

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

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.	26
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
G β L	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 G β L (*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 protéica, 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).

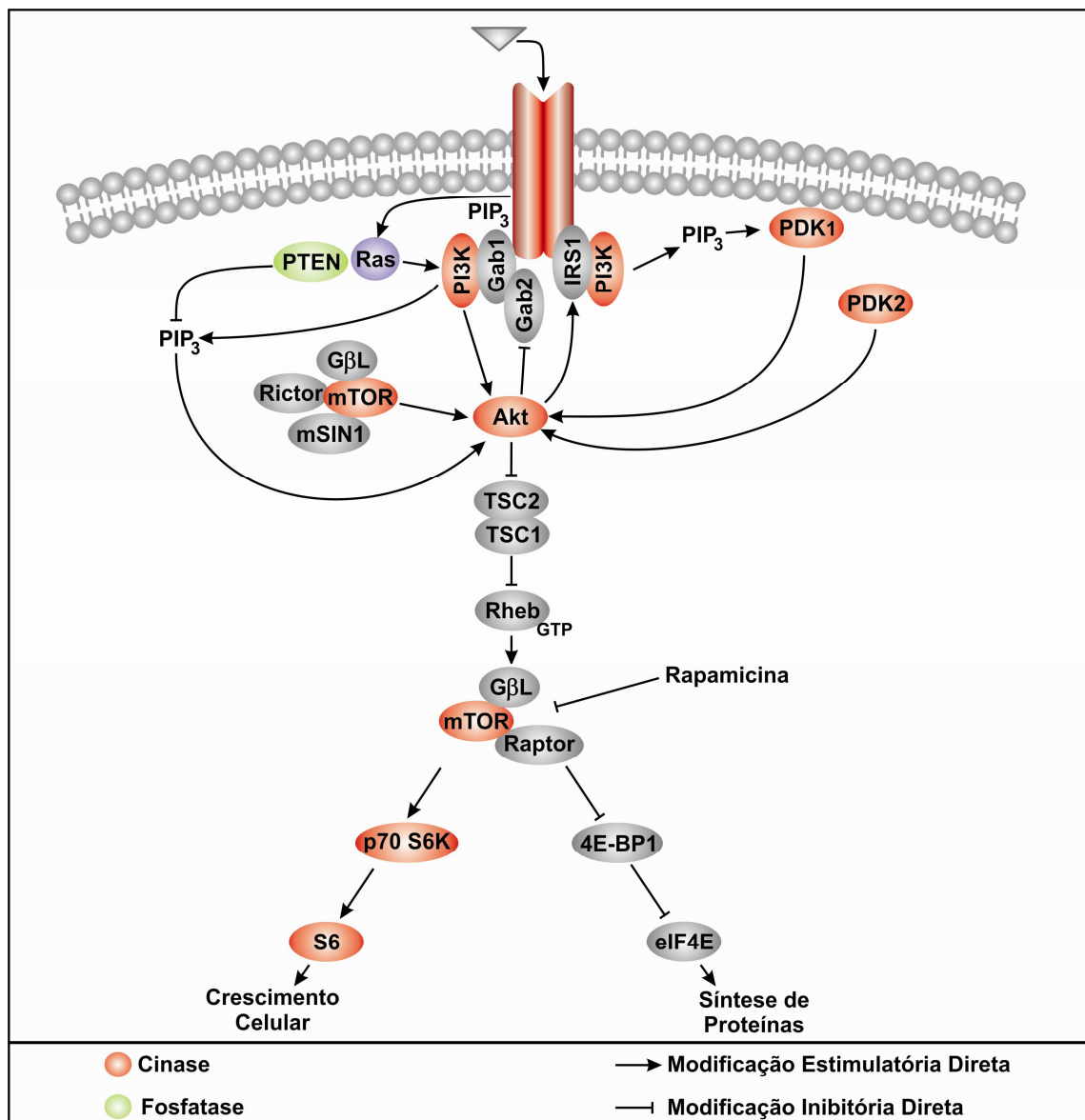


FIGURA 1 – Figura ilustrativa da via de sinalização mTOR.

A memória de reconhecimento 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 250 g. 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 0,2 mm de calibre posicionadas 1,0mm acima da região CA1 do hipocampo dorsal, seguindo as coordenadas (A -4.2, L± 3.0, V -2.0 mm a partir do bregma) do Atlas de Paxinos e Watson (1986), conforme ilustra a Figura 2.

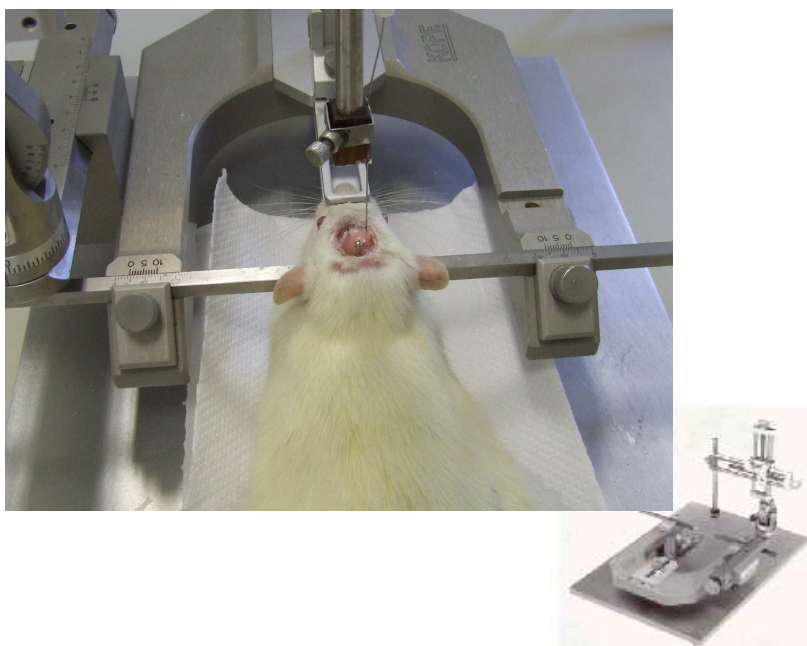


FIGURA 2 - Foto de um animal sendo submetido à cirurgia estereotáxica para a implantação de cânulas de infusão na região CA1 do hipocampo dorsal. No detalhe, foto do aparelho estereotáxico.

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 75 mg/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 (0,8 μ l 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).

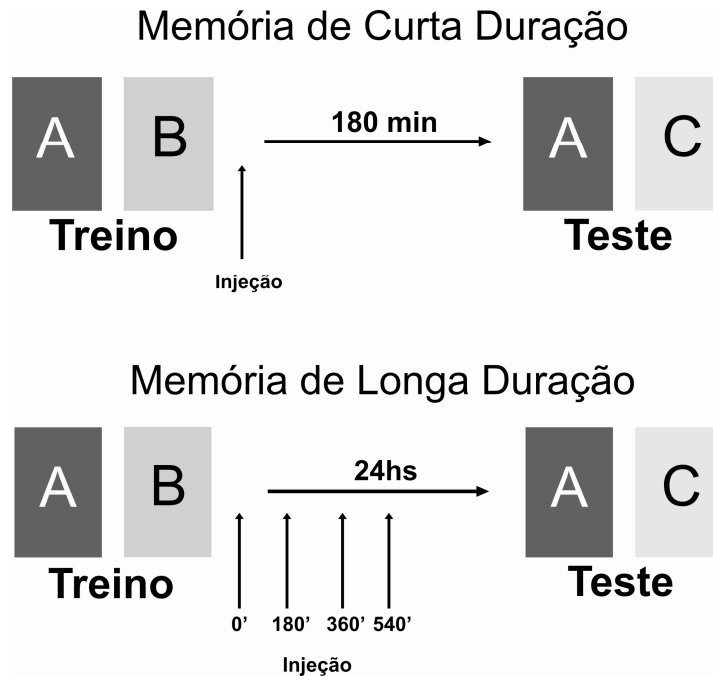


FIGURA 5 – Esquema ilustrativo dos protocolos de treino e teste no paradigma de reconhecimento de objetos.

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 (0,8 μ l 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.

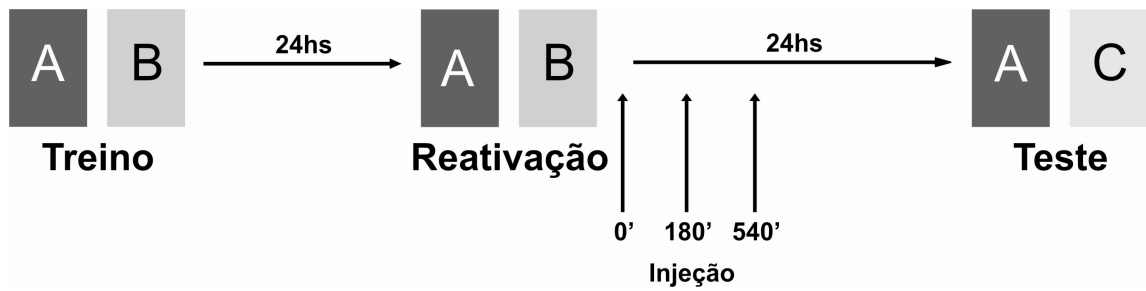
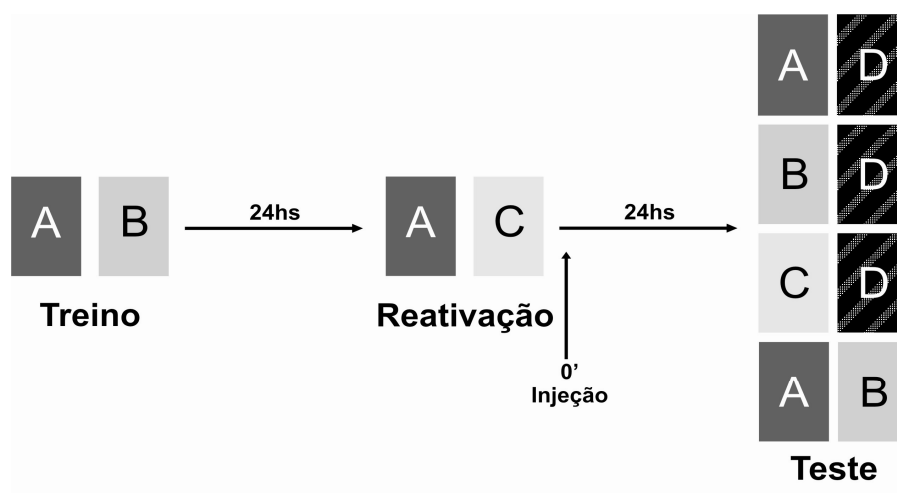


FIGURA 6 – Esquema ilustrativo do protocolo de reativação da memória de reconhecimento de objetos com objetos familiares.

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 (0,8 μ l por lado) veículo (VEH; 0,1% DMSO em salina 0,9%) ou rapamicina (RAPA; 20 pmol), 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).



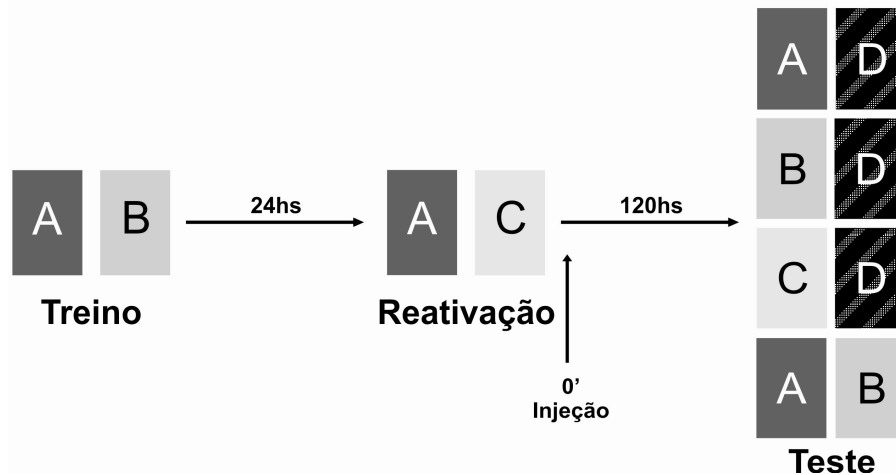


FIGURA 7 – Esquema ilustrativo dos protocolos de reativação da memória de reconhecimento de objetos com estímulo novo.

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 60 cm de comprimento por 40 cm 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).

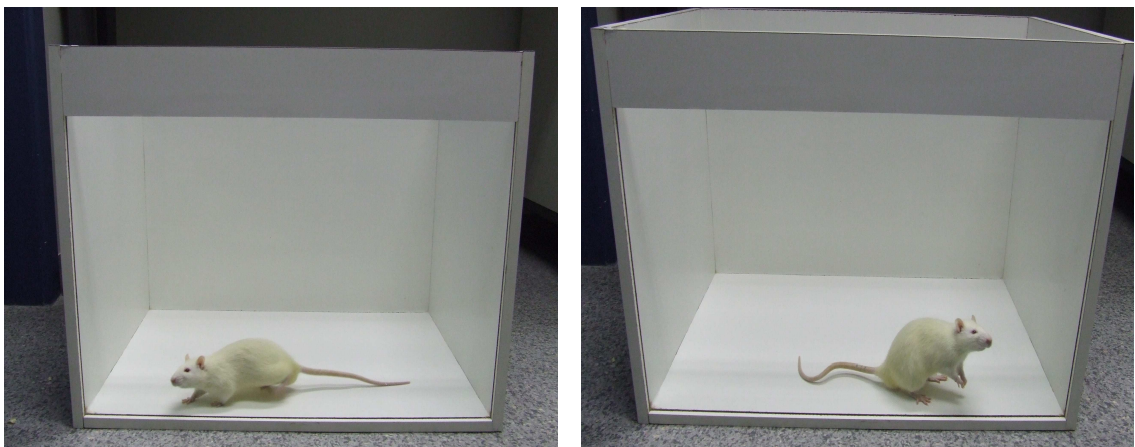


FIGURA 8 - Fotografia de um rato explorando o campo aberto.

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 40 cm de comprimento em cada braço, posicionada a 1 m 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 2 m de diâmetro e 0,6 m de altura). A piscina está dividida em 4 quadrantes imaginários idênticos (Figura 10). Submersa a 2 cm da água (mantida entre 21–23°C durante todo o experimento), oculta da vista do sujeito experimental, encontra-se uma plataforma de escape de 12 cm 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 (0,8 µl por lado), veículo (VEH; 0,1% DMSO em salina 0,9%) ou rapamicina (RAPA; 20 pmol) 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).

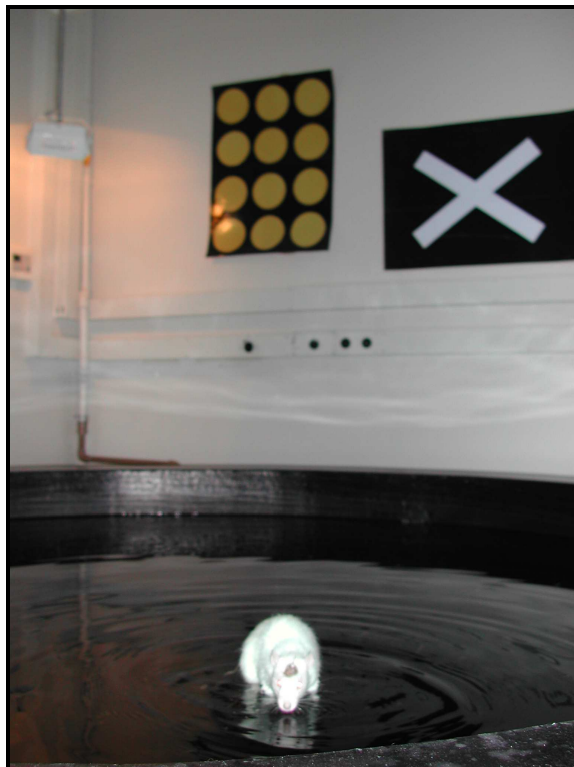


FIGURA 11 - Fotografia de um rato sobre a plataforma de escape no LAM.

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 25,0 cm, 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 5,0 cm de altura por 8,0 cm de largura (Figura 12). Os animais receberam infusão bilateral, na região CA1 do hipocampo dorsal (0,8 µl por lado), de veículo (VEH; 0,1% DMSO em salina 0,9%) ou rapamicina (RAPA; 20 pmol) 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 0,5 mA 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.

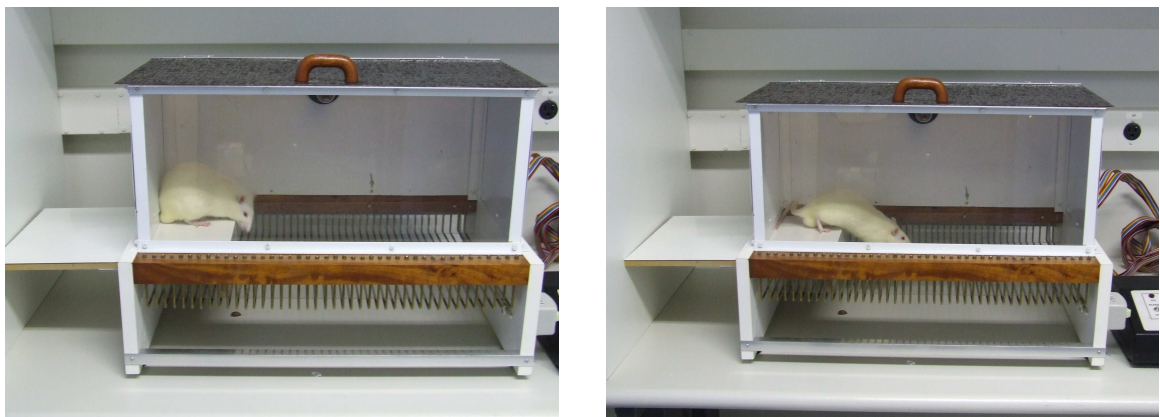


FIGURA 12 - Fotografia da caixa de Esquiva Inibitória.

