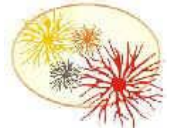




UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG



**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA ANIMAL COMPARADA
LABORATÓRIO DE NEUROCIÊNCIAS**

Participação da cinase ativada por p21 na memória aversiva em ratos

Fisioterapeuta André Peres Koth

Orientadora Prof.^a Dr.^a Daniela Martí Barros

Dissertação defendida no âmbito do programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas: Fisiologia Animal Comparada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE em Fisiologia Animal Comparada

Fevereiro 2012

Rio Grande

*“Aos meus pais, João e Emilia,
A quem dedico mesmo que em silêncio, cada sucesso que obtenho.”*

Agradecimentos

Daniela Martí Barros, orientadora e grande amiga – A ela eu agradeço por ter me oportunizado um espaço em seu grupo de neurocientistas, o que iluminou minhas esperanças e perspectivas de me tornar um cientista. Sou grato também pela sua orientação na ciência e na vida, assim como pela amizade sincera e espontânea de que ela dispõe a mim e a todos de sua relação, pela sua preocupação e jeito especial de participar das nossas vidas e tornar nosso grupo uma verdadeira família.

Minha Família – Eu não seria capaz de alcançar meus objetivos se não tivesse sido brindado por Deus com uma família maravilhosa. Aos meus pais, João e Emilia, são a quem dedico mesmo que em silêncio, cada sucesso que obtenho, num anseio infinito de proporcionar a eles o sentimento de que até as maiores dificuldades podem ser enfrentadas, de que sua esperança não foi cega e de que também são dignos de ver brilho em suas criações. Ao meu irmão Alan, sua esposa Liana e sua filhinha Mariana, minha afilhada, assim como aos meus dindos Jozé e Zaida, que igualmente me apoiam e me acompanham incondicionalmente. E falando em família não deixaria de dizer o quanto agradeço pela companhia de Maria Fernanda, minha namorada, minha baixinha, que já há alguns anos “peita” obstáculos junto comigo, sonhando e buscando os nossos ideais.

Amigos e companheiros de grupo de Neurociências – Exponho aqui minha gratidão pelo apoio de todos. Grandes amigos também fizeram a sua maneira, parte da força que me impulsionou até aqui e que me encoraja a continuar. Luiz Fernando, Bruno, Márcio, os maiores apreciadores das minhas piadas, e a Gisele, parceira de “pratos cheios regados a fofoca e aguardente”, a esses amigos de “boas e ruins”, dou o meu “valeu” e a certeza de que nossa parceria se estende além da ciência. Gustavo, Renan, e Lidiane, que de alguma maneira deram sua contribuição ao meu trabalho e a minha vivência no Mestrado. Aos companheiros Eduardo, Gessyka e Juliana, pela dedicação e responsabilidade durante os momentos mais “exaustivos”. Meu muito obrigado a eles, pelo companheirismo no trabalho e pelo prazer da convivência que temos.

A todos, muito obrigado!

Lista de abreviaturas

AMPA - alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico

AMPc – adenosina monofostato cíclico

BDNF - fator neurotrófico derivado do cérebro

CA1 – região 1 dos cornos de Amon (hipocampo)

