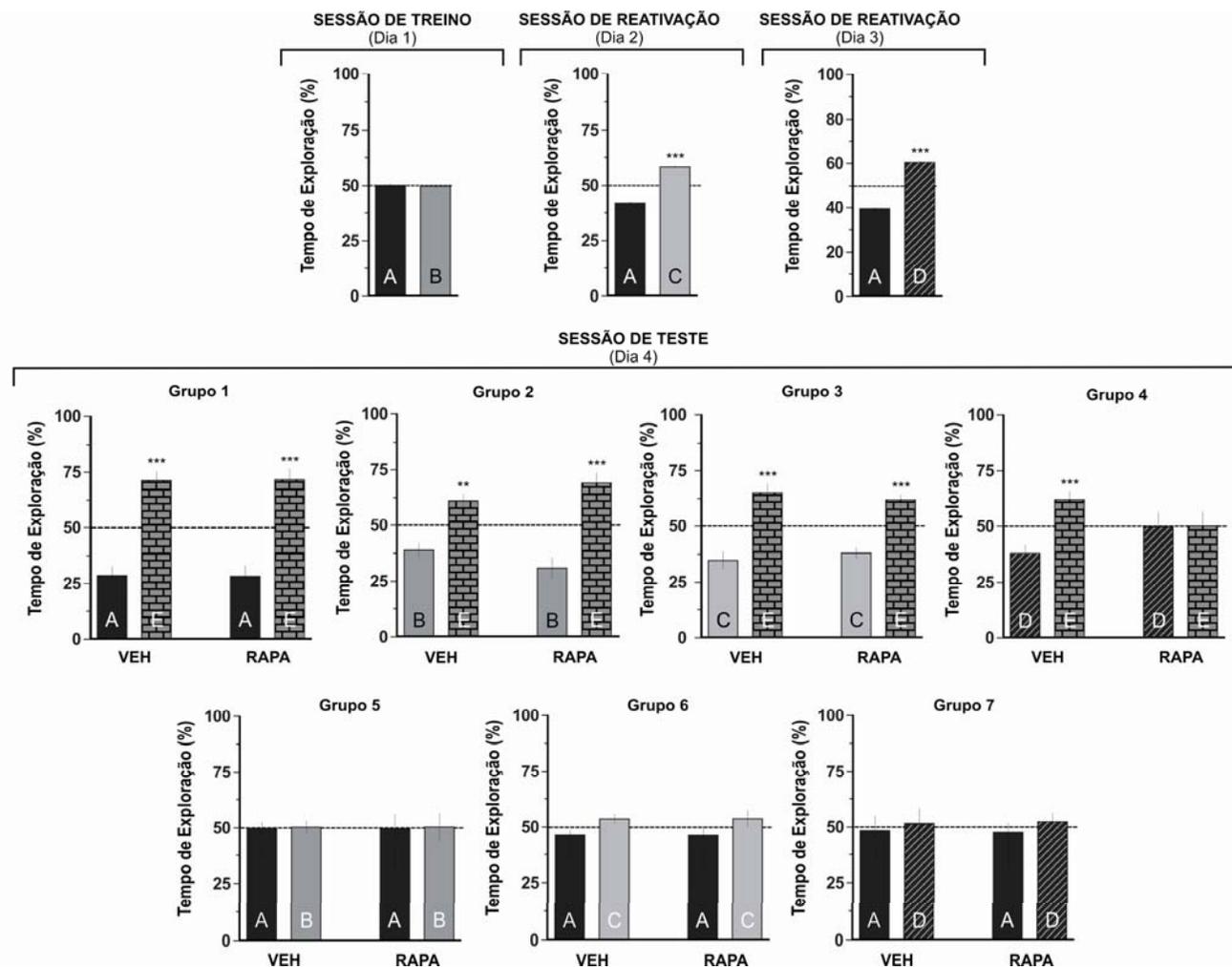


FIGURA 25 - A inibição da mTOR hipocampal após a sessão de reativação na presença de um objeto novo afeta a memória para o objeto familiar lembrado durante a reativação. Ratos com cânulas implantadas na região CA1 foram expostos a dois objetos distintos (A e B) por 5 minutos (Sessão de treino; Dia 1). Após 24 horas (sessão de reativação; Dia 2) os animais foram expostos por 5 minutos ao objeto familiar A e um objeto novo (C). Passadas 48 horas (Sessão de reativação; Dia 3) da sessão de treino os animais foram expostos por 5 minutos ao objeto familiar A juntamente com o objeto novo D e, imediatamente depois, foram divididos randomicamente em sete grupos, recebendo infusão intra-hipocampal de veiculo (0,1% de DMSO em solução salina; VEH) ou rapamicina (20pmol/0,8µl/lado; RAPA). Após 24 horas os animais foram submetidos a uma sessão de teste por 5 minutos (Dia 4) na presença de diferentes combinações de objetos, como a seguir: Grupo 1 = objeto A + objeto E; Grupo 2 = objeto B + objeto E; Grupo 3 = objeto C + objeto E; Grupo 4 = objeto D + objeto E; Grupo 5 = objeto A + objeto B, Grupo 6 = objeto A + objeto C; e Grupo 7 = objeto A + objeto D onde E era o objeto novo. Os dados (média ± erro padrão) são expressos como porcentagem do tempo total de exploração. ***p<0,01 e **p<0,05 em teste *t* de Student para amostra única, valor de referência =50 (n=10 por grupo). No topo da figura há uma representação esquemática do protocolo comportamental utilizado.

4 DISCUSSÃO

No presente trabalho apresentamos evidências de que a proteína cinase mTOR é necessária para os processos de consolidação e reconsolidação da memória de reconhecimento de objetos em ratos. Mostramos que a RAPA, inibidor específico da mTOR, prejudica significativamente a memória de longa duração quando infundida na região CA1 do hipocampo dorsal imediatamente, 180 ou 360, mas não 540 minutos após o treino na tarefa de reconhecimento de objetos. O fato de que este efeito é tempo-dependente sugere que a amnésia induzida por RAPA deve-se à inibição do processo de consolidação e não a uma ação comportamental inespecífica ou a um prejuízo na funcionalidade hipocampal. Esta asseveração é corroborada por uma série de experimentos controle, os quais demonstram que:

- 1) a infusão bilateral de RAPA na região CA1 do hipocampo dorsal imediatamente após o treino na tarefa de reconhecimento de objetos, não afeta a retenção da memória de curta duração;
- 2) a infusão bilateral de RAPA na região CA1 do hipocampo dorsal 24 horas antes da exposição a um campo aberto ou ao labirinto em cruz elevado, não altera a atividade locomotora nem exploratória ou o estado de ansiedade de animais;
- 3) a infusão bilateral de RAPA na região CA1 do hipocampo dorsal 24 horas antes do treino nas tarefas de labirinto aquático de Morris ou esquiva inibitória, não altera a preferência espacial e a resposta condicionada aversiva. O labirinto aquático de Morris e a esquiva inibitória são dois paradigmas que requerem a integridade funcional da formação hipocampal (Cammarota et al., 2004; Rossato et al., 2006).