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 2 mm² do local desejado (Figura 13).

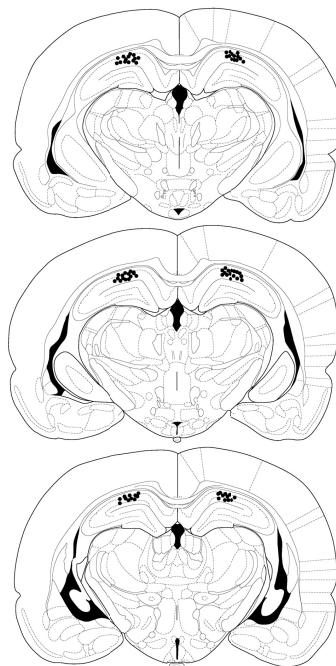


FIGURA 13 - Desenho do cérebro de rato adquirido do Atlas de Paxinos e Watson, 1986, mostrando a localização da implantação das cânulas de infusão na região CA1 do hipocampo dorsal.

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 (20 pmol/0,8 µl/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.

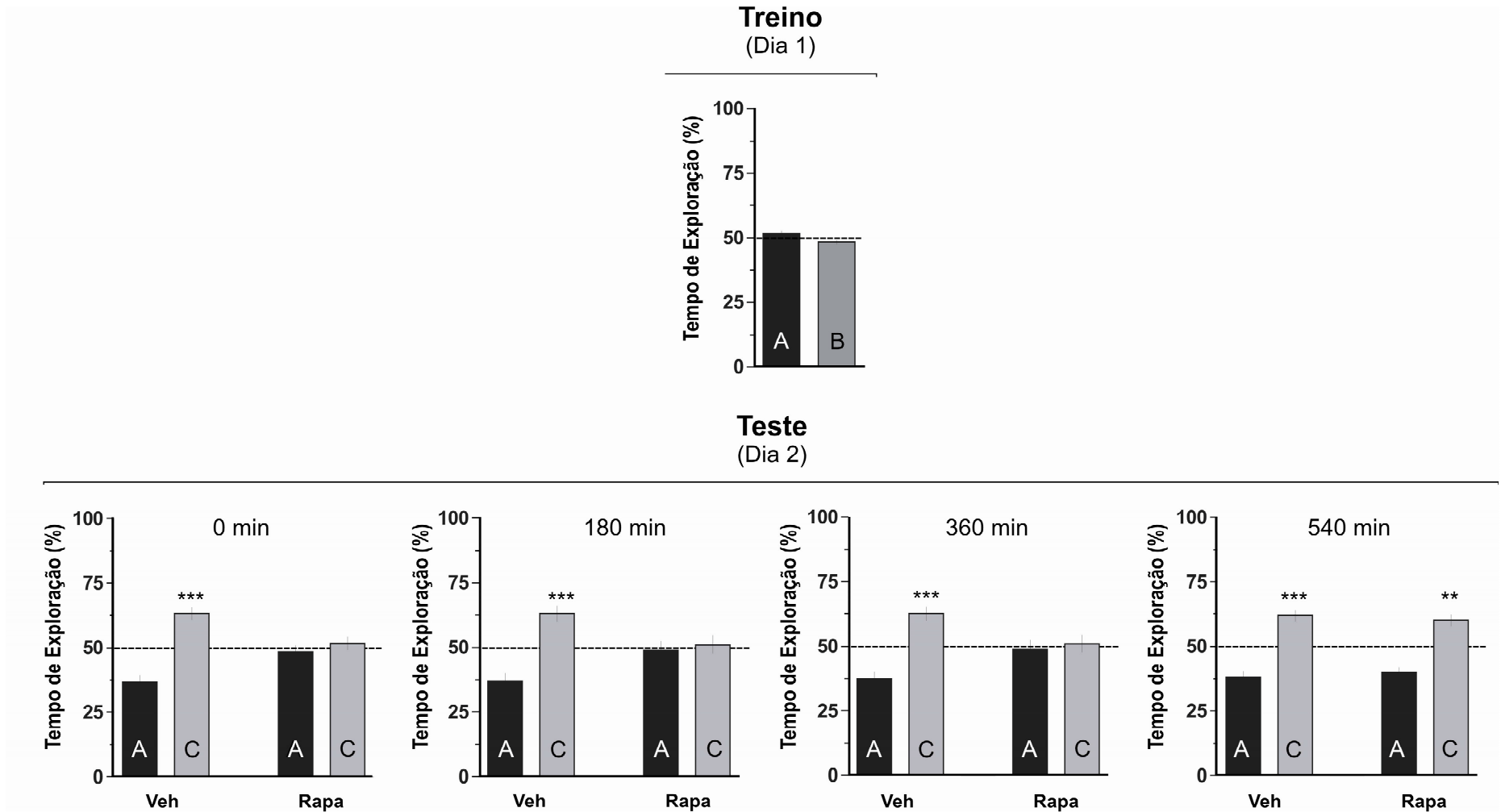


FIGURA 14 - Atividade da mTOR no hipocampo dorsal é requerida durante uma restrita janela temporal após o treino para a consolidação da memória de reconhecimento de objetos. No dia 1 (Sessão de treino) os ratos foram expostos a dois diferentes objetos (A e B) por 5 minutos, imediatamente, 180, 360 ou 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 (20 pmol/0,8 µl/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.

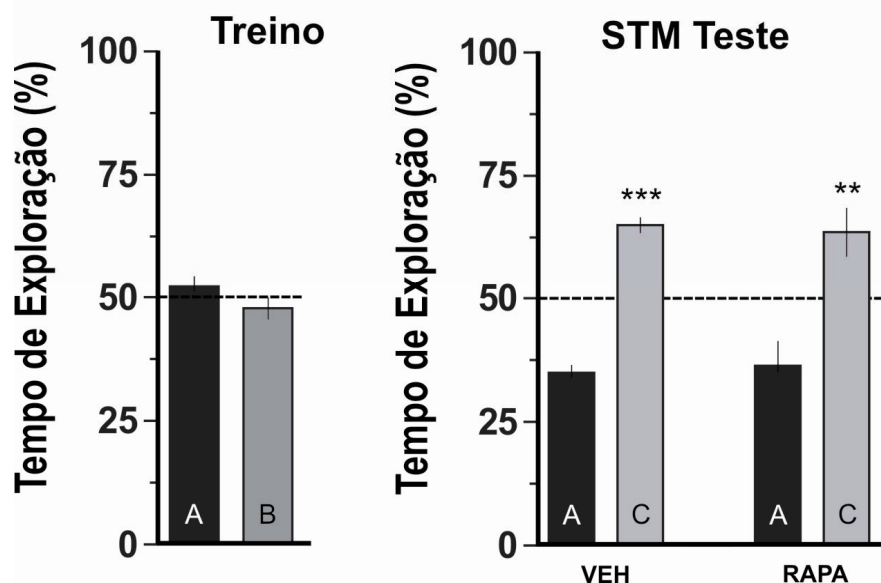


FIGURA 15 - Inibição pós-treino da mTOR no hipocampo não afeta a memória de curta duração para a tarefa de reconhecimento de objetos. No Dia 1 (Sessão de treino), os ratos foram expostos a dois objetos distintos (A e B) por 5 min e, imediatamente após, receberam infusão bilateral (0,8 µl/lado) de veículo (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 (20 pmol/0,8 µl/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 (20 pmol/0,8 µl/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 (20 pmol/0,8 µl/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 esquivas 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).

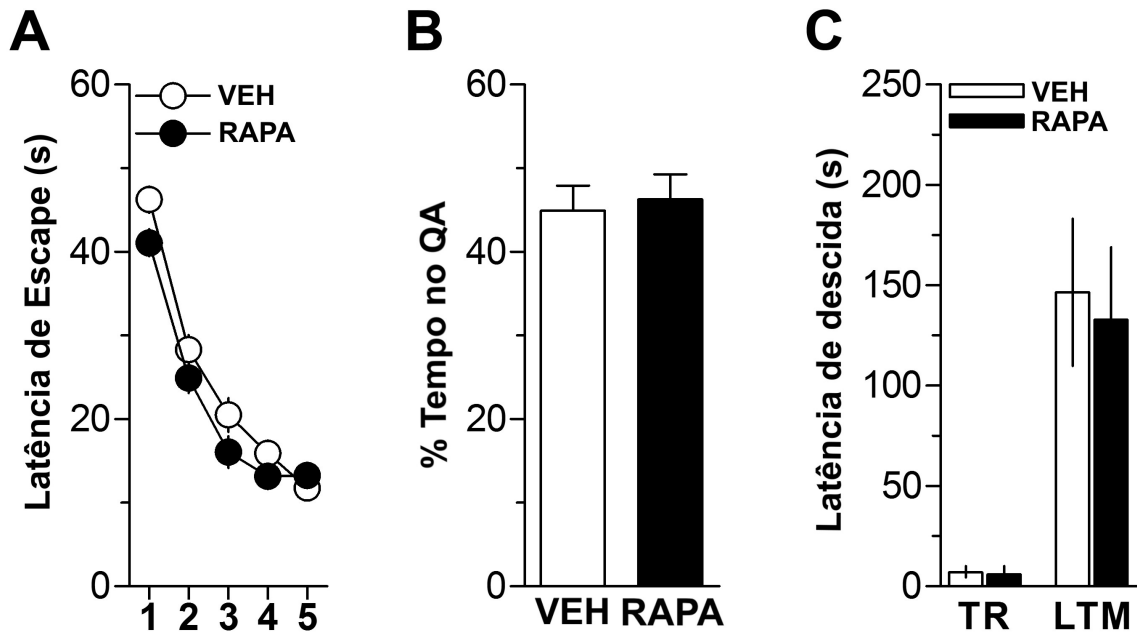


FIGURA 16 - A inibição da mTOR hipocampal 24 horas antes do treino não afeta a aquisição nem a retenção de memórias dependentes do hipocampo. A) Média das latências de escape durante os cinco dias de aquisição do aprendizado espacial para ratos que receberam veículo (0,1% de DMSO em salina; VEH; círculos brancos) ou rapamicina (20 pmol/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 (20 pmol/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 (20 pmol/0,8 µl/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 (20 pmol/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.

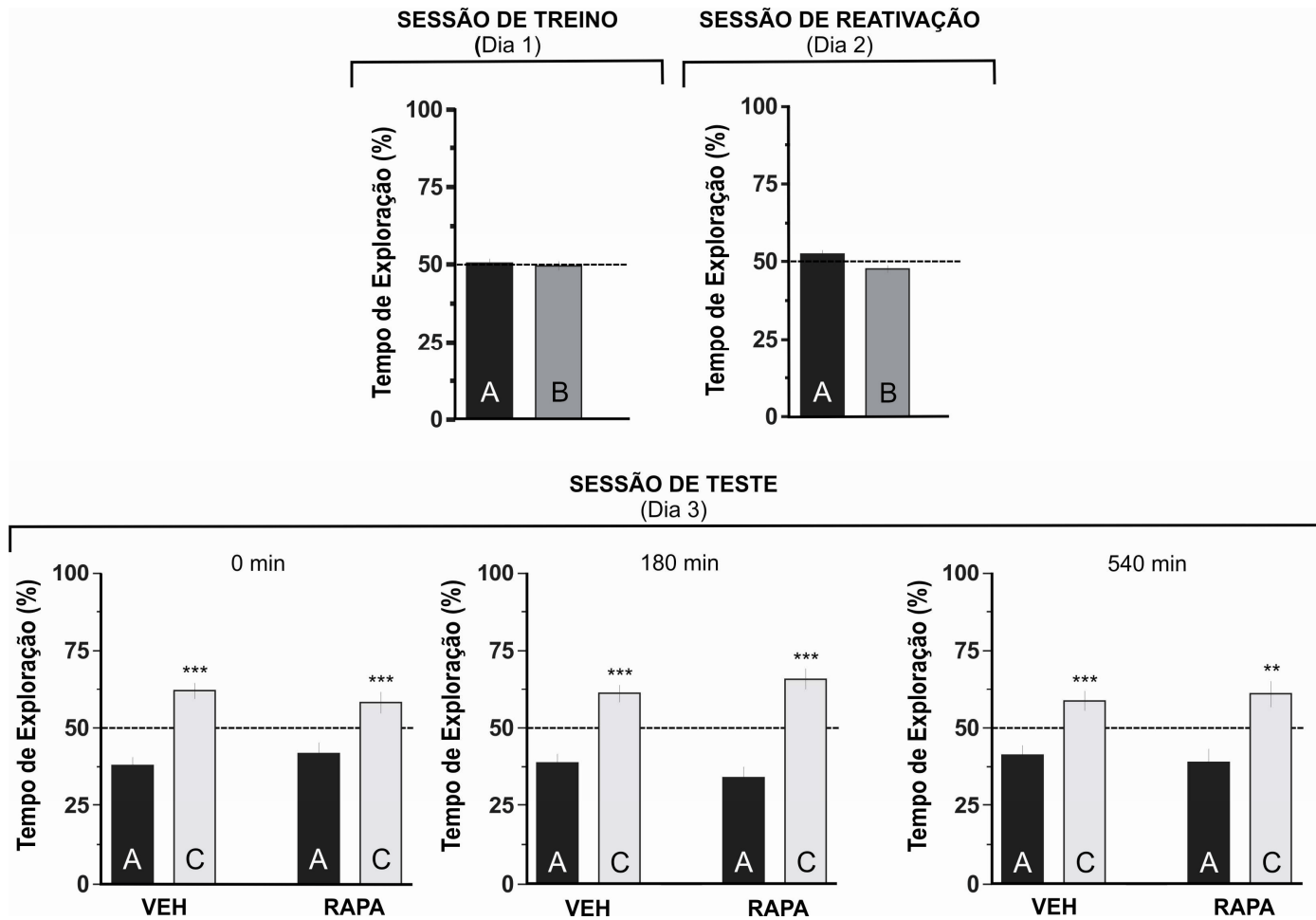


FIGURA 17 – Inibição hipocampal de mTOR após uma sessão de reativação envolvendo exposição a objetos familiares não afeta a posterior retenção da memória de reconhecimento de longa duração. Ratos com cânulas implantadas na região CA1 do hipocampo dorsal foram expostos a dois objetos distintos (A e B) 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 (20 pmol/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 (20 pmol/0,8 µl/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 (20 pmol/0,8 µl/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.

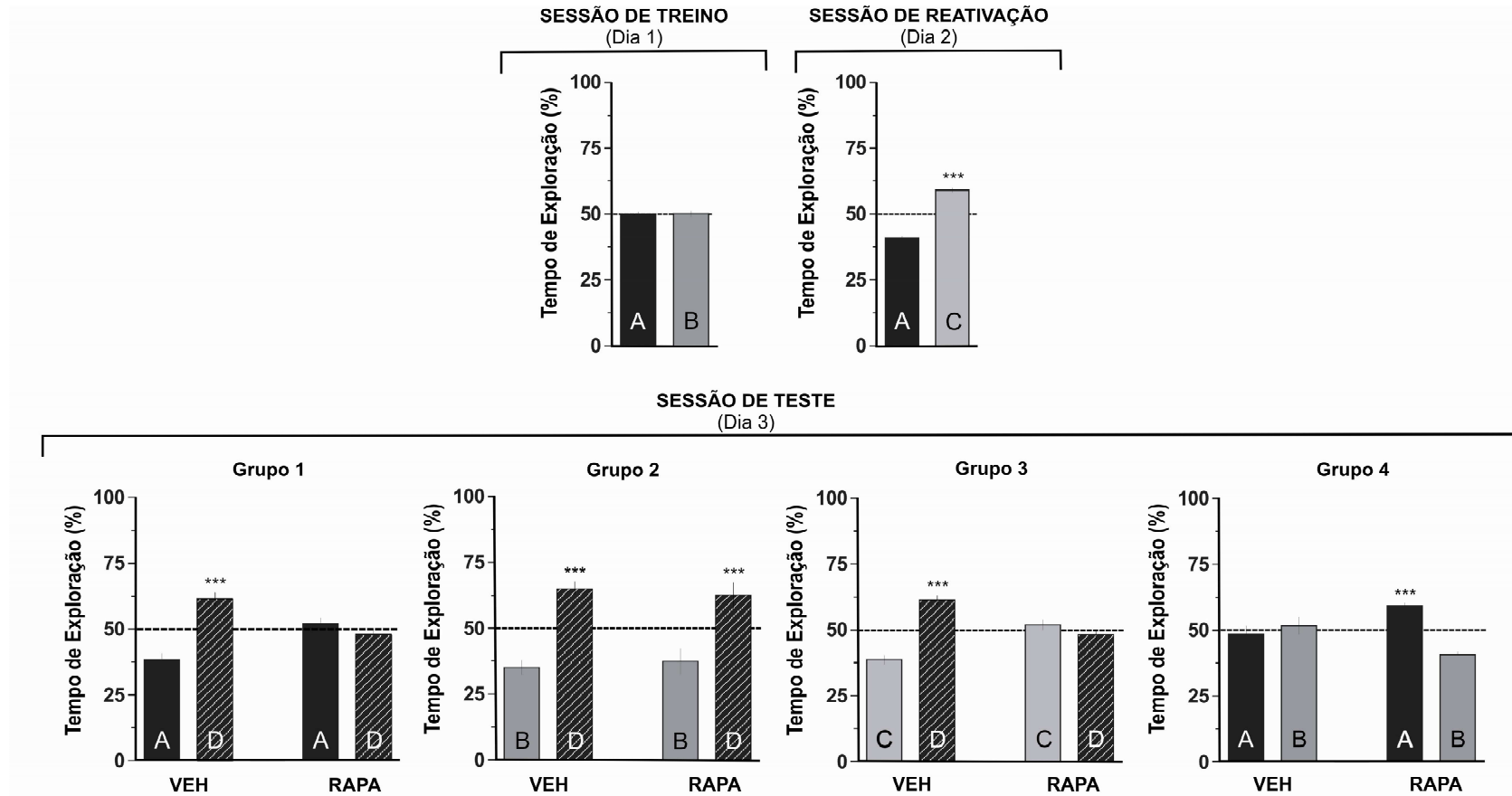


FIGURA 18 - Inibição da mTOR hipocampal depois da reativação da memória na presença de um objeto familiar e um objeto novo prejudica a memória desses objetos sem afetar a memória do outro objeto familiar não apresentado durante a sessão de reativação. Ratos com cânulas implantadas na região CA1 do hipocampo 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 (20 pmol/0,8 µl/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).

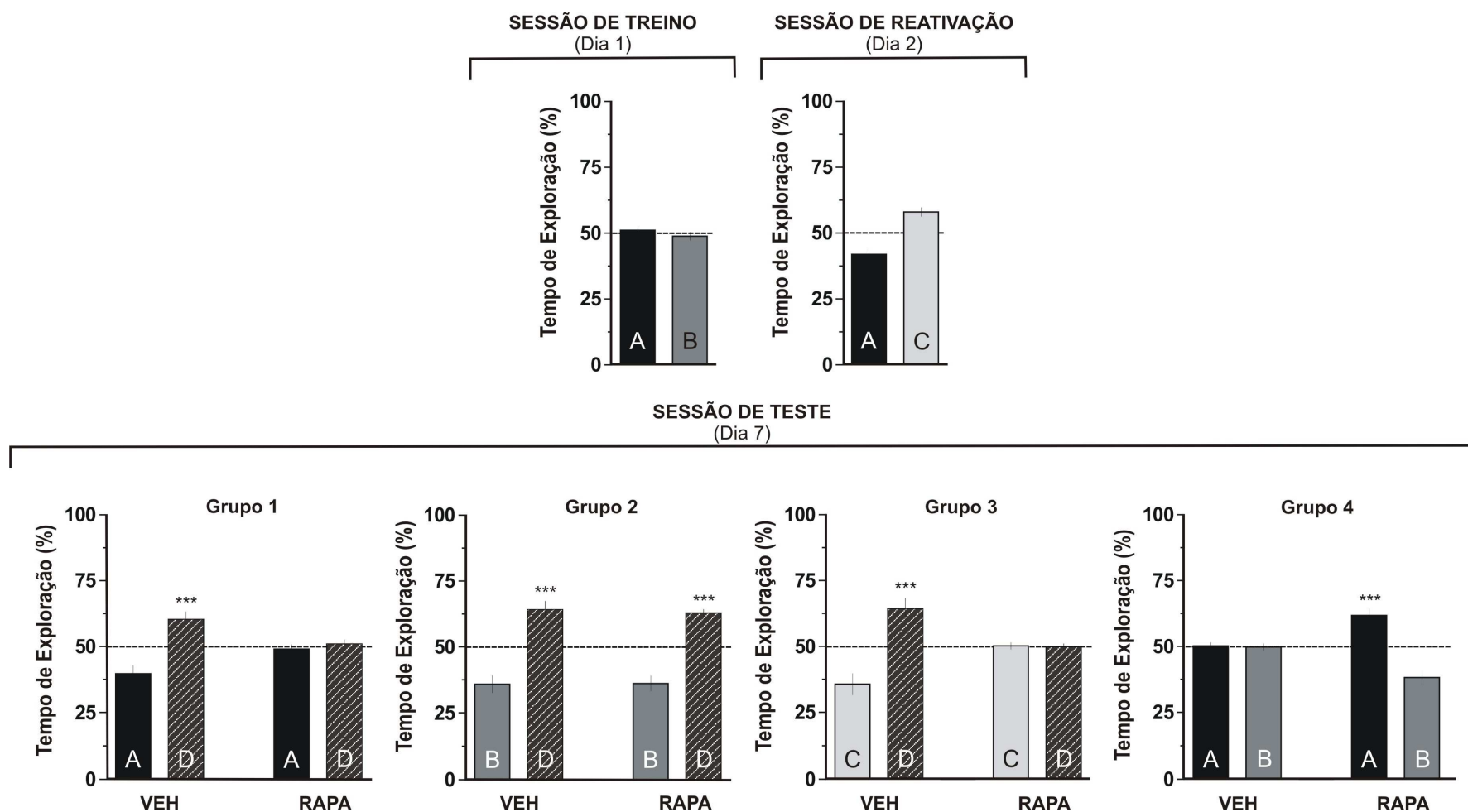
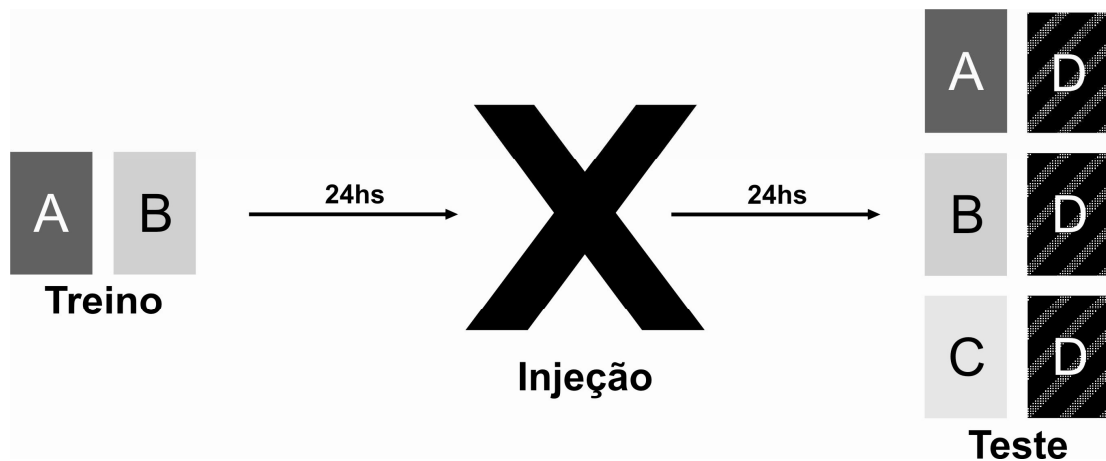


FIGURA 19 - O efeito amnésico produzido pela inibição hipocampal de mTOR depois da sessão de reativação da memória na presença de um objeto familiar e um objeto novo. Ratos com cânulas implantadas na região CA1 do hipocampo dorsal foram expostos a dois objetos diferentes (A e B) por 5 minutos (Sessão 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 (20 pmol/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 (20 pmol/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.



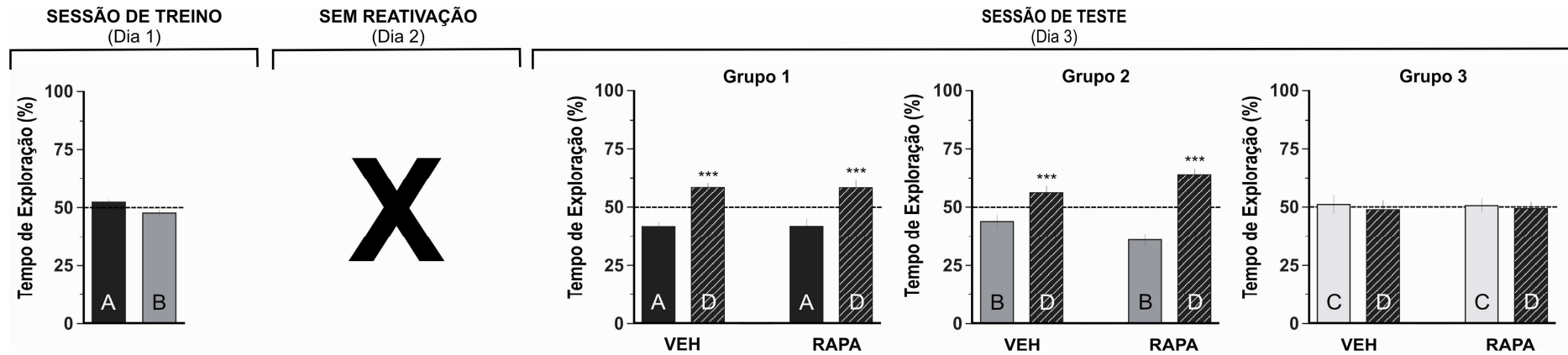
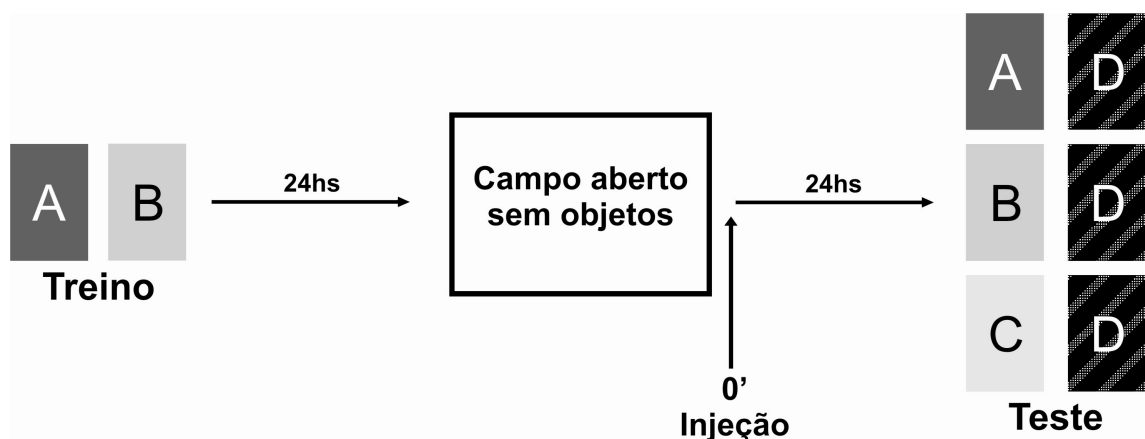


FIGURA 20 - A inibição de mTOR hipocampal 24 horas após a sessão de treino na ausência de eventos comportamentais relevantes não afeta a retenção da memória de reconhecimento de objetos. Ratos com cânulas implantadas na região CA1 do hipocampo dorsal foram expostos a dois objetos distintos (A e B) por 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 (20 pmol/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 (20 pmol/0,8 µl/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.



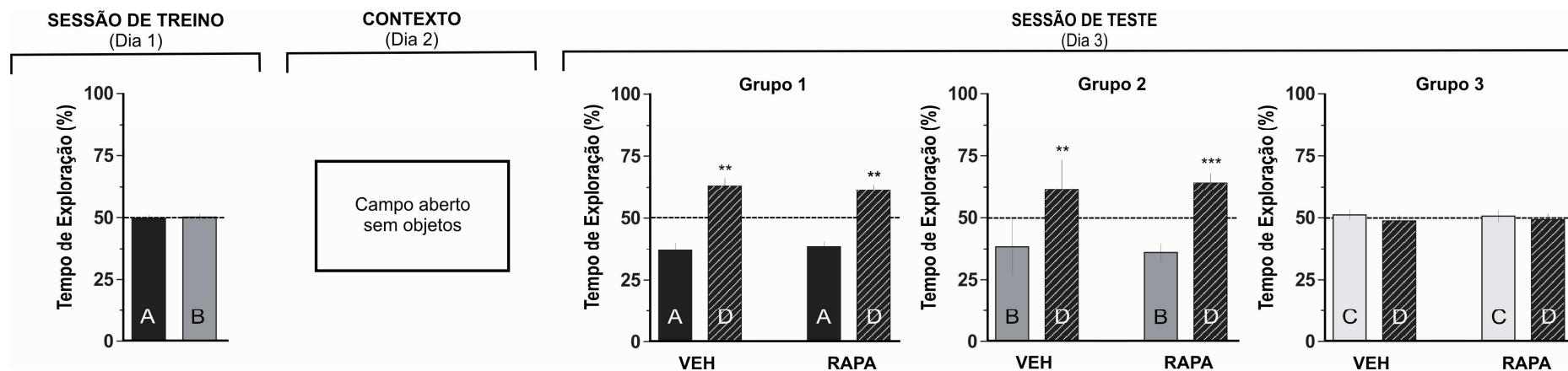
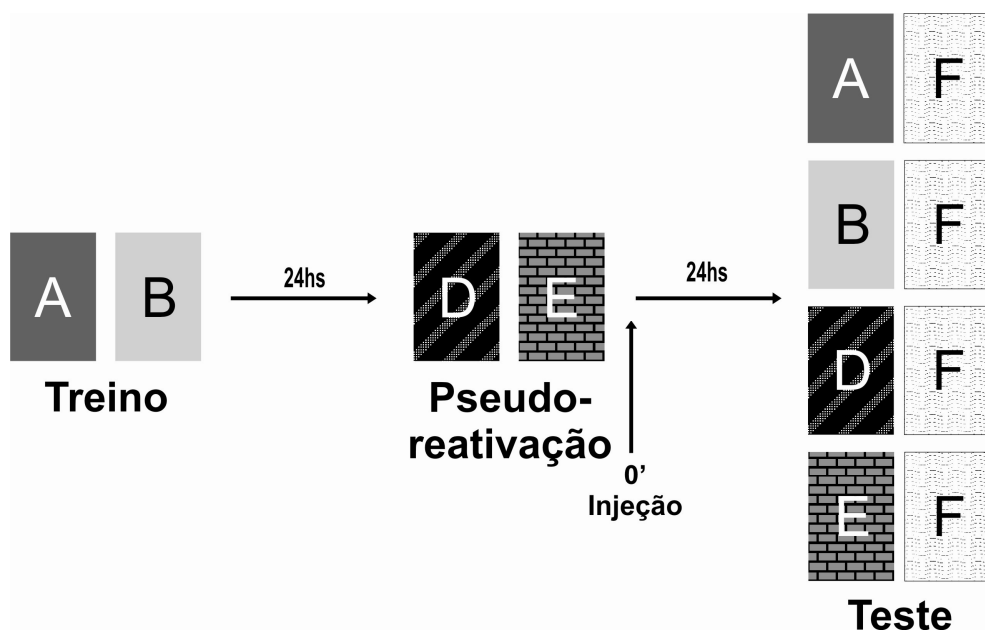


FIGURA 21 - A inibição da mTOR hipocampal 24 horas após a sessão de treino na ausência de eventos comportamentais relevantes não afeta a retenção da memória de reconhecimento de objetos. Ratos com cânulas implantadas na região CA1 do hipocampo dorsal foram expostos a dois objetos distintos (A e B) por 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 (20 pmol/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 (20 pmol/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.