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. Estudos sugerem que o principal papel da reconsolidação é re-estabilizar o traço que fora debilitado em consequência de sua reativação (Judge e Quartermain, 1982; Przybylski e Sara, 1997; Nader et al., 2000a; Milekic e Alberini, 2002; Tronson e Taylor, 2007). De fato, estudos mostram que a memória de reconhecimento de objetos, quando reativada, torna-se

susceptível a microinfusão de bloqueadores metabólicos e inibidores de síntese protéica (Akirav e Maroun, 2006; Kelly et al., 2003; Maroun e Akirav, 2007; Rossato et al., 2007), contudo, o papel desempenhado por diferentes áreas do cérebro no processo de reconsolidação ainda não está claro. Por exemplo, Akirav e Maroun (2006) mostraram que a inibição de síntese protéica no córtex pré-frontal ventro medial, prejudica a persistência da memória de reconhecimento de objetos quando a infusão do inibidor ocorre após a reativação do traço original da memória de reconhecimento na presença dos mesmos objetos apresentados durante a sessão de treino, enquanto que 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 de reconhecimento na presença de uma novidade (quando a evocação ocorre concomitantemente com a aquisição de uma nova informação). Dessa forma, o córtex pré-frontal parece estar envolvido principalmente com a discriminação da ordem temporal dos estímulos previamente encontrados (Rainer e Miller, 2000; Xiang e Brown, 2004; Hannesson et al., 2004a; Hannesson et al., 2004b), já o hipocampo parece estar envolvido no processamento de informações referentes à detecção da novidade e/ou a modificações na configuração espacial (Wan et al., 1999; Viola et al., 2000; Mumby et al., 2002; Hammond et al., 2004; Winograd e Viola, 2004; Aggleton e Brown, 2005; Moncada e Viola, 2006).

No presente estudo mostramos que, quando infundida bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal imediatamente, 180 ou 540 minutos após a reativação da memória de reconhecimento de objetos envolvendo re-exposição a dois objetos familiares, a RAPA não exerce qualquer efeito sobre o traço reativado. Esse resultado negativo deve-se, provavelmente, ao fato de que o procedimento empregado para reativar o traço atuou não só como uma sessão de reativação, mas também como uma segunda sessão de treino durante a qual nenhuma informação nova foi disponibilizada. Entretanto, quando infundimos a RAPA na região CA1 do hipocampo dorsal imediatamente após uma sessão de reativação da memória de reconhecimento envolvendo a apresentação de um objeto familiar e um novo, esta bloqueou a memória do objeto novo e a do objeto familiar que foi apresentado durante as sessões de treino e reativação, mas deixou intacta a memória para o objeto familiar apresentado somente durante o treino. Este efeito amnésico da administração de RAPA é independente do lapso entre as sessões de reativação,

sugerindo que a amnésia se deve à interrupção da memória previamente consolidada e não a um efeito passageiro na performance comportamental. De fato, tem-se proposto que a finalidade da reconsolidação não é meramente reconstruir um traço que se tornou vulnerável após sua evocação, mas também integrar novas experiências às memórias previamente consolidadas (Nader et al., 2000; Sara, 2000; Rodriguez-Ortiz et al., 2005; Rossato et al., 2007). Além disso, a região hipocampal é um dos componentes essenciais para o circuito que detecta e responde a novos estímulos (Knight, 1996; Grunwald et al., 1998).

Neste trabalho mostramos que a RAPA não exerce efeito, quando infundida na região CA1 do hipocampo dorsal, 24 horas após o treino, na ausência de qualquer estímulo comportamental relevante; que não tem efeito quando infundida na região CA1 do hipocampo dorsal imediatamente após a reativação da memória de reconhecimento de objetos envolvendo a apresentação de dois objetos novos; e que a infusão intra hipocampal de RAPA, após a reativação contextual, na ausência de qualquer objeto, não exerce efeito sobre a persistência da memória de reconhecimento de objetos. Esses resultados possuem importantes implicações, tais como:

- 1) indicam que o efeito da RAPA após a reativação da memória de reconhecimento de objetos é devido a um bloqueio no traço original da memória de reconhecimento e não em consequência de um prejuízo no desempenho comportamental dos animais durante a tarefa;
- 2) demonstram que a participação do hipocampo na reconsolidação da memória de reconhecimento de objetos está associada com a reativação do traço na presença de um conjunto particular de pistas, envolvendo elementos familiares e novos durante a evocação;
- 3) sugerem que a exposição ao contexto não é capaz, por si só, de reativar efetivamente o traço de reconhecimento, pelo menos não a ponto de induzir reconsolidação dependente do hipocampo. Isso pode ser atribuído ao fato de que os animais empregados nestes experimentos foram pré-habitados à arena do campo aberto antes de serem treinados, razão pela qual, foi diminuída a importância relativa do contexto para desencadear a evocação.

Neste estudo, mostramos que a RAPA não afeta a retenção da memória de reconhecimento de objetos quando administrada na região CA1 do hipocampo

dorsal imediatamente após uma segunda sessão de reativação com objetos familiares, porém, quando infundida imediatamente após uma segunda sessão de reativação com objetos familiar e novo, afeta somente a retenção da memória do objeto novo, reforçando a hipótese de que o hipocampo está envolvido na reconsolidação do traço de reconhecimento de objetos apenas quando a reativação ocorre concomitantemente com a aquisição de novas informações e não quando o traço é totalmente reativado.

No presente trabalho apresentamos evidências de que a síntese de proteínas é requerida durante o processamento da memória de reconhecimento de objetos. Em particular, nossos resultados demonstram que a ativação da via de sinalização mTOR é necessária na região CA1 do hipocampo dorsal, durante uma janela temporal restrita para o processo de consolidação da memória de reconhecimento de objetos. Mostramos que quando a memória de reconhecimento de objetos é reativada na presença de uma nova informação, este traço torna-se novamente suscetível a RAPA, inibidor da mTOR.

É importante destacar que pretendemos, em estudos futuros, investigar através de experimentos bioquímicos e farmacológicos quais são as proteínas sensíveis à RAPA requeridas no hipocampo para a consolidação e reconsolidação da memória de reconhecimento de objetos, bem como, os sinais extracelulares que recrutam a via sinalização da mTOR durante o processamento da memória. Sabe-se que a proteína cinase mTOR regula a síntese de várias proteínas envolvidas na plasticidade sináptica e formação de memórias, como as proteínas Arc, CaMKII, e Homer 2 (Schratt et al., 2004; Takei et al., 2004). Estudos mostram que a RAPA é capaz de bloquear a expressão de dois dos principais componentes da maquinaria responsável pela tradução em neurônios, 4E-BP1 e eIF4E (Takei et al., 2001). A infusão de RAPA intra-amígdala, bloqueia a formação da memória e impede o aumento da fosforilação de p70S6K após o treino na tarefa de medo condicionado (Parsons et al., 2006). Além disso, a ativação dendrítica da via de sinalização mTOR-p70S6K, necessária para a plasticidade sináptica, dependente de síntese protéica na região CA1 do hipocampo, pode ser prevenida por RAPA (Cammalleri et al., 2003). A RAPA é capaz de impedir a ativação da via de sinalização mTOR/S6K, ativada por BDNF, prejudicando a síntese de proteínas em neurônios hipocámpais (Tang et al., 2002; Sanna et al., 2002; Cammalleri et al., 2003; Takei et al., 2001, 2004).