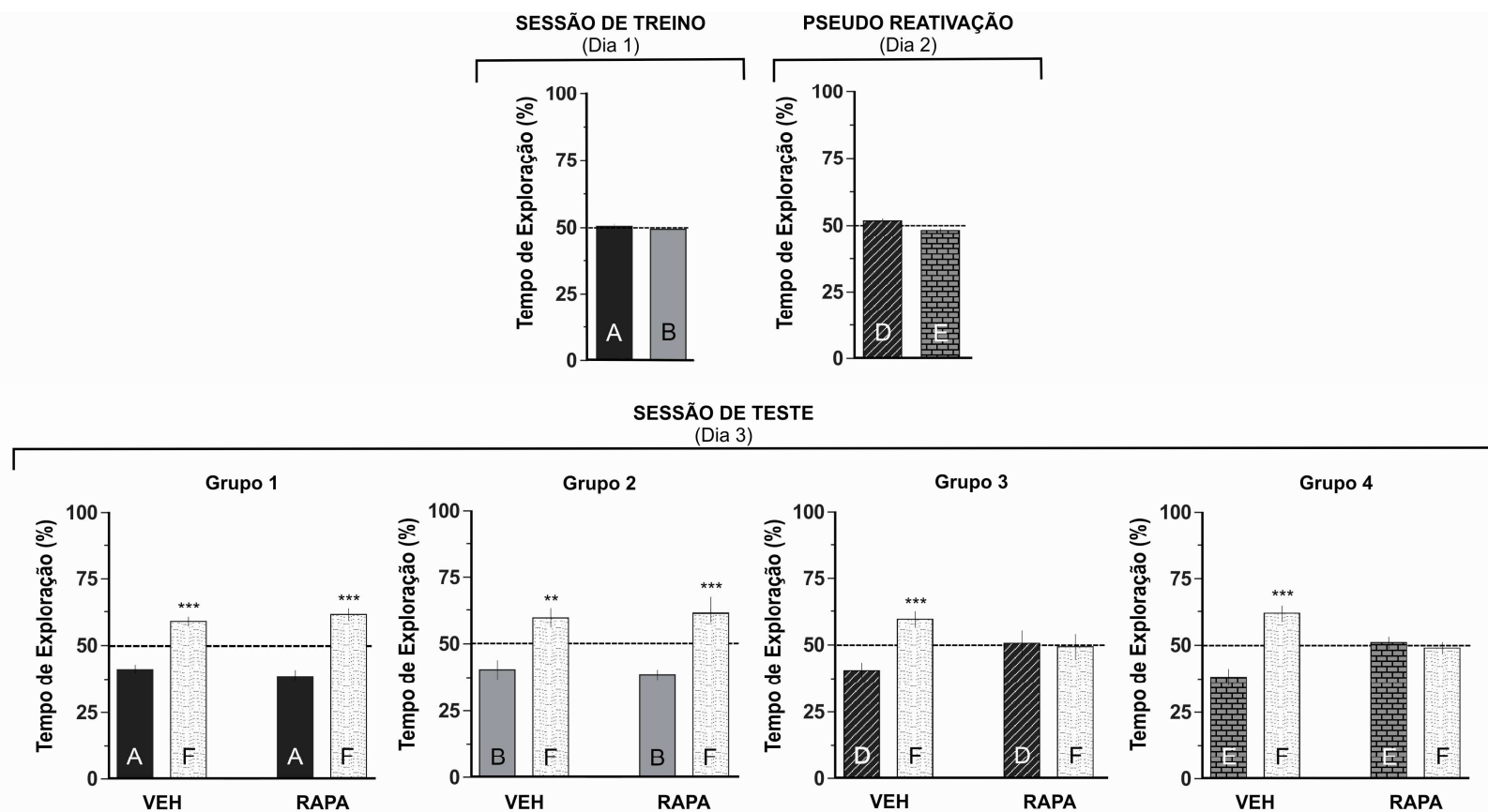


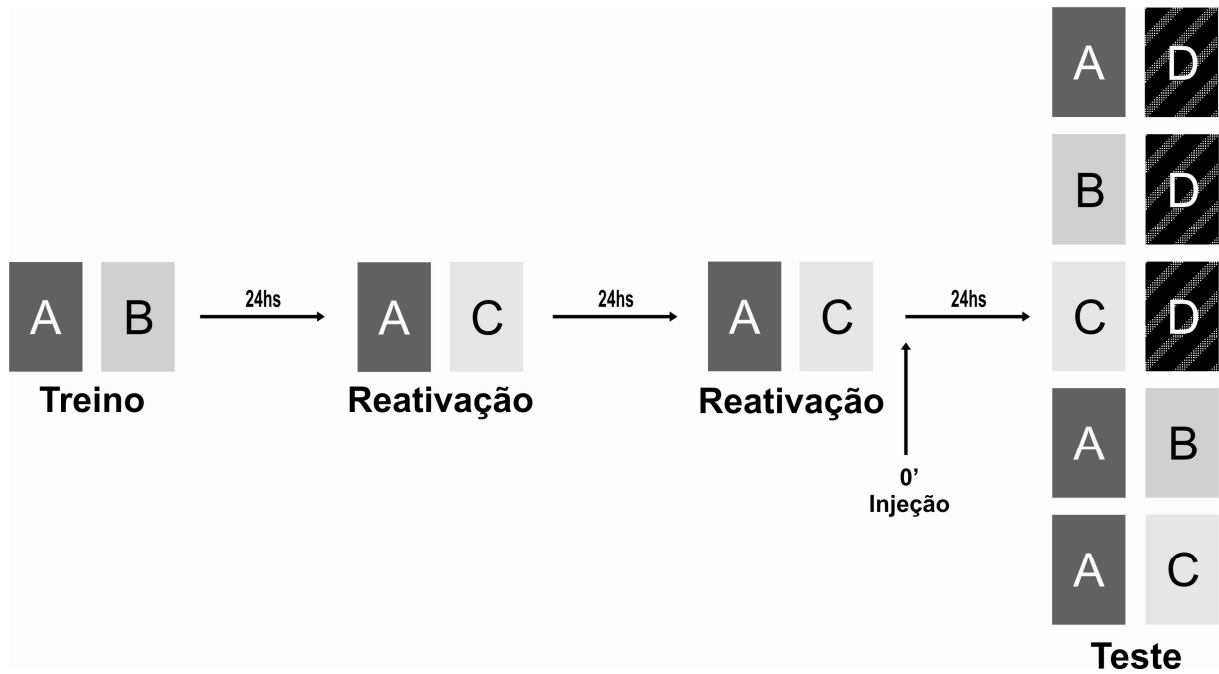
FIGURA 22 - A inibição da mTOR hipocampal após uma sessão de pseudo-reativação envolvendo exposição a dois objetos novos não afeta a memória de reconhecimento original.

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 (20 pmol/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).



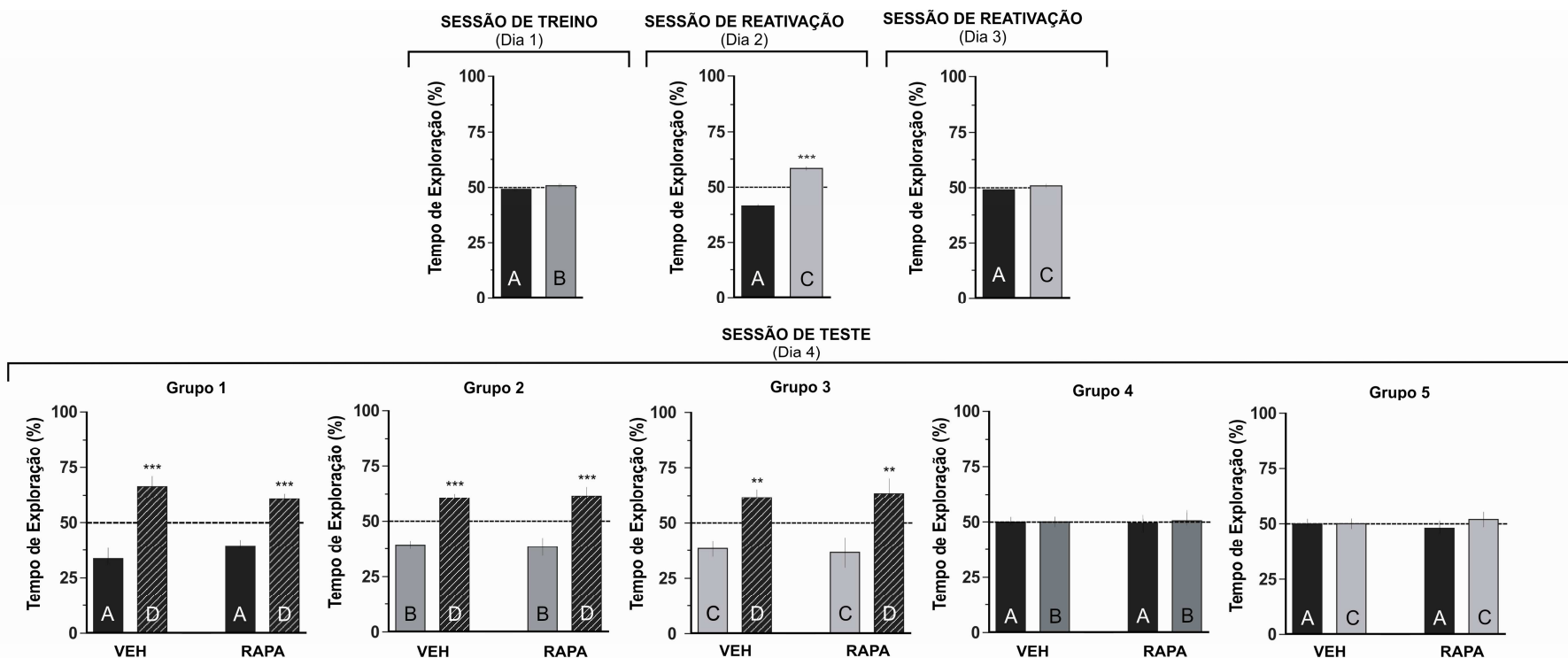


FIGURA 23 - A inibição da mTOR hipocampal depois de uma segunda sessão de reativação, na presença de objetos familiares, não tem efeito sobre a persistência da memória. Ratos com cânulas implantadas na região CA1 foram expostos a dois objetos distintos (A e B) por 5 minutos (Sessão de treino; Dia 1). 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 randomicamente em cinco grupos e, imediatamente depois, receberam infusão intra-hipocampal de veículo (0,1% de DMSO em solução salina; VEH) ou rapamicina (20 pmol/0,8 μ l/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 \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.

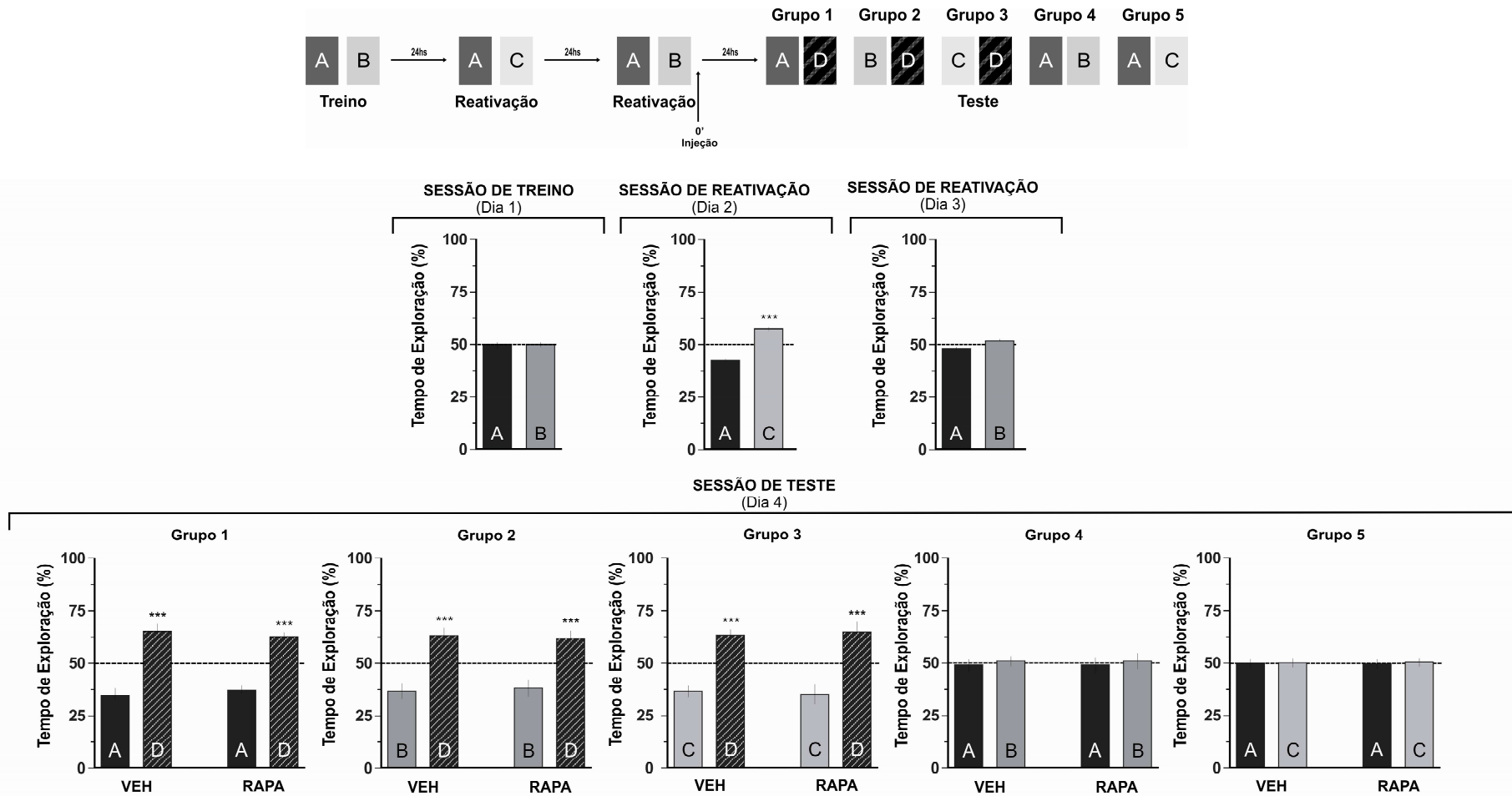
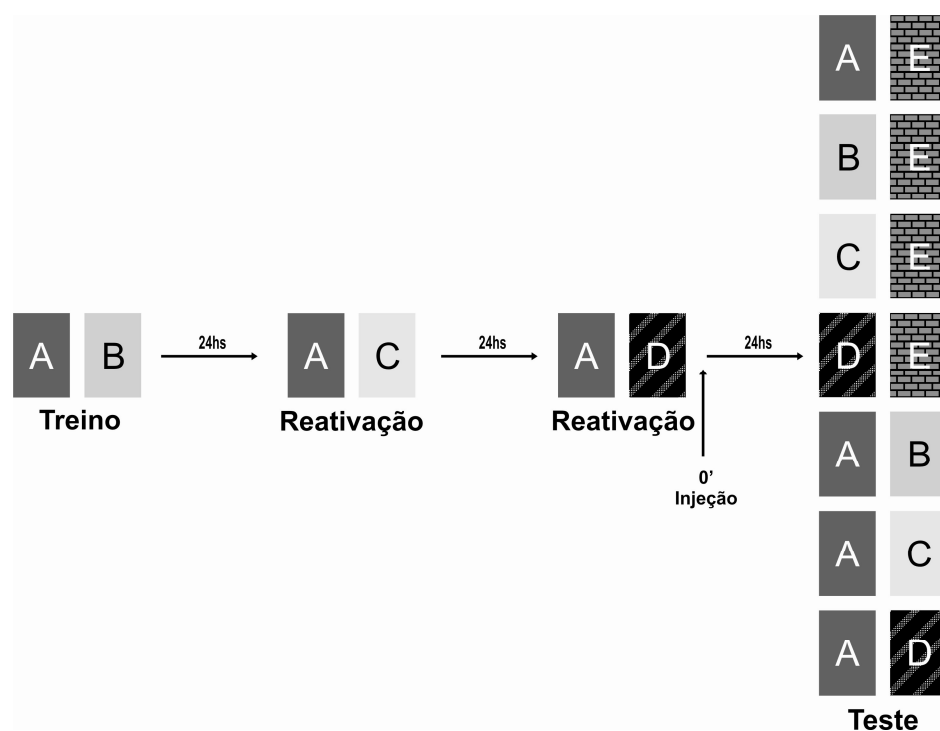


FIGURA 24 - A inibição da mTOR hipocampal, depois de uma segunda sessão de reativação, na presença de objetos familiares, não tem efeito sobre a persistência da memória. Ratos com cânulas implantadas na região CA1 foram expostos a dois objetos distintos (A e B) por 5 minutos (Sessão de treino; Dia 1). 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 (20 pmol/0,8 µl/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 (20 pmol/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.



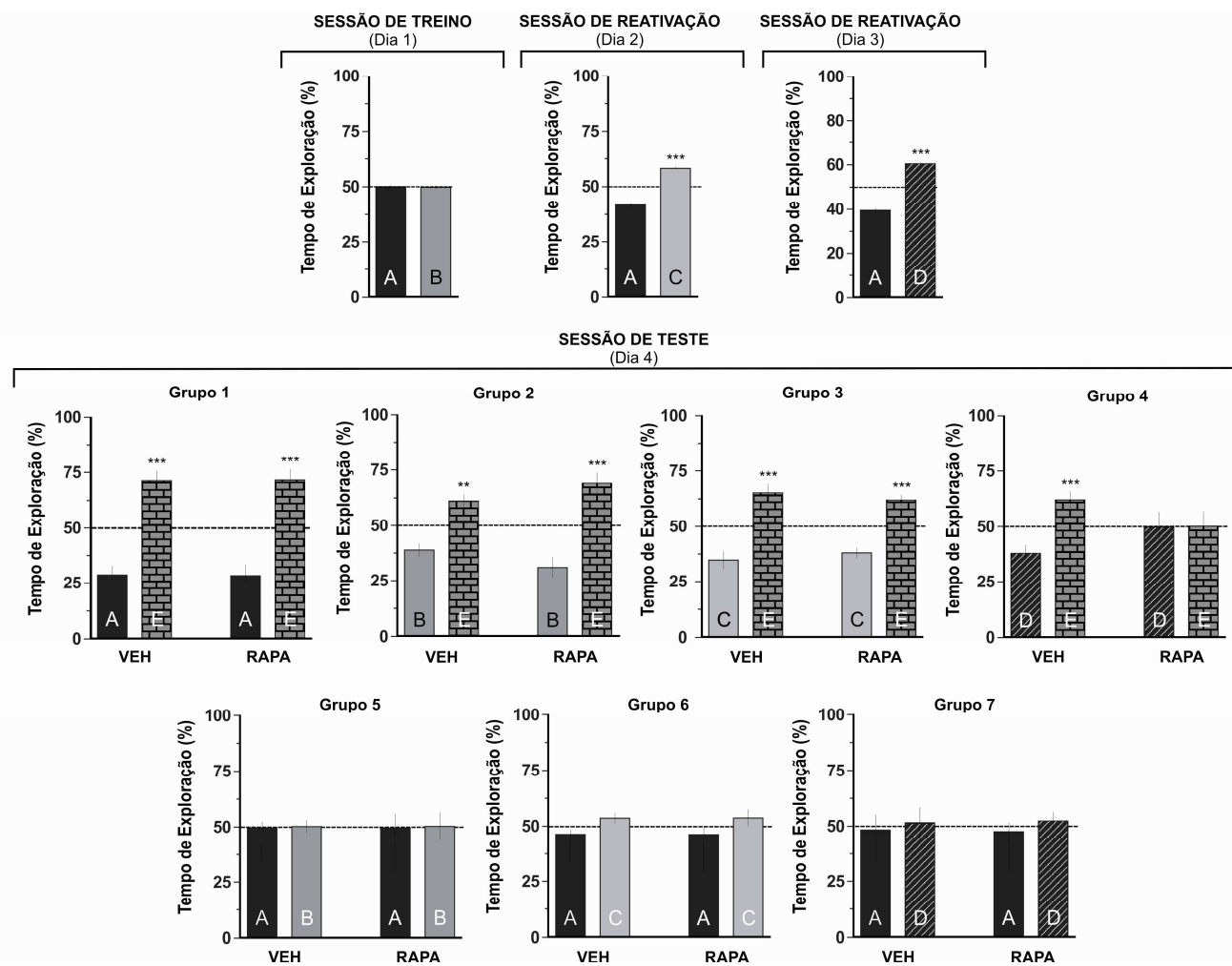


FIGURA 25 - A inibição da mTOR hipocampal após a sessão de reativação na presença de um objeto novo afeta a memória para o objeto familiar lembrado durante a reativação. Ratos com cânulas implantadas na região CA1 foram expostos a dois objetos distintos (A e B) por 5 minutos (Sessão de treino; Dia 1). 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 (20 pmol/0,8 µl/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 fear-motivated 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. G β L, 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 A β 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. 89, n. 3, p 338-351, 2008.