Uma questão importante que ainda permanece controversa é se os processos de consolidação e reconsolidação compartilham os mesmos mecanismos bioquímicos (Przybylski e Sara, 1997; Summers et al., 1997; Duvarci et al., 2005; Alberini, 2005; Dudai, 2006). Vários tratamentos farmacológicos que prejudicam o processo de consolidação, também são capazes de bloquear a reconsolidação, levando a hipótese de que a reconsolidação envolve uma espécie de recapitulação dos eventos moleculares e bioquímicos que ocorrem durante o processo de consolidação (Sara, 2000). Por exemplo, a ativação pós-treino de receptores NMDA e das cinases PKC e ERK1/2 é necessária para os processos de consolidação (Morris et al., 1986; Rickard et al., 1994; Tronel e Sara, 2003; Riedel et al., 2003; Bevilaqua et al., 2005; Robbins e Murphy, 2006; Izquierdo et al., 2006) e reconsolidação de diferentes tipos de memórias (Przybylski e Sara, 1997; Summers et al., 1997; Torras-Garcia et al., 2005; Bonini et al., 2007; Duvarci et al., 2005). No entanto, vários experimentos mostraram a existência de diferenças bioquímicas significativas entre os processos de consolidação e reconsolidação (Anokhin et al., 2002; Lee et al., 2004; Boccia et al., 2006; Bucherelli et al., 2006), sugerindo que, apesar de existirem algumas similaridades, a reconsolidação não é uma segunda fase da consolidação, nem envolve a solicitação da consolidação do traço da memória original (Alberini, 2005; Dudai, 2006). A respeito disso, constatamos que, apesar dos nossos resultados mostrarem que a inibição da atividade da mTOR hipocampal, durante a consolidação e a evocação, prejudica a memória de longa duração, é possível que os substratos moleculares de tais processos sejam diferentes em cada caso.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesta tese indicam que:

- A inibição da mTOR hipocampal, através da infusão de RAPA, imediatamente, 180 ou 360, mas não 540 minutos após a sessão de treino, bloqueia a retenção da memória de reconhecimento de objetos em ratos.
- A inibição da mTOR hipocampal, através da infusão de RAPA, não afeta a memória de reconhecimento de objetos de curta duração em ratos.
- A inibição da mTOR hipocampal, através da infusão de RAPA, não afeta a atividade locomotora e exploratória nem o estado de ansiedades de animais.
- A inibição da mTOR hipocampal, através da infusão de RAPA, não afeta o aprendizado de animais nas tarefas comportamentais de labirinto aquático de Morris e esquiva inibitória.
- A inibição da mTOR hipocampal, através da infusão de RAPA, após uma sessão de reativação envolvendo exposição a dois objetos familiares não afeta a retenção da memória de reconhecimento em ratos.
- A inibição da mTOR hipocampal, através da infusão de RAPA, após uma sessão de reativação envolvendo exposição a um objeto familiar e um novo, prejudica a memória destes dois objetos, mas não afeta a memória do objeto apresentado somente durante o treino na tarefa de reconhecimento de objetos em ratos.
- A inibição hipocampal da mTOR, através da infusão de RAPA, após a exposição à arena do campo aberto ou a dois objetos novos, não afeta a memória de reconhecimento de objetos em ratos.
- A inibição hipocampal da mTOR, através da infusão de RAPA, 24 horas após o treino na ausência de qualquer evento comportamental relevantes, não afeta a retenção da memória de reconhecimento de objetos em ratos.
- A inibição hipocampal da mTOR, através da infusão de RAPA após uma segunda sessão de reativação, envolvendo exposição a objetos familiares, não afeta a retenção da memória destes objetos, nem a memória do objeto apresentado somente durante o treino na tarefa de reconhecimento de objetos em ratos.
- A inibição hipocampal da mTOR, através da infusão de RAPA após uma segunda sessão de reativação, envolvendo exposição a um objeto familiar e um novo,

afeta a memória do objeto novo, mas não a memória do objeto familiar apresentado durante as reativações na tarefa de reconhecimento de objetos em ratos.

6 REFERÊNCIAS

ABEL, T.; KANDEL, E. Positive and negative regulatory mechanisms that mediate long-term memory storage. **Brain Research Reviews**, 26 (2-3): 360-378, 1998.

AGGLETON, J.P.; Brown, M.W. Contrasting hippocampal and perirhinal cortex function using immediate early gene imaging. **The Quarterly journal of experimental psychology. B, Comparative and physiological psychology**, 58(3-4):218-33, 2005.

AKIRAV, I.; MAROUN, M. Ventromedial Prefrontal Cortex Is Obligatory for Consolidation and Reconsolidation of Object Recognition Memory. **Cerebral Cortex**, 16 (12): 1759-65, 2006.

ALBERINI, C. M. Mechanisms of memory stabilization: Are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? **Trends in Neurosciences**, 28: 51–56, 2005.

ALBERINI, C.M.; MILEKIC, M.H.; TRONEL, S. Mechanisms of memory stabilization and de-stabilization. **Cellular and molecular life sciences**, 63(9): 999-1008, 2006.

ALBRIGHT, T.D.; KANDEL, E.R.; POSNER, M.I. Cognitive neuroscience. **Current Opinion in Neurobiology**, 10: 612-624, 2000.

AN, W.L.; COWBURN, R.F.; LI, L.; BRAAK, H.; ALAFUZOFF, I.; IQBAL, K.; IQBAL, I.G.; WINBLAD, B.; PEI, J.J. Up-regulation of phosphorylated/activated p70 S6 kinase and its relationship to neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. **The American journal of pathology**, 163 (2): 591–607, 2003.

ANOKHIN, K.V.; TIUNOVA, A.A.; ROSE, S.P. Reminder effects -reconsolidation or retrieval deficit? Pharmacological dissection with protein synthesis inhibitors following reminder for a passive-avoidance task in young chicks. **The European Journal of Neuroscience**, 15 (11): 1759–1765, 2002.

AVRUCH, J.; LIN, Y.; LONG, X.; MURTHY, S.; ORTIZ-VEGA, S. Recent advances in the regulation of the TOR pathway by insulin and nutrients. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, 8 (1): 67–72, 2005.

BEKINSCHTEIN, P.; KATCHE, C.; SLIPCZUK, L.N.; IGAZ, L.M.; CAMMAROTA, M.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. mTOR signaling in the hippocampus is necessary for memory formation. **Neurobiology of Learning and Memory**, 87 (2): 303-307, 2007.

BEVILAQUA, L.R., DA SILVA, W.N., MEDINA, J.H., IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Extinction and reacquisition of a fearmotivated memory require activity of the Src family of tyrosine kinases in the CA1 region of the hippocampus. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 81:139–145, 2005.

BEVILAQUA, L.R.; ROSSATO, J.I.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Src kinase activity is required for avoidance memory formation and recall. **Behavioural Pharmacology**, 14 (8): 649-652, 2003.

BHASKAR, P.T.; HAY, N. The two TORCs and Akt. **Developmental Cell**, 12 (4): 487-502, 2007.

BOCCIA, M.M.; BLAKE, M.G.; ACOSTA, G.B.; BARATTI, C.M. Post-retrieval effects of icv infusions of hemicholinium in mice are dependent on the age of the original memory. **Learning and Memory**, 13 (3): 376–381, 2006.

BONINI, J. S.; DA SILVA, W.C.; BEVILAQUA, L.R.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. On the participation of hippocampal PKC in acquisition, consolidation and reconsolidation of spatial memory. **Neuroscience**, 147, 37–45, 2007.

BONINI, J.S.; BEVILAQUA, L.R.; ZINN, C.G.; KERR, D.S.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Angiotensin II disrupts inhibitory avoidance memory retrieval. **Hormones and Behavior**, 50 (2): 308-13, 2006.

BUCHERELLI, C.; BALDI, E.; MARIOTTINI, C.; PASSANI, M.B.; BLANDINA, P. Aversive memory reactivation engages in the amygdala only some neurotransmitters involved in consolidation. **Learning and Memory**, 13 (4): 426–430, 2006.

BURNETT, P.E.; BARROW, R.K.; COHEN, N.A.; SNYDER, S.H.; SABATINI, D.M. RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.**, 95 (4): 1432–1437, 1998.

CAMMALLERI, M.; LÜTJENS, R.; BERTON, F.; KING, A.R.; SIMPSON, C.; FRANCESCONI, W.; SANNA, P.P. Time-restricted role for dendritic activation of the mTOR-p70S6K pathway in the induction of late-phase long-term potentiation in the CA1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.**, 100(24): 14368-73, 2003.

CAMMAROTA, M.; BEVILAQUA, L.R.; ARDENGHI, P.; PARATCHA, G.; LEVI DE STEIN, M.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade. **Brain Research. Molecular Brain Research**, 76 (1): 36-43-46, 2000.

CAMMAROTA, M.; BEVILAQUA, L.R.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I. Retrieval does not induce reconsolidation of inhibitory avoidance memory. **Learning and Memory**, 11:572-578, 2004.

CAMMAROTA, M.; BEVILAQUA, L.R.; VIANNA, M.R.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I. The extinction of conditioned fear: structural and molecular basis and therapeutic use. **Revistas Brasileira de Psiquiatria**, 29(1):80-5, 2007.

CASADIO, A.; MARTIN, K.C.; GIUSTETTO, M.; ZHU, H.; CHEN, M.; BARTSCH, D. BAILEY, C.H.; KANDEL, E.R. 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, 1999.

CHAN, J.A.; ZHANG, H.; ROBERTS, P.S.; JOZWIAK, S.; WIESLAWA, G.; LEWIN-KOWALIK, J.; KOTULSKA, K.; KWIATKOWSKI, D.J. Pathogenesis of tuberous sclerosis subependymal giant cell astrocytomas: biallelic inactivation of TSC1 or TSC2 leads to mTOR activation. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, 63 (12): 1236–1242, 2004.

CLARK, R.E.; ZOLA, S.M.; SQUIRE, L.R. Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. **Journal of Neuroscience**, 20: 8853-60, 2000.

DA SILVA, W.C.; BONINI, J.S.; BEVILAQUA, L.R.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Histamine enhances inhibitory avoidance memory consolidation through a H2 receptor-dependent mechanism. **Neurobiology of Learning and Memory**, 86: 100-6, 2006.

DA SILVA, W.C.; BONINI, J.S.; BEVILAQUA, L.R.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Inhibition of mRNA synthesis in the hippocampus impairs consolidation and reconsolidation of spatial memory. **Hippocampus**, 18(1):29-39, 2008.

DAN, H.C.; SUN, M.; YANG, L.; FELDMAN, R.I.; SUI, X.M.; OU, C.C.; NELLIST, M.; YEUNG, R.S.; HALLEY, D.J.; NICOSIA, S.V.; PLEDGER, W.J.; CHENG, J.Q. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway regulates tuberous sclerosis tumor suppressor complex by phosphorylation of tuberin. **The Journal of Biological Chemistry**, 277(38): 35364–35370, 2002

DASH, P.K.; ORSI S.A.; MOORE, A.N. 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, 2006.

DAWSON, R.G.; MCGAUGH, J.L. Electroconvulsive shock effects on a reactivated memory trace: Further examination. **Science** 166:525–527, 1969.

DEBIEC, J.; LEDOUX, J. E.; NADER, K. Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. **Neuron**, 36 (3): 527-538, 2002.

DUDAI, Y. Molecular bases of long-term memories: A question of persistence. **Current Opinion in Neurobiology**, 12(2): 211–216, 2002.

DUDAI, Y. Reconsolidation: the advantage of being refocused. **Current Opinion Neurobiology**, 16(2):174-8, 2006.

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

DUFNER, A.; THOMAS, G. Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation. **Experimental Cell Research**, 253 (1): 100–109, 1999.

DUTCHER, J.P. Mammalian target of rapamycin inhibition. **Clinical Cancer Research**, 10: 6382s–6387s, 2004.

DUVARCI, S.; NADER, K.; LEDOUX, J.E. Activation of extracellular signal-regulated kinase- mitogen-activated protein kinase cascade in the amygdala is required for memory reconsolidation of auditory fear conditioning. **The European Journal of Neuroscience**, 21, 283–289, 2005.

EISENBERG, M.; DUDAI, Y. Reconsolidation of fresh, remote, and extinguished fear memory in Medaka: old fears don't die. **The European journal of neuroscience**, 20 (12): 3397–3403, 2004.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behavioural Brain Research**, 31 (1): 47-59, 1988.

FERRARI, S.; PEARSON, R.B.; SIEGMANN, M.; KOZMA, S.C.; THOMAS, G. The immunosuppressant rapamycin induces inactivation of p70s6k through dephosphorylation of a novel set of sites. **The Journal of Biological Chemistry**, 268: 16091–16094, 1993.

FRENKEL, L.; MALDONADO, H.; DELORENZI, A. Memory strengthening by a real-life episode during reconsolidation: an outcome of water deprivation via brain angiotensin II. **The European Journal of Neuroscience**, 22 (7): 1757–1766, 2005.

FRIAS, M.A.; THOREEN, C.C.; JAFFE, J.D.; SCHRODER, W.; SCULLEY, T.; CARR, S.A.; SABATINI, D.M. mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. **Current Biology: CB**, 16(18): 1865-70, 2006.