On the participation of mTOR in recognition memory

Jociane C. Myskiw, Janine I. Rossato, Lia R.M. Bevilaqua,
Jorge H. Medina, Iván Izquierdo, Martín Cammarota *

*Centro de Memória, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul,
Av. Ipiranga 6690, Porto Alegre, RS 90610-000, Brazil*

*Laboratorio de Neuroreceptores, Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof. Dr. Eduardo de Robertis", Facultad de Medicina,
Universidad de Buenos Aires, Paraguay 2155 3° Piso, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, CP 1121, Argentina*

Received 26 September 2007; accepted 3 October 2007
Available online 26 November 2007

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.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Memory; Object recognition; Consolidation; Reconsolidation; mTOR; Rapamycin; Hippocampus; Protein synthesis; Learning

1. Introduction

New memories are initially fragile but, over time, consolidate through a protein synthesis-dependent process that makes them resilient to disruption (Izquierdo & McGaugh, 2000; McGaugh, 2000; Izquierdo, Bevilaqua, Rossato, Bonini, Da Silva, Medina and Cammarota, 2006). Notwithstanding that, upon retrieval, many consolidated memories are rendered again vulnerable to the action of metabolic blockers, notably protein synthesis inhibitors, suggesting the existence of a protein synthe-

sis-dependent process that operates to re-stabilize the reactivated trace (Judge & Quartermain, 1982; Milekic & Alberini, 2002; Nader, Schafe, & Le Doux, 2000; Przybylski & Sara, 1997; Tronson & Taylor, 2007). Therefore, signaling pathways controlling mRNA translation are likely to be involved in memory consolidation as well as in persistence of the trace after retrieval (Jacinto & Hall, 2003; Matthies, 1989; Raught, Gingras, & Sonenberg, 2001; Steward & Schuman, 2001; Bekinshtein, Cammarota, Igaz, Bevilaqua, Izquierdo and Medina, 2007a).

The mammalian target of rapamycin (mTOR) is a serine-threonine protein kinase that acts as a downstream mediator of the PI3K/Akt pathway, modulating

* Corresponding author. Fax: +55 51 3320 3312.

E-mail address: mcammaro@terra.com.br (M. Cammarota).

cell growth and proliferation via phosphorylation of p70S6K and the eukaryotic initiation factor 4E-binding protein (4EBP), both critically involved in the initiation of mRNA translation (Hay & Sonenberg, 2004). mTOR has been profusely studied mainly because of its role in cellular differentiation and tumor progression (Huang & Houghton, 2003; Mamane, Petroulakis, LeBacquer, & Sonenberg, 2006). Recent data, however, revealed that in the central nervous system mTOR is activated by several signaling cascades involved in synaptic plasticity, including those mediated by *N*-methyl-D-aspartic acid receptors (NMDAR; Gong, Park, Abbassi, & Tang, 2006; Huang, Kang, Tian, Liu, Luo, Hester and Snyder, 2007) and brain derived neurotrophic factor (BDNF; Takei, Inamura, Kawamura, Namba, Hara, Yonezawa and Nawa, 2004; Inamura, Nawa, & Takei, 2005) suggesting that it might also play an important role in memory processing. In fact, it has been shown that rapamycin, a selective inhibitor of mTOR (Schreiber et al., 1991; Ferrari, Pearson, Siegmann, Kozma, & Thomas, 1993; Pearson, Dennis, Han, Williamson, Kozma, Wettenhall and Thomas, 1995; Sugiyama, Papst, Gelfand, & Terada, 1996), prevents NMDAR- and BDNF-dependent long-term potentiation (LTP) in the rat hippocampus (Tang, Reis, Kang, Gingras, Sonenberg and Schuman, 2002; Horwood, Dufour, Laroche, & Davis, 2006), blocks long-term facilitation in *Aplysia* (Casadio, Martin, Giustetto, Zhu, Chen, Bartsch, Bailey and Kandel, 1999) and impairs retention of spatial and aversive memories in the rat (Dash, Orsi, & Moore, 2006; Bekinschtein et al., 2007a).

Object recognition memory confers the ability to discriminate between novel and familiar entities. Neuropsychological analysis of amnesic patients and behavioral experiments in laboratory animals suggest that the functional integrity of the temporal lobe, including the hippocampal formation, is essential for acquisition and/or storage of this type of information (Clark, Zola, & Squire, 2000; Ennaceur & Delacour, 1988; Logothetis & Sheinberg, 1996; Riesenhuber & Poggio, 2002). In agreement with these findings, recent pharmacological experiments indicate that consolidation of object recognition memory requires protein synthesis in different structures of the temporal lobe and suggest that non-reinforced retrieval makes the recognition trace susceptible to pharmacological interventions once again (Akirav & Maroun, 2006; Kelly, Laroche, & Davis, 2003; Rossato Bevilacqua, Myskiw, Medina, Izquierdo and Cammarota, 2007). However, very little is known about the mechanism that regulates protein synthesis during object recognition memory processing.

Here, we examine whether mTOR signaling is required in the CA1 region of the rat hippocampus for consolidation of object recognition memory and analyze whether inhibition of this kinase after memory retrieval affects the persistence of an already consolidated recognition trace.

2. Materials and methods

2.1. Subjects, surgery and drug infusion

Naive male Wistar rats (2- to 3-month-old, 250–280 g) raised in our own facilities or bought at FEPPS (Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil) were used. The animals were housed 5 to a cage and kept with freely access to food and water under a 12/12 light/dark cycle, with light onset at 7:00 AM. The temperature of the animal's room was maintained at 22–24 °C. To implant them with indwelling cannulae, rats were deeply anesthetized with thiopental (30–50 mg/Kg, i.p.) and 27-gauge cannulae stereotaxically aimed to the CA1 region of the dorsal hippocampus, in accordance with coordinates (A –4.0, L \pm 3.0, V 1.8) taken from the atlas of Paxinos and Watson (1986). Animals were allowed to recover from surgery for 4 days before submitting them to any other procedure. At the time of drug delivery, 30-gauge infusion cannulae were tightly fitted into the guides. Infusions (0.8 μ l/side) were carried out over 60 s and the cannulae were left in place for 60 additional seconds to minimize backflow. The placement of the cannulae was verified postmortem: 2–4 h after the last behavioral test, 0.8 μ l of a 4% methylene-blue solution were infused as described above and the extension of the dye 30 min thereafter was taken as an indication of the presumable diffusion of the vehicle or drug previously given to each animal. Only data from animals with correct cannulae implants were analyzed. All procedures were conducted in accordance with the "Principles of laboratory animal care" (NIH publication No. 85–23, revised 1996). Every effort was made to reduce the number of animals used and to minimize their suffering.

2.2. Drugs

Rapamycin was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA), dissolved in DMSO and kept protected from light at –20 °C. Immediately before use, aliquots were thawed and diluted to working concentration with saline.

2.3. Object recognition task

When rats are exposed to familiar and novel objects, they explore preferentially the novel objects. This characteristic behavior was exploited to design a learning paradigm known as object recognition task, which has been employed to successfully evaluate recognition memory (Ennaceur & Delacour, 1988). The object recognition task was conducted in an open-field arena (50 \times 50 \times 50 cm) built of polyvinyl chloride plastic, plywood and transparent acrylic. Before training all animals were habituated to the experimental arena by allowing them to freely explore it 20 min per day for 4 days in the absence of stimulus objects. The stimulus objects were made of metal, glass or glazed ceramic. There were several copies of each object, which were used interchangeably. Glued to the base of each object was a rounded piece of Velcro, which was used to fix the object to the arena's floor. The role (familiar or novel) as well as the relative position of the 2 stimulus objects were counterbalanced and randomly permuted for each experimental animal. The open field arena and the stimulus objects were cleaned thoroughly between trials to ensure the absence of olfactory cues. Exploration was defined as sniffing or touching the stimulus object with the nose and/or forepaws. Sitting on or turning around the objects was not considered exploratory behavior. A video camera was positioned over the arena and the rats' behavior was recorded using a video tracking and analysis system for later evaluation. The experiments were performed by an observer blind to the treatment condition of the animals. Data are expressed as percentage of the total exploration time.

2.4. Object recognition memory acquisition protocol

On day 1, rats were placed in the open field arena containing 2 different objects and left to freely explore them for 5 min. The test session was performed either 180 min (to analyze short-term memory retention) or 24 h

after training (to evaluate long-term memory retention). In the test sessions one of the objects was randomly exchanged for a novel object, and rats were reintroduced into the open field for 5 additional minutes. The mTOR inhibitor rapamycin (RAP; 20 pmol) or vehicle (0.1% DMSO in saline) were bilaterally infused into the CA1 region of the dorsal hippocampus (0.8 μ l/side) at different times after training.

2.5. Object recognition memory reactivation protocol

On day 1, rats were exposed to two different objects for 5 min. Twenty-four or 120 h later, rats were exposed to the same two sample objects for 2 or 5 min to reactivate the memory trace. Immediately after this session, animals received bilateral intra-CA1 infusions (0.8 μ l/side) of vehicle or RAP (20 pmol). Twenty-four hours later, rats were tested for retention by placing them again in the open field arena but now in the presence of a familiar and a novel object. Student's *t*-test was used to analyze the time spent exploring each object.

2.6. Object recognition memory update protocol

On day 1, rats were exposed to two different objects for 5 min. Twenty-four hours later one of the objects was randomly exchanged for a novel one, and rats were placed again in the open field for 5 min. Immediately after the reactivation phase, the animals received bilateral intra-CA1 infusions (0.8 μ l/side) of vehicle or RAP. Twenty-four or 120 h later, rats were randomly assigned to different groups and exposed to particular combinations of objects to evaluate retention (see text for details). In some experiments a second reactivation session was carried out 24 h after the first one using the same or a different combination of objects.

2.7. Training in the spatial version of the Morris water maze

The water maze was a black circular pool (200-cm in diameter) conceptually divided in four equal imaginary quadrants for the purpose of data analysis. The water temperature was 21–23 °C. Two cm beneath the surface of the water and hidden from the rat's view was a black circular platform (15 cm in diameter). It had a rough surface, which allowed rats to climb onto it easily. The swimming path of the animals was recorded using a video camera mounted above the center of the pool and analyzed using a video tracking and analysis system. The water maze was located in a well-lit white room with several posters and other distal visual stimuli hanging on the walls to provide spatial cues. A curtain separated the water maze room from the room where the computer was setup and where the animals were temporarily housed during the behavioral sessions. Training in the

hidden platform (spatial) version of the MWM was carried out during 5 consecutive days as previously described (Rossato, Bevilacqua, Lima, Medina, Izquierdo and Cammarota, 2006). On each day rats received 8 consecutive training trials during which the hidden platform was kept in a constant location. A different starting location was used on each trial, which consisted of a swim followed by a 30 s platform sit. Any rat that did not find the platform within 60 s was guided to it by the experimenter. The intertrial interval (ITI) was 30 s. During the ITI, rats were carefully dried with a towel by the experimenter. Memory retention was evaluated in a 60 s probe trial carried out in the absence of the escape platform 24 h after the last training session.

2.8. Training in one trial step-down inhibitory avoidance

Rats were trained in a one-trial, step-down inhibitory avoidance task as previously described (Bevilacqua, da Silva, Medina, Izquierdo, & Cammarota, 2005). Briefly, the training apparatus was a 50 × 25 × 25 cm plexi-glass box with a 5-cm high, 8-cm wide and 25-cm long platform on the left end of a series of bronze bars which made up the floor of the box. For training, animals were gently placed on the platform facing the left rear corner of the training box. When they stepped down and placed their four paws on the grid, received a 2 s, 0.5 mA scrambled footshock. Memory retention was evaluated in a non-reinforced test session carried out at 24 h after training. Data were analyzed using the Mann–Whitney *U*-test.

3. Results

Firstly, we analyzed whether mTOR activation is necessary in the CA1 region of the hippocampus for consolidation of object recognition memory. Adult male Wistar rats were trained in an object recognition task and immediately, 180 min or 540 min later received bilateral intra-CA1 infusions of rapamycin, an mTOR inhibitor (RAP; 20 pmol/0.8 μ l/side) or vehicle (VEH; 0.1% DMSO in saline). Animals were tested for long-term memory retention 24 h later. During the retention test session rats were exposed for 5 min to one of the objects presented in the training session together with a novel object. Rats that received VEH explored the novel object significantly longer than the familiar one regardless of the time elapsed between training and test sessions (Fig. 1; VEH). However, animals that

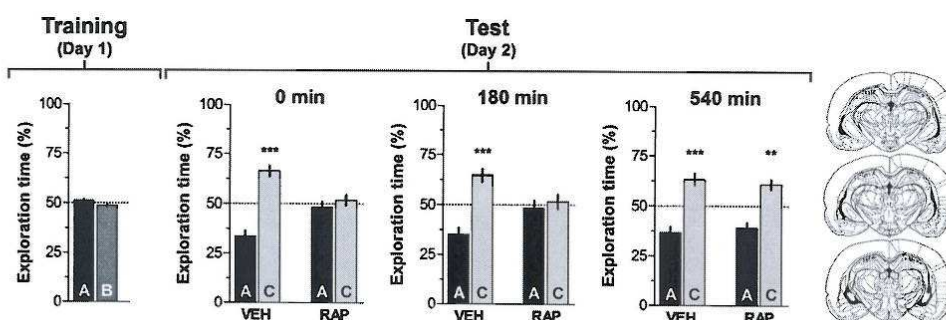


Fig. 1. Activity of mTOR in the dorsal hippocampus is required during a restricted post-training time window for consolidation of object recognition memory. On day 1 (Training) rats were exposed to 2 different objects (A and B) for 5 min and at different times after that (0, 180 or 540 min) received bilateral infusions (0.8 μ l/side) of vehicle (VEH; 0.1% DMSO in saline) or rapamycin (RAP; 20 pmol/side) in the CA1 region of the dorsal hippocampus. On day 2 (Test) the animals were exposed to a familiar (A) and a novel object (C) for 5 extra minutes. Data (means \pm SEM) are presented as the percentage of total exploration time. ****p* < 0.01 and ***p* < 0.05 in one-sample Student's *t*-test; *n* = 13 per group. On the right of the figure, schematic drawings taken from the atlas of Paxinos and Watson, 1986 showing the location of the infusion cannulae tips for the animals that received post-training RAP.

received intra-CA1 RAP immediately or 180 min but not 540 min after training spent the same amount of time exploring the novel and the familiar object (Fig. 1; RAP), suggesting that CA1 mTOR activity is necessary during a restricted post-training time window for consolidation of recognition memory. When given immediately after training RAP did not affect object recognition memory retention as measured 180 min post-training (Fig. 2). To investigate whether the amnesia induced by the post-training administration of RAP was indeed caused by impairment of the consolidation process or, instead, by a delayed and unspecific effect on anxiety and/or exploratory activity, rats received bilateral intra-CA1 infusions of VEH or RAP 24 h before exposure to a plus maze or an open field arena. RAP (20 pmol/0.8 μ l/side) had no effect in the total number of entries, in the number of entries into the open arms or in the percentage of time spent in the open arms during the plus maze session. Similarly, intra-CA1 RAP did not affect the number of crossings and rearings during a 5-min long free-exploration session in the open

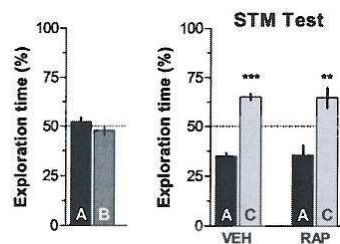


Fig. 2. Post-training inhibition of hippocampal mTOR does not affect short-term object recognition memory. Rats were exposed to two different objects (A and B) for 5 min and immediately after that received bilateral infusions (0.8 μ l/side) of vehicle (VEH; 0.1% DMSO in saline) or rapamycin (RAP; 20 pmol/side) in the CA1 region of the dorsal hippocampus. Three hours later (STM test), animals were exposed to a familiar (A) and a novel object (C) for 5 additional minutes. Data (means \pm SEM) are presented as the percentage of total exploration time. *** $p < 0.01$ and ** $p < 0.05$ in one-sample Student's t -test; $n = 8$ per group.

Table 1

Infusion of rapamycin in the CA1 region of the dorsal hippocampus has no effect on locomotor and exploratory activities or anxiety

	VEH	RAP
Total entries	23.4 \pm 2.1	20.3 \pm 1.9
Entries in open arms	10.2 \pm 1.1	9.0 \pm 1.0
% Time in open arms	27.6 \pm 3.9	29.8 \pm 5.2
Crossings	68.3 \pm 6.6	64.3 \pm 8.5
Rearings	28.2 \pm 3.4	27.8 \pm 3.3

RAP (20 pmol/side) was bilaterally infused into the CA1 region of the dorsal hippocampus 24 h before an open field or a plus maze session. Data are expressed as mean (\pm SEM) of the total number of entries, the number of entries into the open arms and the percentage of time spent in the open arms (plus maze; $n = 10$ per group) and of the number of crossings and rearings (open field; $n = 10$ per group). VEH, vehicle. A different set of animals was utilized for each behavioral test.

field (Table 1). Intrahippocampal administration of RAP did not cause any evident impairment in perception acuity or affected the functionality of the hippocampus in a way that could deteriorate the animals' performance. In fact, when animals that had received bilateral intra-CA1 infusions of RAP (20 pmol/0.8 μ l/side) 24 h earlier were trained in the spatial version of the Morris water maze, they acquired (Fig. 3a) and retrieved (Fig. 3b) a spatial preference as reliably as control animals did. Similarly, when trained in a one-trial step-down avoidance learning task, rats that had received intra-CA1 RAP 24 h before formed the aversive conditioned response unfailingly (Fig. 3c).

Many memories become susceptible to pharmacological disruption when reactivated during retrieval. Retrieval is thought to initiate a protein synthesis-dependent process, referred to as reconsolidation, which would operate to restabilize the retrieved memory (Nader et al., 2000; Przybylski, Roulet, & Sara, 1999; Przybylski & Sara 1997; Sara, 2000; Kida et al., 2002) and/or to allow the incorporation of new information into the original trace (Rossato et al., 2006). Indeed, some reports indicate that retrieval of object recognition memory induces reconsolidation-like events (Kelly et al., 2003) requiring protein synthesis in different areas of the brain, particularly the ventro-medial prefrontal cortex (VMPC; Akirav & Maroun, 2006) and the hippocampus (Rossato et al., 2007). However, the role played by these two areas of the brain during object recognition memory reconsolidation appears to be different. Thus, post-retrieval inhibition of protein synthesis in the VMPC causes amnesia when the original memory is fully reactivated (Akirav &

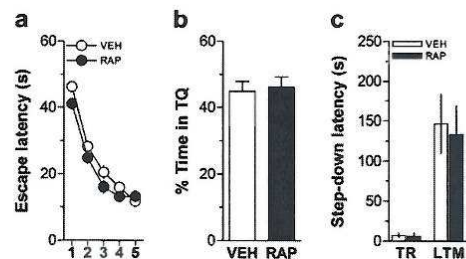


Fig. 3. Inhibition of hippocampal mTOR 24 h before training does not affect acquisition or retention of hippocampal-dependent memories. (a) Mean escape latency during the 5 days of acquisition of spatial memory for rats given vehicle (VEH; 0.1% DMSO in saline; white circles) or rapamycin (RAP; 20 pmol/side; black circles) in the CA1 region of the dorsal hippocampus 24 h before the first training session. Data are presented in blocks of 8 trials as means \pm SEM; $n = 8$ per group. (b) Percentage of time spent in the target quadrant (TQ) during a 60 s-long probe test carried out 24 h after the 5th training day for the rats showed in (a). Data are presented as means \pm SEM. (c) Rats with infusion cannulae implanted in the CA1 region of the dorsal hippocampus received intra-CA1 infusions of vehicle (VEH; 0.1% DMSO in saline) or rapamycin (RAP; 20 pmol/side) and 24 h later were trained in a one-trial, step down inhibitory avoidance task. Data are presented as median \pm interquartile range of step-down latency in the training session (TR) and during a long-term memory retention test session (LTM) performed 24 h post-training; $n = 9$ per group.

Maroun, 2006) whereas the hippocampus would become engaged in reconsolidation when retrieval occurs alongside acquisition of new information (Rossato et al., 2007). To analyze this last assertion, we investigated whether inhibition of hippocampal mTOR after retrieval had any effect on object recognition memory persistence. To do that, we exposed rats to two different objects for 5 min and 24 h later reexposed them to the same two objects for 5 additional minutes. Immediately after that, the animals received bilateral intra-CA1 infusions of RAP (20 pmol/0.8 μ l/side) or VEH. If hippocampal mTOR activity was necessary for reconsolidation of recognition memory under these conditions then, when allowed to explore a familiar and a novel object one day later, the animals that had received RAP at the end of the reactivation session should not recognize any object as being familiar and, hence, explore them equally. However, as can be seen in Fig. 4, when confronted with a familiar and a novel object 24 h after memory reactivation, VEH- and RAP-treated animals preferentially explored the novel object, indicating that post-retrieval inhibition of mTOR had no effect on the memory for the familiar one.

It has been suggested that the biological function of reconsolidation-like processes would not be restricted to the stabilization of reactivated traces. In addition to this, reconsolidation would allow integration of new information into already consolidated memories (Rodríguez-Ortiz, De la Cruz, Gutierrez, & Bermudez-Rattoni, 2005; Rossato et al., 2006, 2007). To investigate whether inhibition of hippocampal mTOR affects retention when memory reactivation occurs together with the addition of new information into a consolidated trace, we exposed rats to two different objects (A and B) for 5 min and 24 h later reexposed them for 5 extra minutes to one of the familiar objects (object A) together with a novel object (object C). Immediately after that, the animals received bilateral intra-CA1 infusions of RAP (20 pmol/0.8 μ l/side) or VEH and were randomly

assigned to one out of four experimental groups. Memory retention was tested 24 h (Fig. 5) or 120 h later (Fig. 6). During the retention test session Group 1 was exposed to object A and to a novel object D; Group 2 was exposed to objects B and D; Group 3 was left to explore objects C and D and Group 4 was exposed again to objects A and B. The animals that received intra-CA1 VEH equally explored objects A and B and spent more time exploring object D than any of the other objects, demonstrating that they remembered objects A and B, which had been first presented in the training session, as well as object C, to which they had been exposed during the reactivation session. On the contrary, and regardless the reactivation-test session delay, animals that received RAP spent the same amount of time exploring objects A and D and objects C and D, suggesting that RAP hindered memory for object A and blocked formation of memory for object C. Memory for object B, which was not present in the reactivation session, was not affected by RAP, indicating that the amnesia produced by this drug was not due to an unspecific action on performance, recognition or retrieval but to a true and long-lasting impairment in retention of the memory for the objects presented during reactivation. RAP had no effect on retention when given into dorsal CA1 24 h after training in the absence of any specific behavioral stimulus (Fig. 7).

If salient enough, contextual information can induce memory reactivation by itself (Sara, 2000; Spear, 1973). Therefore, to determine whether inhibition of hippocampal mTOR affects recognition memory when contextual information is provided alone, we exposed animals to objects A and B for 5 min and 24 h later allowed them to explore the training arena in the absence of stimulus objects or any other behaviorally relevant incentive. Immediately after that, the animals received bilateral intra-CA1 infusions of RAP (20 pmol/0.8 μ l/side) or VEH and memory retention was measured one day later. During the test session both RAP- and VEH-treated animals spent more time exploring

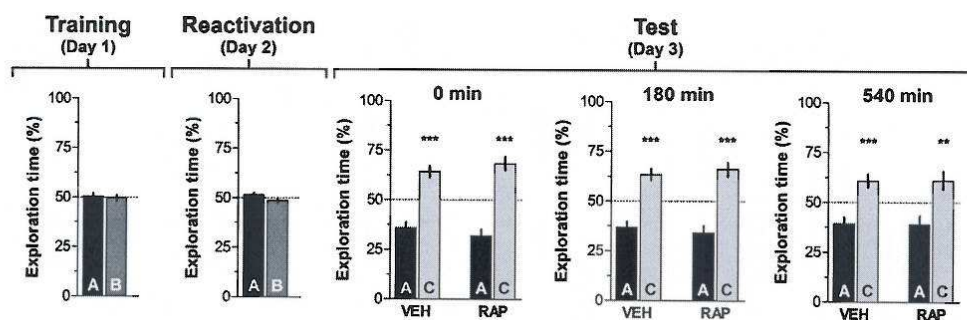


Fig. 4. Inhibition of hippocampal mTOR after memory reactivation in the presence of familiar objects does not affect object recognition long-term memory. (A) Rats implanted with infusion cannulae in the CA1 region of the dorsal hippocampus were exposed to two objects (A and B) for 5 min (Training, Day 1). Twenty-four hours later the animals were reexposed for 5 additional minutes to the same two objects to reactivate the memory trace (Reactivation, Day 2) and at different times after that (0, 180 or 540 min) received bilateral intra-CA1 infusions of vehicle (VEH; 0.1% DMSO in saline) or rapamycin (RAP; 20 pmol/side). Retention was assessed 24 h later by exposing animals to the familiar object A together with a novel object C (Test, Day 3). *** $p < 0.01$ and ** $p < 0.05$ in one-sample Student's *t*-test; $n = 10$ per group.

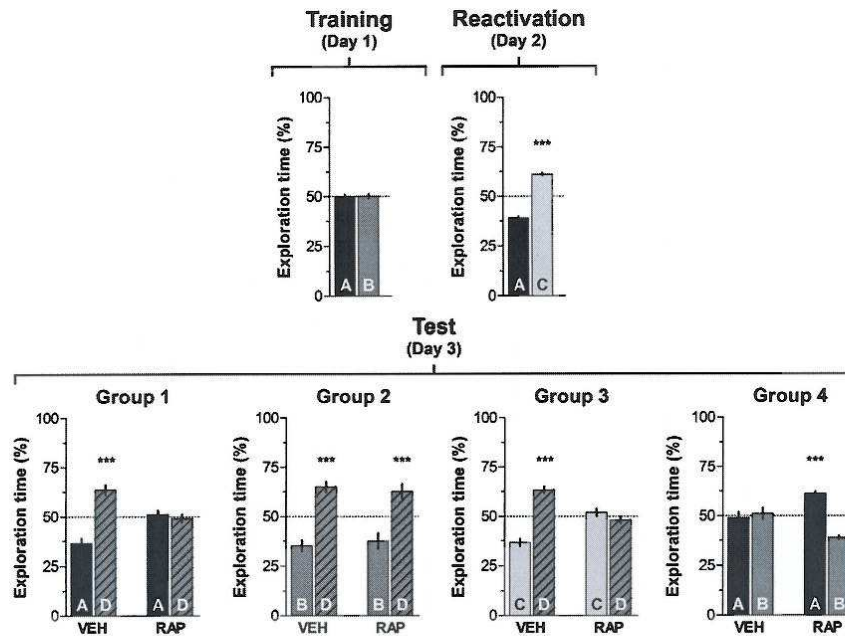


Fig. 5. Inhibition of hippocampal mTOR after memory reactivation in the presence of a novel and a familiar object impairs memory for these two objects without affecting that for a familiar object not present during reactivation. Rats implanted with infusion cannulae in the CA1 region of the dorsal hippocampus were exposed to two objects (A and B) for 5 min (Training; Day 1). Twenty-four hours later the animals were reexposed to familiar object A together with a novel object C (Reactivation; Day 2). Rats were randomly assigned to one out of four groups and immediately after that received bilateral intra-CA1 infusions of vehicle (VEH; 0.1% DMSO in saline) or rapamycin (RAP; 20 pmol/side). Twenty-four hours later the animals were submitted to a 5-min long test (Test; Day 3) in the presence of different combinations of objects, as follows. Group 1 = Object A + Object D; Group 2 = Object B + Object D; Group 3 = Object C + Object D; Group 4 = Object A + Object B, where D was a novel object. Note that RAP impaired retention of the memory for novel object C and also for the familiar object A (which was present during the reactivation session) but spared memory for familiar object B, to which animals were not exposed during the reactivation phase. Data are presented as mean (\pm SEM). *** $p < 0.01$ in one-sample Student's *t*-test; $n = 12$ per group.

a novel object D than familiar objects A or B, suggesting that exposure to the context alone is not enough to reactivate the recognition trace to the extent needed to induce memory reconsolidation (Fig. 8). Similarly, when RAP (20 pmol/0.8 μ l/side) was given into dorsal CA1 immediately after a behavioral session during which animals were left to freely explore two objects different from those presented 24 h earlier (i.e. a pseudoreactivation session), it impaired retention of the memory for the two objects introduced during the pseudoreactivation session but had no effect on the original recognition trace (Fig. 9).

Taken together, the above mentioned results suggest that the amnesia induced by inhibition of hippocampal mTOR after object recognition memory retrieval has two important characteristics: (1) it is contingent with the presence of a novel and a familiar object at the moment of retrieval and (2) it is specific for the memory of the familiar object explicitly recalled during reactivation.

To further investigate the role of novelty in the RAP-induced post-retrieval amnesia we exposed rats to two different objects (A and B) for 5 min. Twenty-four and 48 h

later the animals were exposed for 5 extra minutes to one of the familiar objects (object A) and to a novel object C. Immediately after the second re-exposure session, animals received bilateral intra-CA1 infusions of RAP (20 pmol/0.8 μ l/side) or VEH and were randomly assigned to different experimental groups. Retention was assessed 24 h later. The groups were as follows: Group 1 was exposed to object A and to a novel object D; Group 2 was exposed to objects B and D, Group 3 was left to explore objects C and D, Group 4 explored object A plus object B and Group 5 did so with objects A and C. As expected, when retention was assessed 24 h later, animals treated with VEH spent more time exploring the novel object D than any of the other objects and equally explored objects A and B and objects A and C. The animals that received RAP behaved exactly as control animals did, suggesting that inhibition of hippocampal mTOR after a second reactivation session in the presence of known objects has no effect on memory persistence (Fig. 10). This hypothesis was confirmed in a different set of experiments involving exposure to object A and B on day one, exposure to objects A and C on

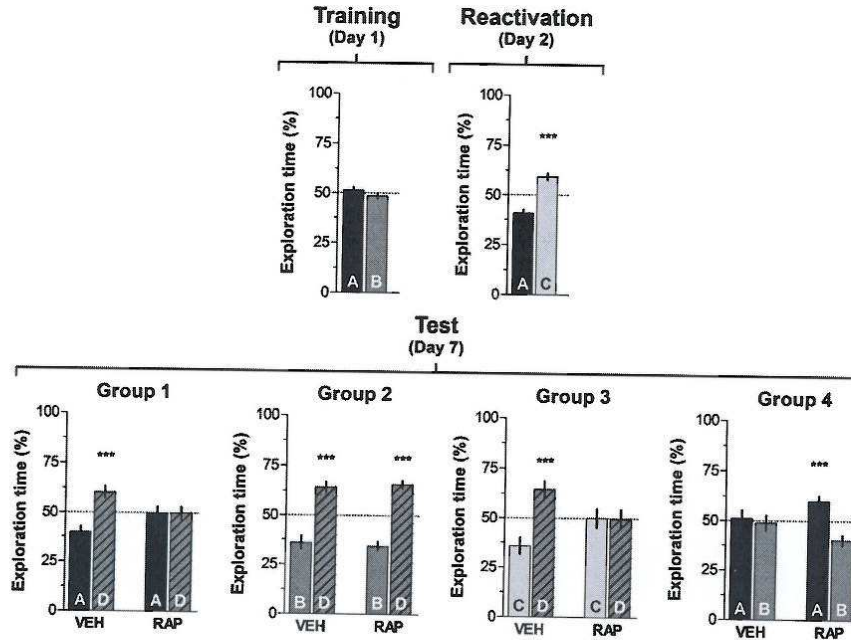


Fig. 6. The amnesic effect induced by inhibition of hippocampal mTOR after memory reactivation in the presence of a novel and a familiar object lasts at least 5 days. Rats with infusion cannulae implanted in the CA1 region of the dorsal hippocampus were exposed to two objects (A and B) for 5 min (Training; Day 1). Five days later the animals were exposed to familiar object A plus a novel object C (Reactivation; Day 2). Rats were randomly assigned to one out of four different groups and immediately after that received bilateral intra-CA1 infusions of either vehicle (VEH) or rapamycin (RAP; 20 pmol/side). Five days later, the animals were submitted to a 5-min long retention test session (Test; Day 7) in the presence of different combinations of objects, as follows. Group 1 = Object A + Object D; Group 2 = Object B + Object D; Group 3 = Object C + Object D; Group 4 = Object A + Object B, where D was a novel object. Data are presented as mean (\pm SEM). *** $p < 0.01$ in one-sample Student's *t*-test; $n = 12$ per group.

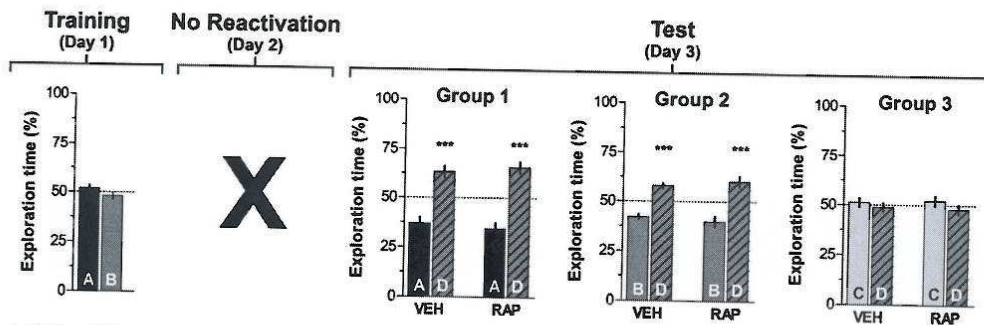


Fig. 7. Inhibition of hippocampal mTOR 24 h after training in the absence of a behaviorally relevant event does not affect retention of object recognition memory. Rats implanted with infusion cannulae in the CA1 region of the dorsal hippocampus were exposed to two objects (A and B) for 5 min (Training; Day 1). Twenty-four hours later animals were randomly assigned to one out of three different groups, given bilateral intra-CA1 infusions of vehicle (VEH; 0.1% DMSO in saline) or rapamycin (RAP; 20 pmol/side) and after that returned to their home cages without receiving any specific stimuli. Twenty-four hours later the animals were submitted to a 5-min long retention test session (Test; Day 3) in the presence of different combinations of objects, as follows. Group 1 = Object A + Object D; Group 2 = Object B + Object D; Group 3 = Object C + Object D, where C and D were novel objects. Data are presented as mean (\pm SEM). *** $p < 0.01$ in one-sample Student's *t*-test; $n = 10$ per group.

day 2 and re-exposure to objects A and B on day 3. Again, animals that received intra-CA1 RAP (20 pmol/0.8 μ l/side)

immediately after re-exposure to the familiar objects on day 3 remembered all objects 24 h later (data not shown).