FUMAGALLI, S.; THOMAS, G. **S6 phosphorylation and signal transduction**. In: Translational control of gene expression (Sonenberg N, Hershey JWB, Mathews MB, eds), pp 685-717. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 2000.

GAINUTDINOVA, T.H.; TAGIROVA, R.R.; ISMAILOVA, A.I.; MURANOVA, L.N.; SAMAROVA, E.I.; GAINUTDINOV, K.L.; BALABAN, P.M. Reconsolidation of a context long-term memory in the terrestrial snail requires protein synthesis. **Learning and Memory**, 12 (6): 620–625. 2005.

GARAMI, A.; ZWARTKRUIS, F.J.; NOBUKUNI, T.; JOAQUIN, M.; ROCCIO, M.; STOCKER, H.; KOZMA, S.C.; HAFEN, E.; BOS, J.L.; THOMAS, G. Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2. **Molecular Cell**, 11(6): 1457–1466, 2003

GINGRAS, A.C.; RAUGHT, B.; SONENBERG, N. Control of translation by the target of rapamycin proteins. **Progress in Molecular and Subcellular Biology**, 27: 143–174, 2001.

GINGRAS, A.C.; RAUGHT, B.; SONENBERG, N. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. **Genes and Developmental**, 15(7): 807-26, 2001

GONG, R.; PARK, C.S.; ABBASSI, N.R.; TANG, S.J. Roles of glutamate receptors and the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway in activity-dependent dendritic protein synthesis in hippocampal neurons. **The Journal of Biological Chemistry**, 281 (27): 18802-15, 2006.

GRUNWALD, T.; LEHNERTZ, K.; HEINZE, H.J.; HELMSTAEDTER, C.; ELGER, C.E. Verbal novelty detection within the human hippocampus proper. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.**, 95: 3193–3197, 1998.

GUERTIN, D.A.; SABATINI, D.M. An expanding role for mTOR in cancer. **Trends in Molecular Medicine**, 11(8): 353–361, 2005.

HAMMOND, R.S.; TULL, L.E.; STACKMAN, R.W. On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, 82:26-34, 2004.

HANNESSON, D.K.; HOWLAND, J.G.; PHILLIPS, A.G. Interaction between perirhinal and medial prefrontal cortex is required for temporal order but not recognition memory for objects in rats. **The Journal of Neuroscience**, 24:4596-4604, 2004a.

HANNESSON, D.K.; VACCA, G.; HOWLAND, J.G.; PHILLIPS, A.G. Medial prefrontal cortex is involved in spatial temporal order memory but not spatial recognition memory in tests relying on spontaneous exploration in rats. **Behavioural Brain Research**, 153:273-285, 2004b.

HARA, K.; MARUKI, Y.; LONG, X.; YOSHINO, K.; OSHIRO, N.; HIDAYAT, S.; TOKUNAGA, C.; AVRUCH, J.; YONEZAWA, K. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. **Cell**, 110(2): 177-89, 2002

HARRIS, T.E.; LAWRENCE JR., J.C. TOR signaling. **Science's STKE: signal transduction knowledge environment**, 2003 (212): ref 15, 2003.

HAY, N.; SONENBERG, N. Upstream and downstream of mTOR. **Genes and Development**, 18 (16): 1926-1945, 2004.

HERNANDEZ, P.J.; KELLEY, A.E. Long-term memory for instrumental responses does not undergo protein synthesis-dependent reconsolidation upon retrieval. **Learning and Memory**, 11:748-754, 2004.

HOU, L.; KLANN, E. Activation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. **The Journal of Neuroscience**, 24(28):6352-61, 2004.

HRESKO, R.C.; MUECKLER, M. mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. **The Journal of Biology Chemistry**, 280(49):40406-16, 2005.

HUANG, Y.; KANG, B.N.; TIAN, J.; LIU, Y.; LUO, H.R.; HESTER, L.; SNYDER, S.H. The cationic amino acid transporters CAT1 and CAT3 mediate NMDA receptor activation-dependent changes in elaboration of neuronal processes via the mammalian target of rapamycin mTOR pathway. **The Journal of Neuroscience**, 27 (3): 449-58, 2007.

INAMURA, N.; NAWA, H.; TAKEI, N. Enhancement of translation elongation in neurons by brain-derived neurotrophic factor: implications for mammalian target of rapamycin signaling. **Journal of Neurochemistry**, 95 (5): 1438-45, 2005.

INDA, M.C.; DELGADO-GARCIA, J.M.; CARRION, A.M. Acquisition, consolidation, reconsolidation, and extinction of eyelid conditioning responses require de novo protein synthesis. **The Journal of Neuroscience**, 25 (8): 2070–2080, 2005.

INOKI, K. ; LI, Y.; ZHU, T.; WU, J.; GUAN, K.L. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signaling. **Nature Cell Biology**, 4: 648–657, 2002.

INOKI, K.; CORRADETTI, M.N.; GUAN, K.L. Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease. **Nature genetics**, 37 (1): 19–24, 2005.

INOKI, K.; LI, Y.; XU, T.; GUAN, K. L. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. **Genes and Development**, 17(15):1829–1834, 2003.

IZQUIERDO, I. **Memória**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

IZQUIERDO, I.; BARROS, D.M.; SOUZA, T.M.; SOUZA, M.M. DE; IZQUIERDO, L.A.; MEDINA. J.H. Mechanisms for memory types differ. **Nature**, 393 (6686): 635-636, 1998.

IZQUIERDO, I.; BEVILAQUA, L.R.; ROSSATO, J.I.; BONINI, J.S.; DA SILVA, W.C.; MEDINA, J.H.; CAMMAROTA, M. The connection between the hippocampal and the striatal memory systems of the brain: A review of recent findings. **Neurotoxicity Research**, 10, 113–121, 2006.

IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Zif and the survival of memory. **Science**, 304 (5672): 829–830, 2004.

JACINTO, E.; HALL, M.N. Tor signaling in bugs, brain and brawn. **Nature reviews, Molecular Cell Biology**, 4: 117–126, 2003.

JACINTO, E.; LOEWITH, R.; SCHMIDT, A.; LIN, S. RUEGG, M.A.; HALL, A.; HALL, M.N. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. **Nature Cell Biology**, 6(11): 1122–1128, 2004.

JEFFERIES, H.B.; FUMAGALLI, S.; DENNIS, P.B.; REINHARD, C.; PEARSON, R.B.; Thomas, G. Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70S6K. **The EMBO Journal**, 16: 3693-3704, 1997.

JUDGE, M. E.; QUARTERMAIN, D. Characteristics of retrograde amnesia following reactivation of memory in mice. **Physiology and Behavioral**, 28 (4): 585-590, 1982.

KANDEL, E. R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. **Science**, 294 (5544): 1030-1038, 2001.

KARPOVA, A.; SANNA, P.P.; BEHNISCH, T. Involvement of multiple phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathways in the persistence of late-phase long term potentiation expression. **Neuroscience**, 137(3):833-41, 2006.

KELLY, A.; LAROCHE, S.; DAVIS, S. Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory. **The Journal of Neuroscience**, 23 (12): 5354-5360, 2003.

KERR, D.S.; BEVILAQUA, L.R.; BONINI, J.S.; ROSSATO, J.I.; KOHLER, C.A.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Angiotensin II blocks memory consolidation through an AT₂ receptor-dependent mechanism. **Psychopharmacology**, 179 (3): 529-535, 2005.

KIDA, S.; JOSSELYN, S.A.; DE ORTIZ, S.P.; KOGAN, J.H.; CHEVERE, I.; MASUSHIGE, S.; SILVA, A.J. CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. **Nature Neuroscience**, 5 (4): 348-355, 2002.

KIM, D.H.; SARBASSOV, D.D.; ALI, S.M.; KING, J.E.; LATEK, R.R.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P.; SABATINI, D.M. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. **Cell**, 110(2): 163-75, 2002.

KIM, D.H.; SARBASSOV, D.D.; ALI, S.M.; LATEK, R.R.; GUNTUR, K.V.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P.; SABATINI, D.M. GβL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. **Molecular Cell**, 11(4): 895–904, 2003.

KIMURA, N.; TOKUNAGA, C.; DALAL, S.; RICHARDSON, C.; YOSHINO, K.; HARA, K.; KEMP, B.E.; WITTERS, L.A.; MIMURA, O.; YONEZAWA, K. A possible linkage between AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling pathway. **Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms**, 8 (1): 65–79, 2003.

KNIGHT, R. Contribution of human hippocampal region to novelty detection. **Nature**, 383: 256–259, 1996.

LAFAY-CHEBASSIER, C.; PACCALIN, M.; PAGE, G.; BARC-PAIN, S.; PERAULT-POCHAT, M.C.; GIL, R.; PRADIER, L.; HUGON, J. mTOR/p70S6k signalling alteration by Aβ exposure as well as in APP-PS1 transgenic models and in patients with Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry**, 94 (1): 215–225, 2005.

LATTAL, K.M.; ABEL, T. Behavioral impairments caused by injections of the protein synthesis inhibitor anisomycin after contextual retrieval reverse with time. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, 101: 4667–4672, 2004.

LAWRENCE, J.C. Jr.; ABRAHAM, R.T. PHAS/4E-BPs as regulators of mRNA translation and cell proliferation. **Trends in Biochemical Sciences**, 22: 345-349, 1997.

LEE, J.L.; EVERITT, B.J.; THOMAS, K.L. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. **Science**, 304: 839–843, 2004.

LEES, G.V.; JONES, E.G. Expressive genes Record memories. **Neurobiology of Disease**, 7: 533-536, 2000.

LIN, T.A.; KONG, X.; HAYSTEAD, T.A.; PAUSE, A.; BELSHAM, G.; SONENBERG, N.; LAWRENCE, JR. J.C. PHAS-I as a link between mitogen-activated protein kinase and translation initiation. **Science**, 266: 653-656, 1994.

LJUNGBERG, M.C.; BHATTACHARJEE, M.B.; LU, Y.; ARMSTRONG, D.L.; YOSHOR, D.; SWANN, J.W.; SHELDON, M.; D'ARCANGELO, G. Activation of mammalian target of rapamycin in cytomegalic neurons of human cortical dysplasia. **Annals of neurology**, 60 (4): 420–429, 2006.

LOEWITH, R.; JACINTO, E.; WULLSCHLEGER, S.; LORBERG, A.; CRESPO, J.L.; BONENFANT, D.; OPPLIGER, W.; JENOE, P.; HALL, M.N. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. **Molecular Cell**, 10(3): 457–468, 2002.

LOGOTHETIS, N.K.; SHEINBERG, D.L. Visual object recognition. **Annual Reviews in Neuroscience**, 19: 577-621, 1996.

MACTUTUS, C.F.; RICCIO, D.C.; FERREK, J.M. Retrograde amnesia for old (reactivated) memory: some anomalous characteristics. **Science**, 204(4399): 1319-1320, 1979.

MALAGELADA, C.; RYU, E.J.; BISWAS, S.C.; JACKSON-LEWIS, V.; GREENE, L.A. RTP801 is elevated in Parkinson brain substantia nigral neurons and mediates death in cellular models of Parkinson's disease by a mechanism involving mammalian target of rapamycin inactivation. **The Journal of Neuroscience**, 26(39): 9996–10005, 2006.

MANDOLESI, L.; LEGGIO, M.G.; SPIRITO, F.; PETROSINI, L. Cerebellar contribution to spatial event processing: do spatial procedures contribute to formation of spatial declarative knowledge? **The European Journal of Neuroscience**, 18(9): 2618-2626, 2003.

MANNING, B.D.; TEE, A.R.; LOGSDON, M.N.; BLENIS, J.; CANTLEY, L.C. Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product

tuberin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. **Molecular Cell**, 10(1):151–162, 2002.

MAROUN, M.; AKIRAV, I. Arousal and stress effects on consolidation and reconsolidation of recognition memory. **Neuropsychopharmacology**, 33(2):394-405 2007.

MAYFORD, M.; KANDEL, E. R. Genetic approaches to memory storage. **Genetics approaches to memory storage**, 15: 463-470, 1999.

MCGAUGH, J.L. Memory - a century of consolidation. **Science**, 287 (5451):248-251, 2000.

MILEKIC, M.H.; ALBERINI, C.M. Temporally graded requirement for protein synthesis following memory reactivation. **Neuron**, 36: 521–525, 2002.

MILEUSNIC, R.; LANCASHIRE, C.L.; ROSE, S.P. Recalling an aversive experience by day-old chicks is not dependent on somatic protein synthesis. **Learning and Memory**, 12:615-619, 2005.

MISANIN, J.R.; MILLER, R.R.; LEWIS, D.J. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. **Science**, 160: 554–555, 1968.

MONCADA, D.; VIOLA, H. 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, 2006.

MORRIS, R.G.; ANDERSON, E.; LYNCH, G.S.; BAUDRY, M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. **Nature** 319: 774-776, 1986.

MOSES, S.N.; COLE, C.; DRISCOLL, I.; RYAN, J.D. Differential contributions of hippocampus, amygdala and perirhinal cortex to recognition of novel objects, contextual stimuli and stimulus relationships. **Brain Research Bulletin**, 67(1-2):62-76, 2005.

MUMBY, D.G.; GASKIN, S.; GLENN, M.J.; SCHRAMEK, T.E.; LEHMANN, H. Hippocampal damage and exploratory preferences in rats: memory for objects, places, and contexts. **Learning and Memory**, 9(2):49-57, 2002.

NADER, K. Memory traces unbound. **Trends in Neuroscience**, 26 (9): 465-6, 2003.

NADER, K., SCHAFE, G.E.; LE DOUX, J.E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. **Nature**, 406 (6797): 722–726, 2000a.