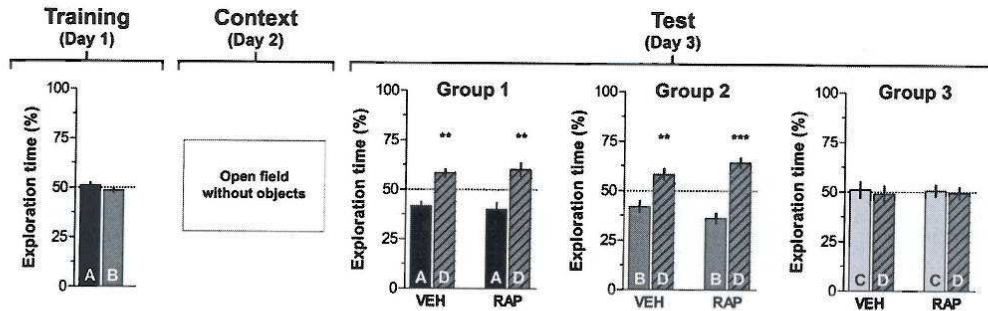


Fig. 8. Inhibition of hippocampal mTOR activity after exploration of the training arena in the absence of stimuli objects does not affect retention of recognition memory. Rats implanted with infusion cannulae in the CA1 region of the dorsal hippocampus were exposed to two objects (A and B) for 5 min (Training, Day 1). Twenty-four hours later the animals were allowed to freely explore the open field arena in the absence of stimuli objects (Context; Day 2). Rats were randomly assigned to one out of three different groups and immediately after that received bilateral intra-CA1 infusions of either vehicle (VEH; 0.1% DMSO in saline) or rapamycin (RAP; 20 pmol/side). Twenty-four hours later animals were submitted to a 5-min long retention test session (Test; Day 3) in the presence of different combinations of objects, as follows. Group 1 = Object A + Object D; Group 2 = Object B + Object D; Group 3 = Object C + Object D, where C and D were novel objects. *** $p < 0.01$ and ** $p < 0.05$ in Student's *t*-test; $n = 10$ per group.

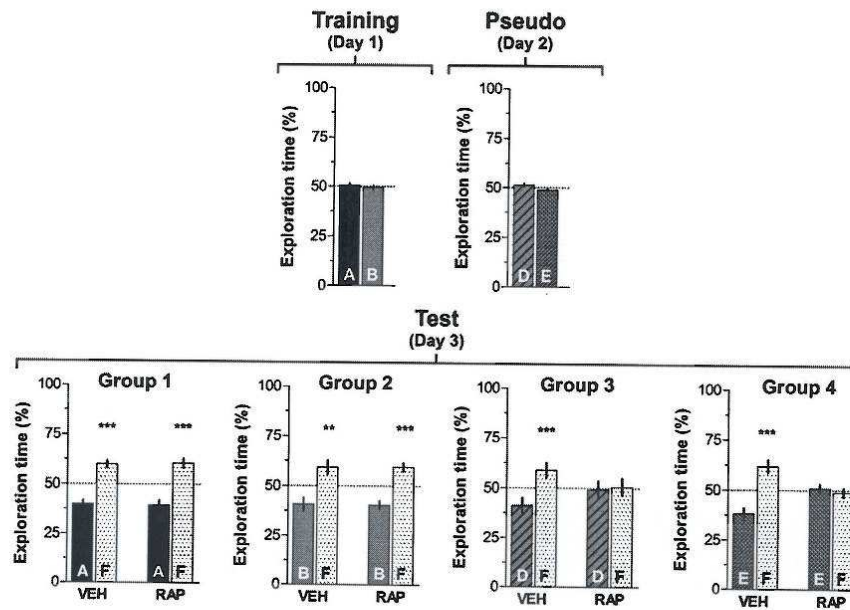


Fig. 9. Inhibition of hippocampal mTOR after exposure to two novel objects does not affect the original recognition memory trace. Rats implanted with infusion cannulae in the CA1 region of the dorsal hippocampus were exposed to two objects (A and B) for 5 min (Training; Day 1). Twenty-four hours later the animals were exposed to two novel objects D and E (Pseudo; Day 2). Rats were randomly assigned to one out of four different groups and immediately after that received bilateral intra-CA1 infusions of either vehicle (VEH; 0.1% DMSO in saline) or rapamycin (RAP; 20 pmol/side). Twenty-four hours later the animals were submitted to a 5-min long retention test session (Test; Day 3) in the presence of different combinations of objects, as follows. Group 1 = Object A + Object F; Group 2 = Object B + Object F; Group 3 = Object D + Object F; Group 4 = Object E + Object F, where F was a novel object. Note that RAP impaired retention of the memory for the novel objects D and E (which were present during the pseudoreactivation session) but did not affect that for familiar objects A and B, to which the animals were exposed only during the training session. Data are presented as mean (\pm SEM). *** $p < 0.01$ and ** $p < 0.05$ in one-sample Student's *t*-test; $n = 10$ per group.

To further analyze whether the amnesia induced by post-retrieval administration of RAP in the dorsal hippocampus is specific for the familiar object explicitly recalled

during memory reactivation, we exposed rats to objects A and B and 24 h later re-exposed them to the familiar object A alongside a novel object C (Fig. 11). On day 3, the ani-

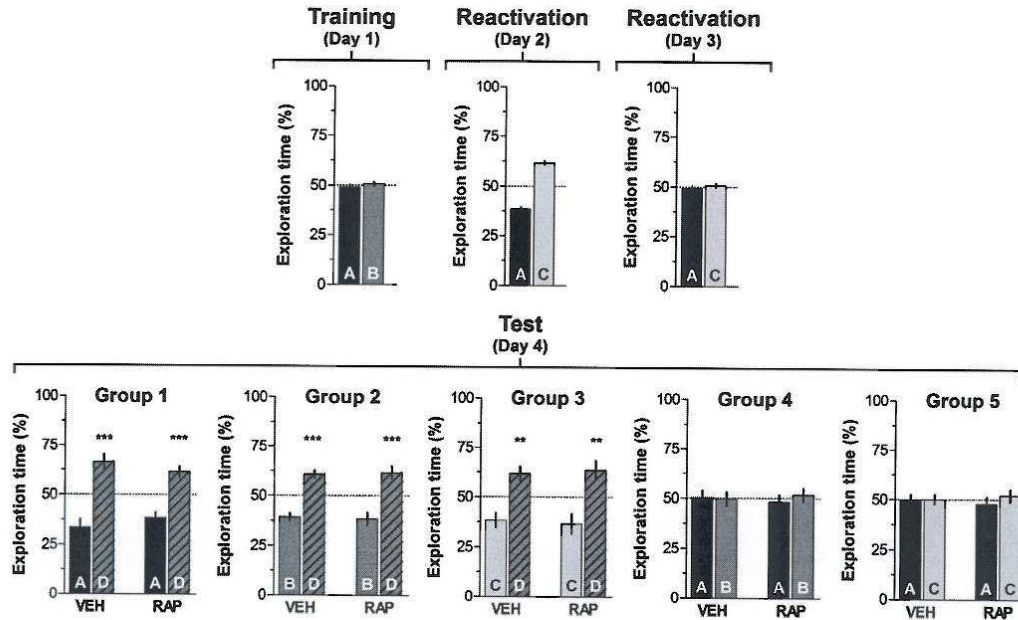


Fig. 10. Inhibition of hippocampal mTOR after a second reactivation session in the presence of familiar objects has no effect on memory persistence. Rats implanted with infusion cannulae in the CA1 region of the dorsal hippocampus were exposed to two objects (A and B) for 5 min (Training; Day 1). Twenty-four hours (Reactivation; Day 2) and 48 h later (Reactivation; Day 3) the animals were exposed to object A and to a novel object C. Rats were randomly assigned to one out of five experimental groups and immediately after that received bilateral intra-CA1 infusions of vehicle (VEH; 0.1% DMSO in saline) or rapamycin (RAP; 20 pmol/side). Twenty-four hours later the animals were submitted to a 5-min long retention test session (Test; Day 4) in the presence of different combinations of objects, as follows. Group 1 = Object A + Object D; Group 2 = Object B + Object D; Group 3 = Object C + Object D; Group 4 = Object A + Object B; Group 5 = Object A + Object C, where D was a novel object. Data are presented as mean (\pm SEM). *** p < 0.001 and ** p < 0.05 in one-sample Student's t -test; n = 10 per group.

imals were again exposed to object A but together with novel object D and, immediately after this, received bilateral intra-CA1 infusions of VEH or RAP (20 pmol/0.8 μ l/side) and were randomly assigned to different experimental groups, as follows: Group 1 was exposed to object A together with a novel object E; Group 2 was exposed to objects B and E, Group 3 was left to explore objects C and E, Group 4 explored object D plus object E, Group 5 did so with objects A and B, Group 6 with objects A and C, and Group 7 with objects A and D. All animals were tested for retention 24 h later. As expected, on day 4 animals treated with VEH spent more time exploring the novel object E than any other object and, when presented together, equally explored objects A and B, A and C, and A and D, indicating that they remembered all them. Animals that received RAP also spent more time exploring the novel object E than any other object except D, suggesting that RAP impaired formation of the memory for object D but spared that for all the familiar objects including, notably, object A, which had been explicitly recalled before the intra-hippocampal administration of RAP. However, these animals equally explored objects A and D when presented together, something that should not have happened were

the memory for object A intact, since RAP blocked formation of the memory for object D.

4. Discussion

In this report, we present evidence for the requirement of protein synthesis in the hippocampus during object recognition memory processing. In particular, our results demonstrate that mTOR signaling is necessary in the dorsal CA1 region during a restricted post-training time window for the effective consolidation of this memory type. We also show that, when expressed concurrently with the presentation of a novel item, the long-term object recognition memory trace is made again susceptible to mTOR inhibition.

Previous work suggests that mTOR-dependent translational control is critical for activity-dependent changes underlying memory formation (Tang et al., 2002). In this respect, it was recently shown that inhibition of mTOR signaling in different areas of the brain relevant to memory processing impairs auditory, spatial and fear memory consolidation (Tischmeyer, Schicknick, Kraus, Seidenbecher, Staak and Scheich, Gundelfinger, 2003; Bekinschtein et al., 2007b; Dash et al., 2006; Parsons, Gafford, & Helm-

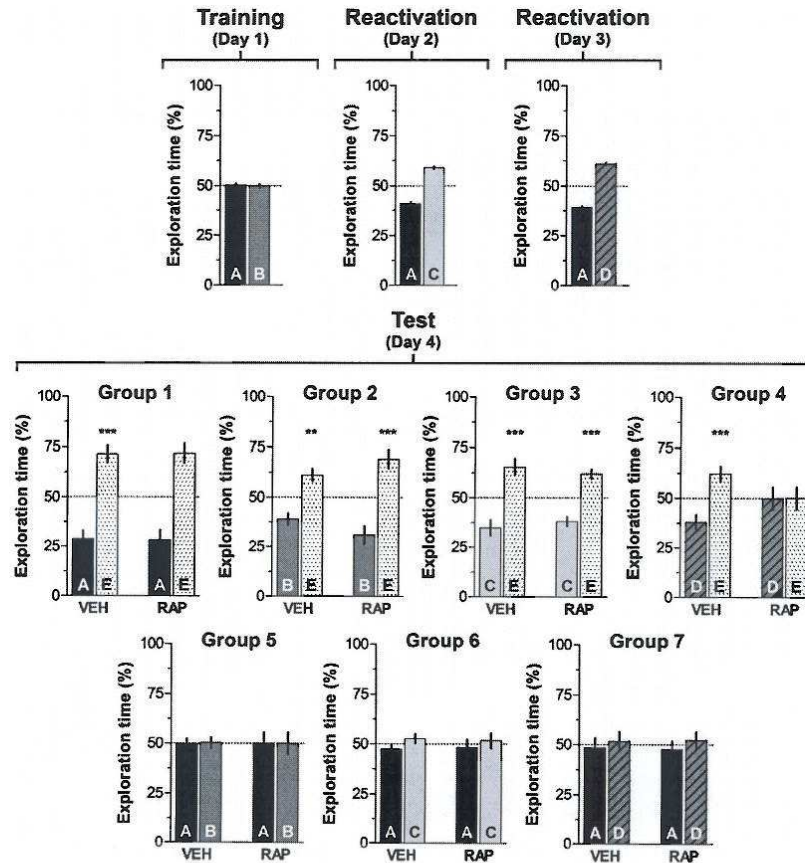


Fig. 11. Inhibition of hippocampal mTOR after a reactivation session in the presence of novel object affects memory for the familiar object explicitly recalled during reactivation. Rats implanted with infusion cannulae in the CA1 region of the dorsal hippocampus were exposed to two objects (A and B) for 5 min (Training; Day 1). Twenty-four hours later (Reactivation; Day 2) the animals were exposed for 5 min to object A and to a novel object C. Twenty-four hours later (Reactivation; Day 3) the animals were again exposed to object A alongside novel object D. Rats were randomly assigned to one out of seven experimental groups and immediately after that received bilateral intra-CA1 infusions of vehicle (VEH; 0.1% DMSO in saline) or rapamycin (RAP; 20 pmol/side). Twenty-four hours later the animals were submitted to a 5 min-long retention test session (test; day 4) in the presence of different combinations of objects, as follows. Group 1 = Object A + Object E; Group 2 = Object B + Object E; Group 3 = Object C + Object E; Group 4 = Object D + Object E; Group 5 = Object A + Object B; Group 6 = Object A + Object C; Group 7 = Object A + Object D, where E was a novel object. Data are presented as mean (\pm SEM). *** $p < 0.01$ and ** $p < 0.05$ in one-sample Student's *t*-test; $n = 10$ per group.

stetter, 2006) and that, in the hippocampus, mTOR signaling couples β -adrenergic receptors to the translation initiation machinery in order to gate induction of protein synthesis-dependent long-term potentiation (LTP; Gelinas et al., 2007).

Here, we show that bilateral infusion of the mTOR specific inhibitor RAP into the CA1 region of the dorsal hippocampus immediately or 180 min but not 540 min after training impairs object recognition long-term memory. The fact that this effect was time-dependent suggests that the observed amnesia was caused by inhibition of the consolidation process and not by an insult on hippocampal

functionality or by an unspecific impairment of behavioral performance. This claim is further substantiated by control experiments showing that: (a) the intra-CA1 administration of RAP does not affect short-term object recognition memory; (b) infusion of RAP 24 h before open field and plus maze behavioral sessions has no effect on exploratory activity or anxiety state; (c) RAP does not impair memory formation when given into dorsal CA1 24 h before training in step-down avoidance or in the Morris water maze, two learning tasks that require the functional integrity of the hippocampal formation (Cammarota, Bevilaqua, Medina, & Izquierdo, 2004; Rossato et al., 2006).

Evidence indicates that some memory types become labile after retrieval and require another phase of protein synthesis, referred to as reconsolidation, to persist (for a recent review, see Tronson & Taylor, 2007). Indeed, several studies show that object recognition memory is susceptible to the localized microinfusion of metabolic blockers, including protein synthesis inhibitors, around the time of retrieval (Akirav & Maroun, 2006; Kelly et al., 2003; Maroun & Akirav, 2007; Rossato et al., 2007), although the role played in this process by different areas of the brain has not been determined conclusively. For example, Akirav and Maroun (2006) reported that post-retrieval inhibition of protein synthesis in the ventro-medial prefrontal cortex hampers persistence of object recognition memory when the trace is reactivated by the same stimuli objects presented in the training session, while Rossato et al. (2007) indicate that the hippocampus only is engaged in reconsolidation of the recognition trace when retrieval occurs concomitantly the acquisition of new information. We have previously proposed that this difference is due to the specific function of these two regions during recognition (Rossato et al., 2007). Thus, the prefrontal cortex would be involved mainly with discrimination of the recency and temporal order of previously encountered stimuli (Rainer & Miller, 2000; Xiang & Brown, 2004; Hannesson, Howland, & Phillips, 2004a; Hannesson, Vacca, Howland, & Phillips, 2004b) and the hippocampus would process information referred to the detection of novelty and/or changes in spatial configuration (Hammond, Tull, & Stackman, 2004; Mumby, Gaskin, Glenn, Schramek, & Lehmann, 2002; Wan, Yao, & Wang, 1999; Viola et al., 2000; Winograd & Viola, 2004; Aggleton & Brown, 2005; Moncada & Viola, 2006). In total agreement with this assertion we failed to detect any effect of RAP on recognition memory when this drug was infused into dorsal CA1 after a reactivation session involving reexposure to two familiar objects. However, when RAP was given into dorsal CA1 immediately after a reactivation session involving presentation of a familiar and a novel object, it blocked consolidation of the memory for the novel object and, importantly, also impaired recognition of the familiar object that had been presented during training and reactivation, leaving intact the memory for the familiar object presented only during the training session. The amnesic effect of the post-retrieval administration of RAP was independent of the delay between test sessions and was not observed in the absence of explicit reactivation, indicating that it was caused by disruption of the consolidated memory trace and not just a temporary performance effect. Moreover, the fact the RAP did not affect memory retention when infused after a second reactivation session clearly indicates that the hippocampus is engaged in reconsolidation of the recognition trace only when retrieval occurs concomitantly with the acquisition of information about a new object, but not when the trace is fully reactivated.

What RAP-sensitive proteins are required in the hippocampus for consolidation and reconsolidation of object

recognition memory and which are the extracellular signals that recruit the mTOR signaling cascade during memory processing? It is known that, in neurons, RAP blocks the expression of key components of the translational machinery such as 4E-BP1 and eIF4E (Takei, Kawamura, Hara, Yonezawa, & Nawa, 2001) and that mTOR regulates the synthesis of several proteins involved in synaptic plasticity and memory formation, including Arc, CaMKII and Homer 2 (Schratt, Nigh, Chen, Hu, & Greenberg, 2004; Takei et al., 2004). Interestingly, many of these proteins are synthesized locally at dendrites through a BDNF-mediated pathway, suggesting that RAP has selective effects on the translation of dendritically located, BDNF-induced transcripts. In fact, it has been reported that tetanus-induced LTP in isolated CA1 apical dendrites is blocked by RAP (Cracco, Serrano, Moskowitz, Bergold, & Sacktor, 2005) and that the dendritic activation of the mTOR-p70S6K pathway is necessary for the induction of NMDAR and protein synthesis-dependent synaptic plasticity in the CA1 region of the hippocampus (Cammalleri, Lutjens, Berton, King, Simpson, Francesconi and Sanna, 2003).