NADER, K.; SCHAFE, G.E.; LE DOUX, J.E. The labile nature of consolidation theory. **Nature Reviews Neuroscience**. 1: 216–219, 2000b.

O'SHEA, C.; KLUPSCH, K.; CHOI, S.; BAGUS, B.; SORIA, C.; SHEN, J.; MCCORMICK, F. STOKOE, D. Adenoviral proteins mimic nutrient/growth signals to activate the mTOR pathway for viral replication. **The EMBO Journal**, 24(6): 1211–1221, 2005.

PARSONS, R.G.; GAFFORD, G.M.; BARUCH, D.E.; RIEDNER, B.A.; HELMSTETTER, F.J. 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):1853-9, 2006.

PARSONS, R.G.; GAFFORD, G.M.; HELMSTETTER, F.J. 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(50): 12977-83, 2006.

PAUSE, A.; BELSHAM, G.J.; GINGRAS, A.C.; DONZE, O.; LIN, T.A.; LAWRENCE, JR. J.C.; SONENBERG, N. Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. **Nature**, 371: 762-767, 1994.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**, Academic Press, San Diego, 1986.

PEARSON, R.B.; DENNIS, P.B.; HAN, J.W.; WILLIAMSON, N.A.; KOZMA, S.C.; WETTENHALL, R.E.; THOMAS, G. The principal target of rapamycin-induced p70s6k inactivation is a novel phosphorylation site within a conserved hydrophobic domain. **The EMBO Journal**, 14: 5279–5287, 1995.

PEDREIRA, M.E.; PEREZ-CUESTA, L.M.; MALDONADO, H. Reactivation and reconsolidation of long-term memory in the crab *Chasmagnathus*: protein synthesis requirement and mediation by NMDA-type glutamatergic receptors. **The Journal of Neuroscience**, 22: 8305-8311, 2002.

POWER, A.E.; BERLAU, D.J.; MCGAUGH, J.L.; STEWARD, O. Anisomycin infused into the hippocampus fails to block "reconsolidation" but impairs extinction: The role of re-exposure duration. **Learning and Memory**, 13(1): 27-34, 2006.

PRZYBYSLAWSKI, J.; ROULLET, P.; SARA, S.J. Attenuation of emotional and nonemotional memories after their reactivation: Role of beta adrenergic receptors. **Journal of Neuroscience**, 19: 6623–6628, 1999.

PRZYBYSLAWSKI, J.; SARA, S.J. Reconsolidation of memory after its reactivation. **Behavioural brain research**, 84: 241–246, 1997.

PULLEN, N.; THOMAS, G. The modular phosphorylation and activation of p70S6K. **FEBS letters**, 410 (1): 78–82, 1997.

RAINER, G.; MILLER, E.K. Effects of visual experience on the representation of objects in the prefrontal cortex. **Neuron**, 27:179-89, 2000.

RAUGHT, B.; GINGRAS, A.C.; SONENBERG, N. The target of rapamycin (TOR) proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, 98 (13): 7037–7044, 2001.

RAVIKUMAR, B.; VACHER, C.; BERGER, Z.; DAVIES, J.E.; LUO, S.; OROZ, L.G.; SCARAVILLI, F.; EASTON, D.F.; DUDEN, R.; O'KANE, C.J.; RUBINSZTEIN, D.C. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. **Nature genetics**, 36 (6): 585–595, 2004.

REED, J.M.; SQUIRE, L.R.; PATALANO, A.L.; SMITH, E.E.; JONIDES, J. Learning about categories that are defined by object-like stimuli despite impaired declarative memory. **Behavioural Neuroscience**, 113(3):411-419, 1999.

REILING, J.H.; SABATINI, D.M. Stress and mTOR signaling. **Oncogene** 25: 6373–6383, 2006.

RICKARD, N. S., POOT, A. C., GIBBS, M. E.; NG, K. T. Both non-NMDA and NMDA glutamate receptors are necessary for memory consolidation in the day-old chick. **Behavioral and Neural Biology**, 62: 33–40, 1994.

RIEDEL, G., PLATT, B.; MICHEAU, J. Glutamate receptor function in learning and memory. **Behavioural Brain Research**, 140: 1–47, 2003.

RIESENHUBER, M.; POGGIO, T. Neural mechanisms of object recognition. **Current Opinion in Neurobiology**, 12 (2): 162-8, 2002.

ROBBINS, T.W.; MURPHY, E. R. Behavioural pharmacology: 40+years of progress, with a focus on glutamate receptors and cognition. **Trends in Pharmacological Sciences**, 27: 141–148, 2006.

RODRIGUEZ-ORTIZ, C.J.; DE LA CRUZ, V.; GUTIÉRREZ, R.; BERMUDEZ-RATTONI, F. Protein synthesis underlies post-retrieval memory consolidation to a restricted degree only when updated information is obtained. **Learning and Memory** 12: 533–537, 2005.

ROSSATO, J.I.; BEVILAQUA, L.R.M.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Retrieval induces hippocampal-dependent reconsolidation of spatial memory. **Learning and Memory**, 13(4): 431-40, 2006

ROSSATO, J.I.; BEVILAQUA, R.M.; MYSKIW, J.C.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, 14: 36-46, 2007.

SABATINI, D.M. mTOR and cancer: insights into a complex relationship. **Nature Review Cancer**, 6: 729–734, 2006.

SANGHA, S.; SCHEIBENSTOCK, A.; MORROW, R.; LUKOWIAK, K. Extinction requires new RNA and protein synthesis and the soma of the cell right pedal dorsal 1 in *Lymnaea stagnalis*. **The Journal of Neuroscience**, 23(30): 9842–9851, 2003.

SANNA, P. P.; CAMMALLERI, M.; BERTON, F.; SIMPSON, C.; LUTJENS, R.; BLOOM, F. E.; FRANCESCONI, W. Phosphatidylinositol 3-Kinase Is Required for the Expression But Not for the Induction or the Maintenance of Long-Term Potentiation in the Hippocampal CA1 Region. **The Journal of Neuroscience**, 22 (9): 3359-3365, 2002.

SARA, S.J. Retrieval and reconsolidation: Toward a neurobiology of remembering. **Learning of Memory**, 7(2): 73–84, 2000.

SARBASSOV, D.D.; ALI, S.M.; KIM, D.H.; GUERTIN, D.A.; LATEK, R.R.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P.; SABATINI, D.M. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. **Current biology:CB**, 14 (14): 1296-302, 2004.

SARBASSOV, D.D.; ALI, S.M.; SENGUPTA, S.; SHEEN, J.H.; HSU, P.P.; BAGLEY, A.F.; MARKHARD, A.L.; SABATINI, D.M. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. **Molecular Cell**, 22(2):159-68, 2006.

SARBASSOV, D.D.; GUERTIN, D.A.; ALI, S.M.; SABATINI, D.M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. **Science**, 307 (5712): 1098–1101, 2005.