A key question that remains controversial is whether or not consolidation and reconsolidation share the same biochemical mechanisms (Przybylski & Sara, 1997; Summers, Crowe, & Ng, 1997; Duvarci, Nader, & LeDoux, 2005; Alberini, 2005; Dudai, 2006). Several pharmacological treatments impair both consolidation and reconsolidation, which led to the proposition that reconsolidation involves some sort of recapitulation of the molecular events that occurred during consolidation (Sara, 2000). For example, the early post-training activation of NMDA receptors and PKC necessary for normal consolidation (Morris, Hagan, & Rawlins, 1986; Rickard, Poot, Gibbs, & Ng, 1994; Tronel & Sara, 2003; Riedel, Platt, & Micheau, 2003; Bevilacqua et al., 2005; Robbins & Murphy, 2006; Izquierdo et al., 2006) has been also reported following retrieval-induced reactivation of different types of memory (Przybylski & Sara, 1997; Summers et al., 1997; Torras-Garcia, Lelong, Tronel, & Sara, 2005; Bonini et al., 2007). Activation of ERK1/2 signaling in the amygdala was reported during consolidation and reconsolidation (Duvarci et al., 2005) and a late phase of sensitivity to β -adrenergic drugs has also been found for both processes (Roullet & Sara, 1998; Przybylski et al., 1999; Sara, Roullet, & Przybylski, 1999; Sara, 2000). However, several experiments revealed the existence of significant biochemical differences between consolidation and reconsolidation (Anokhin, Tiunova, & Rose, 2002; Lee, Everitt, & Thomas, 2004; Boccia, Blake, Acosta, & Baratti, 2006; Bucherelli, Baldi, Mariottini, Passani, & Blandina, 2006) suggesting that, despite some similarities, reconsolidation is not a second round of consolidation nor involves further consolidation of the original mnemonic trace (Alberini, 2005; Dudai, 2006). In this respect, we must concede that, despite the fact that our results show that inhibition of hippocampal mTOR activity around the moment of training and non-

reinforced retrieval impairs long-term memory retention it is possible that the molecular substrates of such activation are different in each case. Additional studies are in course to answer this question.

Acknowledgments

This work was supported by grants from CNPq, CAPES and FAPERGS, Brazil to MC, LRM and II, and ANPCyT and CONICET, Argentina to M.C. and J.H.M.

References

- Aggleton, J. P., & Brown, M. W. (2005). Contrasting hippocampal and perirhinal cortex function using immediate early gene imaging. *The Quarterly Journal of Experimental Psychology B*, *58*, 218–233.
- Akirav, I., & Maroun, M. (2006). Ventromedial prefrontal cortex is obligatory for consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Cerebral Cortex*, *16*, 1759–1765.
- Alberini, C. M. (2005). Mechanisms of memory stabilization: Are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? *Trends in Neurosciences*, *28*, 51–56.
- Anokhin, K. V., Tiuonova, A. A., & Rose, S. P. (2002). 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*, 1759–1765.
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Igaz, L. M., Bevilacqua, L. R., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2007a). Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF-dependent phase in the hippocampus. *Neuron*, *53*, 261–277.
- Bekinschtein, P., Katche, C., Slipczuk, L. N., Igaz, L. M., Cammarota, M., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2007b). mTOR signaling in the hippocampus is necessary for memory formation. *Neurobiology of Learning and Memory*, *87*, 303–307.
- Bevilacqua, L. R., da Silva, W. N., Medina, J. H., Izquierdo, I., & Cammarota, M. (2005). Extinction and reacquisition of a fear-motivated memory require activity of the Src family of tyrosine kinases in the CA1 region of the hippocampus. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, *81*, 139–145.
- Boccia, M. M., Blake, M. G., Acosta, G. B., & Baratti, C. M. (2006). Post-retrieval effects of icv infusions of hemicholinium in mice are dependent on the age of the original memory. *Learning and Memory*, *13*, 376–381.
- Bonini, J. S., Da Silva, W. C., Bevilacqua, L. R., Medina, J. H., Izquierdo, I., & Cammarota, M. (2007). On the participation of hippocampal PKC in acquisition, consolidation and reconsolidation of spatial memory. *Neuroscience*, *147*, 37–45, Epub 2007 May 17.
- Bucherelli, C., Baldi, E., Mariottini, C., Passani, M. B., & Blandina, P. (2006). Aversive memory reactivation engages in the amygdala only some neurotransmitters involved in consolidation. *Learning and Memory*, *13*, 426–430.
- Cammalleri, M., Lütjens, R., Berton, F., King, A. R., Simpson, C., Francesconi, W., & Sanna, P. P. (2003). 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 United States of America*, *100*, 14368–14373.
- Cammarota, M., Bevilacqua, L. R., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2004). Retrieval does not induce reconsolidation of inhibitory avoidance memory. *Learning and Memory*, *11*, 572–578.
- Casadio, A., Martin, K. C., Giustetto, M., Zhu, H., Chen, M., Bartsch, D., Bailey, C. H., & Kandel, E. R. (1999). A transient, neuron-wide form of CREB-mediated long-term facilitation can be stabilized at specific synapses by local protein synthesis. *Cell*, *99*, 221–237.
- Clark, R. E., Zola, S. M., & Squire, L. R. (2000). Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, *20*, 8853–8860.
- Cracco, J. B., Serrano, P., Moskowitz, S. I., Bergold, P. J., & Sacktor, T. C. (2005). Protein synthesis-dependent LTP in isolated dendrites of CA1 pyramidal cells. *Hippocampus*, *15*, 551–556.
- Dash, P. K., Orsi, S. A., & Moore, A. N. (2006). Spatial memory formation and memory-enhancing effect of glucose involves activation of the tuberous sclerosis complex-Mammalian target of rapamycin pathway. *Journal of Neuroscience*, *26*, 8048–8056.
- Dudai, Y. (2006). Reconsolidation: The advantage of being refocused. *Current Opinion in Neurobiology*, *16*, 174–178.
- Duvarci, S., Nader, K., & LeDoux, J. E. (2005). 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.
- Ennaceur, A., & Delacour, J. A. (1988). New one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural Brain Research*, *31*, 47–59.
- Ferrari, S., Pearson, R. B., Siegmann, M., Kozma, S. C., & Thomas, G. (1993). The immunosuppressant rapamycin induces inactivation of p70s6k through dephosphorylation of a novel set of sites. *The Journal of Biological Chemistry*, *268*, 16091–16094.
- Gelinas, J. N., Banko, J. L., Hou, L., Sonenberg, N., Weeber, E. J., Klann, E., & Nguyen, P. V. (2007). ERK and mTOR signaling couple beta-adrenergic receptors to translation initiation machinery to gate induction of protein synthesis-dependent long-term potentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, *282*, 27527–27535.
- Gong, R., Park, C. S., Abbassi, N. R., & Tang, S. J. (2006). 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*, *27*, 18802–18815.
- Hammond, R. S., Tull, L. E., & Stackman, R. W. (2004). On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, *82*, 26–34.
- Hannesson, D. K., Howland, J. G., & Phillips, A. G. (2004a). Interaction between perirhinal and medial prefrontal cortex is required for temporal order but not recognition memory for objects in rats. *Journal of Neuroscience*, *24*, 4596–4604.
- Hannesson, D. K., Vacca, G., Howland, J. G., & Phillips, A. G. (2004b). 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.
- Hay, N., & Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes and Development*, *15*, 1926–1945.
- Horwood, J. M., Dufour, F., Laroche, S., & Davis, S. (2006). Signaling mechanisms mediated by the phosphoinositide 3-kinase/Akt cascade in synaptic plasticity and memory in the rat. *The European Journal of Neuroscience*, *23*, 3375–3384.
- Huang, S., & Houghton, P. J. (2003). Targeting mTOR signaling for cancer therapy. *Current Opinion in Pharmacology*, *3*, 371–377.
- Huang, Y., Kang, B. N., Tian, J., Liu, Y., Luo, H. R., Hester, L., & Snyder, S. H. (2007). 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*, 449–458.
- Inamura, N., Nawa, H., & Takeji, N. (2005). Enhancement of translation elongation in neurons by brain-derived neurotrophic factor: Implications for mammalian target of rapamycin signaling. *Journal of Neurochemistry*, *95*, 1438–1445.
- Izquierdo, I., & McGaugh, J. L. (2000). Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. *Behavioural Pharmacology*, *11*, 517–534.
- Izquierdo, I., Bevilacqua, L. R., Rossato, J. I., Bonini, J. S., Da Silva, W. C., Medina, J. H., & Cammarota, M. (2006). The connection between the hippocampal and the striatal memory systems of the brain: A review of recent findings. *Neurotoxicity Research*, *10*, 113–121.

- Jacinto, E., & Hall, M. N. (2003). Tor signaling in bugs, brain and brawn. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 4, 117–126.
- Judge, M. E., & Quartermain, D. (1982). Characteristics of retrograde amnesia following reactivation of memory in mice. *Physiology and Behavior*, 28, 585–590.
- Kelly, A., Laroche, S., & Davis, S. (2003). 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, 5354–5360.
- Kida, S., Josselyn, S. A., de Ortiz, S. P., Kogan, J. H., Chevere, I., Masushige, S., & Silva, A. J. (2002). CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. *Nature Neuroscience*, 5, 348–355.
- Lee, J. L., Everitt, B. J., & Thomas, K. L. (2004). Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science*, 304, 839–843.
- Logothetis, N. K., & Sheinberg, D. L. (1996). Visual object recognition. *Annual Review of Neuroscience*, 19, 577–621.
- Mamane, Y., Petroulakis, E., LeBacquer, O., & Sonenberg, N. (2006). mTOR, translation initiation and cancer. *Oncogene*, 16, 6416–6422.
- Maroun, M., & Akirav, I. (2007). Arousal and stress effects on consolidation and reconsolidation of recognition memory. *Neuropsychopharmacology*.
- Matthies, H. (1989). In search of cellular mechanisms of memory. *Progress in Neurobiology*, 32, 277–349.
- McGaugh, J. L. (2000). Memory—a century of consolidation. *Science*, 287(5451), 248–251.
- Milekic, M. H., & Alberini, C. M. (2002). Temporally graded requirement for protein synthesis following memory reactivation. *Neuron*, 24, 521–525.
- Moncada, D., & Viola, H. (2006). Phosphorylation state of CREB in the rat hippocampus: A molecular switch between spatial novelty and spatial familiarity? *Neurobiology of Learning and Memory*, 86, 9–18.
- Morris, R. G., Hagan, J. J., & Rawlins, J. N. (1986). Allocentric spatial learning by hippocampectomized rats: A further test of the “spatial mapping” and “working memory” theories of hippocampal function. *The Quarterly Journal of Experimental Psychology B*, 38, 365–395.
- Mummy, D. G., Gaskin, S., Glenn, M. J., Schramek, T. E., & Lehmann, H. (2002). Hippocampal damage and exploratory preferences in rats: Memory for objects, places, and contexts. *Learning and Memory*, 9, 49–57.
- Nader, K., Schafe, G. E., & Le Doux, J. E. (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, 17, 722–726.
- Parsons, R. G., Gafford, G. M., & Helmstetter, F. J. (2006). Translational control via the mammalian target of rapamycin pathway is critical for the formation and stability of long-term fear memory in amygdala neurons. *The Journal of Neuroscience*, 26, 12977–12983.
- Paxinos, G., & Watson, C. (1986). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press.
- Pearson, R. B., Dennis, P. B., Han, J. W., Williamson, N. A., Kozma, S. C., Wettenhall, R. E., & Thomas, G. (1995). The principal target of rapamycin-induced p70s6k inactivation is a novel phosphorylation site within a conserved hydrophobic domain. *The EMBO Journal*, 14, 5279–5287.
- Przybylski, J., & Sara, S. J. (1997). Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behavioural Brain Research*, 84, 241–246.
- Przybylski, J., Roulet, P., & Sara, S. J. (1999). Attenuation of emotional and non-emotional memories after their reactivation: Role of beta adrenergic receptors. *The Journal of Neuroscience*, 19, 6623–6628.
- Rainer, G., & Miller, E. K. (2000). Effects of visual experience on the representation of objects in the prefrontal cortex. *Neuron*, 27, 179–189.
- Raught, B., Gingras, A. C., & Sonenberg, N. (2001). The target of rapamycin (TOR) proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 19, 7037–7044.
- Rickard, N. S., Poot, A. C., Gibbs, M. E., & Ng, K. T. (1994). Both non-NMDA and NMDA glutamate receptors are necessary for memory consolidation in the day-old chick. *Behavioral and Neural Biology*, 62, 33–40.
- Riedel, G., Platt, B., & Micheau, J. (2003). Glutamate receptor function in learning and memory. *Behavioural Brain Research*, 140, 1–47.
- Riesenhuber, M., & Poggio, T. (2002). Neural mechanisms of object recognition. *Current Opinion in Neurobiology*, 12, 162–168.
- Robbins, T. W., & Murphy, E. R. (2006). Behavioural pharmacology: 40+ years of progress, with a focus on glutamate receptors and cognition. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27, 141–148.
- Rodriguez-Ortiz, C. J., De la Cruz, V., Gutierrez, R., & Bermudez-Rattoni, F. (2005). Protein synthesis underlies post-retrieval memory consolidation to a restricted degree only when updated information is obtained. *Learning and Memory*, 12, 533–537.
- Rossato, J. I., Bevilacqua, L. R., Lima, R. H., Medina, J. H., Izquierdo, I., & Cammarota, M. (2006). On the participation of hippocampal p38 mitogen-activated protein kinase in extinction and reacquisition of inhibitory avoidance memory. *Neuroscience*, 43, 15–23.
- Rossato, J. I., Bevilacqua, L. R., Myskiw, J. C., Medina, J. H., Izquierdo, I., & Cammarota, M. (2007). On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 14, 36–46.
- Roulet, P., & Sara, S. (1998). Consolidation of memory after its reactivation: Involvement of beta noradrenergic receptors in the late phase. *Neural Plasticity*, 6, 63–68.
- Sara, S. J. (2000). Retrieval and reconsolidation: Toward a neurobiology of remembering. *Learning and Memory*, 7, 73–84.
- Sara, S. J., Roulet, P., & Przybylski, J. (1999). Consolidation of memory for odor-reward association: Beta-adrenergic receptor involvement in the late phase. *Learning and Memory*, 6, 88–96.
- Schratt, G. M., Nigh, E. A., Chen, W. G., Hu, L., & Greenberg, M. E. (2004). BDNF regulates the translation of a select group of mRNAs by a mammalian target of rapamycin-phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway during neuronal development. *The Journal of Neuroscience*, 24, 7366–7377.
- Schreiber, S. L., Liu, J., Albers, M. W., Karmacharya, R., Koh, E., Martin, P. K., Rosen, M. K., Standaert, R. F., & Wandless, T. J. (1991). Immunophilin-ligand complexes as probes of intracellular signaling pathways. *Transplantation Proceedings*, 23, 2839–2844.
- Spear, G. S. (1973). Editorial: Alport's syndrome: A consideration of pathogenesis. *Clinical Nephrology*, 1, 336–337.
- Steward, O., & Schuman, E. M. (2001). Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. *Annual Review of Neuroscience*, 24, 299–325.
- Sugiyama, H., Papst, P., Gelfand, E. W., & Terada, N. (1996). p70 S6 kinase sensitivity to rapamycin is eliminated by amino acid substitution of Thr229. *Journal Immunology*, 157, 656–660.
- Summers, M. J., Crowe, S. F., & Ng, K. T. (1997). Administration of DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid (AP5) induces transient inhibition of reminder-activated memory retrieval in day-old chicks. *Cognitive Brain Research*, 5, 311–321.
- Takei, N., Inamura, N., Kawamura, M., Namba, H., Hara, K., Yonezawa, K., & Nawa, H. (2004). 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, 9760–9769.
- Takei, N., Kawamura, M., Hara, K., Yonezawa, K., & Nawa, H. (2001). Brain-derived neurotrophic factor enhances neuronal translation by activating multiple initiation processes: Comparison with the effects of insulin. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 42818–42825.
- Tang, S. J., Reis, G., Kang, H., Gingras, A. C., Sonenberg, N., & Schuman, E. M. (2002). A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 467–472.
- Tischmeyer, W., Schicknick, H., Kraus, M., Seidenbecher, C. I., Staak, S., Scheich, H., & Gundelfinger, E. D. (2003). Rapamycin-sensitive signaling in long-term consolidation of auditory cortex-dependent memory. *The European Journal of Neuroscience*, 18, 942–950.
- Torrás-García, M., Lelong, J., Tronel, S., & Sara, S. J. (2005). Reconsolidation after remembering an odor-reward association requires NMDA receptors. *Learning and Memory*, 12, 18–22.

- Tronel, S., & Sara, S. J. (2003). Blockade of NMDA receptors in prelimbic cortex induces an enduring amnesia for odor-reward associative learning. *Journal of Neuroscience*, *23*, 5472–5476.
- Tronson, N. C., & Taylor, J. R. (2007). Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nature Reviews Neuroscience*, *8*, 262–275.
- Viola, H., Furman, M., Izquierdo, L. A., Alonso, M., Barros, D. M., de Souza, M. M., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2000). Phosphorylated cAMP response element-binding protein as a molecular marker of memory processing in rat hippocampus: Effect of novelty. *Journal of Neuroscience*, *20*, RC112.
- Wan, Q., Yao, H., & Wang, F. (1999). Involvement of K(+) channels in the inhibitory effects of adenosine on anoxia-induced Ca(2+) increase in cultured rat hippocampal CA1 neurons. *Biological Signals and Receptors*, *8*, 309–315.
- Winograd, M., & Viola, H. (2004). 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.
- Xiang, J. Z., & Brown, M. W. (2004). Neuronal responses related to long-term recognition memory processes in prefrontal cortex. *Neuron*, *42*, 817–829.