SCHRATT, G.M.; NIGH, E.A.; CHEN, W.G.; HU, L.; GREENBERG, M.E. BDNF regulates the translation of a select group of mRNAs by a mammalian target of rapamycin-phosphatidylinositol 3-kinasedependent pathway during neuronal development. **The Journal of Neuroscience**, 24, 7366–7377, 2004.

SCHREIBER, S.L. Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. **Science**, 251:283–7, 1991.

SEHGAL, S.N.; BAKER, H.; VEZINA, C. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic, II: fermentation, isolation and characterization. **The Journal of Antibiotics (Tokyo)**, 28(10):727-32, 1975.

SHAW, R.J.; CANTLEY, L.C. Ras, PI(3)K and mTOR signaling controls tumor cell growth. **Nature**, 441: 424-430, 2006.

SPEAR, N.E. Retrieval of memory in animals. **Psychology Review**, 80:163-194., 1973

SQUIRE, L. R. **Memory and Brain**. Oxford University Press, New York, p 3, 1987.

SQUIRE, L.R.; KANDEL, E.R. **Memória: da mente às moléculas**. Porto Alegre: Artmed, 2003.

SQUIRE, L.R.; WIXTED, J.T.; CLARK, R.E. Recognition memory and the medial temporal lobe: a new perspective. **Nature Reviews. Neuroscience**, 8(11):872-83, 2007.

STEWART O.; SCHUMAN, E.M. Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. **Annual Review of Neuroscience**, 24: 299–325, 2001.

STOLLHOFF, N.; MENZEL, R.; EISENHARDT, D. Spontaneous recovery from extinction depends on the reconsolidation of the acquisition memory in an appetitive learning paradigm in the honeybee (*Apis mellifera*). **Journal of Neuroscience**, 25: 4485–4492, 2005.

SUGIYAMA, H.; PAPST, P.; GELFAND, E.W.; TERADA N. p70S6 kinase sensitivity to rapamycin is eliminated by amino acid substitution of Thr229. **Journal Immunology**, 157: 656–660, 1996.

SUMMERS, M.J.; CROWE, S.F.; NG, K.T. Administration of D,L-2-amino-5-phosphonovaleric acid (AP5) induces transient inhibition of reminder-activated memory retrieval in day-old chicks. **Brain Research, Cognitive Brain Research**, 5: 311-321, 1997.

SWIECH, L.; PERYCZ, M.; MALIK, A.; JAWORSKI, J. Role of mTOR in physiology and pathology of the nervous system. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics**, 1784(1): 116-32, 2008.

SZAPIRO, G.; GALANTE, J.M.; BARROS, D.M.; STEIN, M. L. DE; VIANNA, M.R.M.; IZQUIERDO, L.A.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Molecular mechanisms of memory retrieval. **Neurochemical Research**, 27(11): 1491-1498, 2002

TAKEI, N.; INAMURA, N.; KAWAMURA, M.; NAMBA, H.; HARA, K.; YONEZAWA, K.; NAWA, H. Brain-derived neurotrophic factor induces mammalian target of rapamycin-dependent local activation of translation machinery and protein synthesis in neuronal dendrites. **The Journal of Neuroscience**, 24 (44): 9760-9, 2004.

TAKEI, N.; KAWAMURA, M.; HARA, K.; YONEZAWA, K.; NAWA, H. Brain-derived neurotrophic factor enhances neuronal translation by activating multiple initiation processes: comparison with the effects of insulin. **The Journal of Biological Chemistry**, 276 (46): 42818-42825, 2001.

TANG, S.J.; REIS, G.; KANG, H.; GINGRAS, A.C.; SONENBERG, N.; SCHUMAN, E.M. A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.**, 99(1): 467–472, 2002.

TAUBENFELD, S.M.; MILEKIC, M.H.; MONTI, B.; ALBERINI, C.M. The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBP β . **Nature Neuroscience**, 4: 813-818, 2001.

TEE, A.R.; MANNING, B.D.; ROUX, P.P.; CANTLEY, L.C.; BLENIS, J. Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by

acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. **Current Biology**, 13 (15): 1259–1268, 2003.

TERADA, N.; TAKASE, K.; PAPST, P.; NAIRN, A.C.; GELFAND, E.W. Rapamycin inhibits ribosomal protein synthesis and induces G1 prolongation in mitogen-activated T lymphocytes. **Journal of Immunology**, 155(7): 3418-3426, 1995.

TORRAS-GARCIA, M.; LELONG, J.; TRONEL, S.; SARA, S. J. Reconsolidation after remembering an odor-reward association requires NMDA receptors. **Learning and Memory**, 12(1): 18–22, 2005.

TRONEL, S.; SARA, S. J. Blockade of NMDA receptors in prelimbic cortex induces an enduring amnesia for odor-reward associative learning. **Journal of Neuroscience**, 23, 5472–5476, 2003.

TRONSON, N. C.; TAYLOR, J. R. Molecular mechanisms of memory reconsolidation. **Nature Reviews Neuroscience**, 8: 262–275, 2007.

TRONSON, N. C.; WISEMAN, S. L.; OLAUSSON, P.; TAYLOR, J. R. Bidirectional behavioral plasticity of memory reconsolidation depends on amygdalar protein kinase A. **Nature Neuroscience**, 9: 167–169, 2006.

VEZINA, C.; KUDELSKI, A.; SEHGAL, S.N. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic, I: taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. **The Journal of Antibiotics (Tokyo)**, 28(10):721-6, 1975

VIOLA, H.; FURMAN, M.; IZQUIERDO, L.A.; ALONSO, M.; BARROS, D.M.; DE SOUZA, M.M.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Phosphorylated cAMP response element-binding protein as a molecular marker of memory processing in rat hippocampus: effect of novelty. **The Journal of Neuroscience**, 20(23):RC112, 2000.

WAN, H.; AGGLETON, J.P.; BROWN, M.W. Different contributions of the hippocampus and perirhinal cortex to recognition memory. **The Journal of Neuroscience**, 19:1142-1148, 1999.

WANG, L.; HARRIS, T.E.; LAWRENCE, J.C.Jr. 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):15619-27, 2008

WINOGRAD, M.; VIOLA, H. Detection of novelty, but not memory of spatial habituation, is associated with an increase in phosphorylated cAMP response element-binding protein levels in the hippocampus. **Hippocampus** 14:117-123, 2004

WULLSCHLEGER, S.; LOEWITH, R.; HALL, M.N. TOR signaling in growth and metabolism. **Cell**, 124(3): 471-84, 2006

XIANG, J.Z.; BROWN, M.W. Neuronal responses related to long-term recognition memory processes in prefrontal cortex. **Neuron**, 42:817-829, 2004.

YANG, Q.; GUAN, K. L. Expanding mTOR signaling. **Cell Research**. 17(8): 666-81, 2007.

ANEXO

ANEXO 1 - Artigo publicado no periódico *Neurobiology of Learning and Memory*, v. 0, n. 0, 2008.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)