CaMK – proteína cinase cálcio-calmodulina depende

Cdc42 - proteína homóloga de controle de divisão celular 42

c-Fos - proteína codificada pelo gene *FOS*

CO – monóxido de carbono

CRE - elemento de resposta ao AMPc

CREB – proteína de ligação ao CRE

CTR - controle

Erk – proteína cinase regulada por sinal extracelular

GEF – fator permutadores de nucleotídeo guanina

GMPc - guanosina monofosfato cíclico

GTPase – proteína ligadora de GTP

LIMK - LIM Cinase

MAPK - proteínas cinase ativadas por mitógenos

MCC –medo condicionado contextual

MCD – memória de curta duração

MLD – memória de longa duração

NMDA – N-Metil- D- Aspartato

NO – óxido nítrico

PAF – fator de ativação plaquetário

PAK – cinases ativadas por p21

PDK1 – proteína cinase dependente de fosfatidilinositol

PKA – proteína cinase dependente de adenosina monofosfato cíclico

PKG - proteína cinase dependente de guanosina monofosfato cíclico

PKC – proteína cinase dependente de cálcio

PLD - potenciação de longa duração

Rac-1 – Pequena GTPase da família das Ras GTPases

Rho – homóloga da Ras

RNA - ácido ribonucleico

TrK – Receptor Tirosinocinase

TrS – sessão de treino

TS – sessão teste

Resumo

Neste estudo nós investigamos a participação da cinase ativada por p21 do grupo I (PAK I) no processamento da memória aversiva em ratos. Usamos o teste comportamental de medo condicionado contextual para avaliar a memória aversiva de curta e de longa duração, em ratos controles ou tratados com IPA-3 (inibidor das PAK - 0,5; 1,0; 2,0mM). Os tratamentos foram infundidos na região CA1 do hipocampo, 15 min pré-treino ou 15 min ou 3 ou 6 ou 12 h pós-treino ou 15 min pré-teste realizado 24 h após o treino, a fim de avaliar a participação das PAK I sobre a aquisição, fase inicial e final da consolidação, persistência e evocação da memória de curta (MCD) e de longa duração (MLD). Os testes para MCD foram realizados 90 min pós-treino, sendo que os testes para avaliar a MLD foram executados 24h após o treino e os testes para avaliar persistência da memória foram realizados 7 dias após o treino. Os resultados obtidos mostraram que a injeção de IPA-3 nas três concentrações utilizadas não prejudica aquisição das MCD e MLD. No entanto, quando infundidos 15 min ou 3 h após o treino o IPA-3 prejudica a memória MLD, sem apresentar efeito sobre MCD. Quando infundidos 6 ou 12h pós-treino, os animais não mostraram alterações MLD medida 24 h após o treino. No entanto, quando o teste foi realizado 7 dias após o treino em animais que receberam a infusão de IPA-3 12 h pós-treino houve um déficit significativo na persistência da memória. Não houve alteração significativa na atividade locomotora dos animais submetidos ao tratamento, verificada através da tarefa de campo aberto. Os dados nos sugerem que as PAK I não parecem ser necessárias para a formação da memória de curta duração, no entanto, seu bloqueio provocou alteração nas fases inicial e tardia da consolidação da MLD, bem como na persistência da memória.

Sumário

1. Introdução	11
1.1. Classificação das memórias	13
1.1.1. Memória de curta e de longa duração	13
1.1.2. Memórias recentes e remotas	14
1.2. Fases da Memória.....	14
1.3. Morfologia celular.....	18
1.4 Bases moleculares do aprendizado e memória e sinalização intracelular	20
1.4.1 Cinase ativada por p21 (PAK)	25
2. Objetivos	28
2.1. Objetivo Geral.....	28
2.2. Objetivos Específicos.....	28
3. Artigo.....	29
Participation of p21 activated kinase in aversive memory processes in rats.....	29
Abstract	31
1. Introdução	32
2.1 <i>Subjects and stereotaxic surgery</i>	34
2.2 <i>Treatments</i>	34
2.3 <i>Behavioral tests</i>	35
2.5 <i>Statistical Analysis</i>	37
3. Results.....	37
4. Discussion.....	39
Legend figures.....	43
References	44

Figures.....	48
Figure 1	48
Figure 2	50
Figure 3	51
Figure 4	51
Table.....	52
Table 1.....	52
4. Considerações Finais.....	53
5. Referências bibliográficas.....	54

1. Introdução

Na concepção científica atual o processamento da memória não ocorre em um evento único, é inicialmente frágil e vulnerável a diversos fatores que podem interromper sua decorrência e impedir sua conclusão. Após a aquisição, as memórias passam por um processo que pode se prolongar por diversos dias, o qual faz das informações aprendidas traços estáveis ao longo do tempo e resistentes a condições desestabilizadoras (Medina *et al.*, 2008). Sabe-se hoje que o aprendizado é um processo caracterizado por alterações fisiológicas e morfológicas na transmissão sináptica, as quais são denominadas de plasticidade sináptica. Esse processo ocorre tanto em nível molecular quanto estrutural e deve ser consolidado a fim de tornar a memória adquirida estável e persistente (Lamprecht *et al.*, 2004).

As mudanças metabólicas previstas em um neurônio que é repetidamente ativado levam-no a emitir projeções que se aproximam e estabelecem vínculos associativos com outras células nervosas, o que constitui a base física da memória. Quando essas alterações são temporárias ou reversíveis se formam as memórias de curta duração (MCD), no entanto, as mudanças persistentes resultam nas memórias de longa duração (MLD), sendo bem estabelecido que neste caso é necessária expressão gênica e síntese.

O desenvolvimento de plasticidade sináptica ocorre em diversos locais do sistema nervoso envolvidos com diferentes processos fisiológicos. O aumento da força sináptica resultante do incremento na plasticidade parece importante tanto para a formação e organização sináptica durante o desenvolvimento do cérebro, quanto na aprendizagem ao longo da vida (Victor, Michael, Eric e Thomas, 2007). Os receptores

glutamatérgicos do tipo α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole propiónico (AMPA) são os principais transdutores de transmissão excitatória rápida no SNC de mamíferos (Malinow e Malenka, 2002). O aumento no deslocamento desses receptores para a membrana celular com o incremento da sua densidade na superfície da célula tem sido fortemente relacionado com o desenvolvimento da plasticidade sináptica em regiões do SNC associadas com a formação da memória, tais como o hipocampo (Wasling, Strandberg e Hanse, 2012; Malinow e Malenka, 2002).

A principal consequência desse processo é o fenômeno da Potencialização de Longa Duração (PLD), descrita por Terje & Lomo em 1966 (Martin *et al.*, 2000). Bliss e Lomo descobriram que com a aplicação de um breve estímulo de alta frequência em qualquer uma das vias hipocampais, tanto em *in vivo* quanto *in vitro*, havia a indução de um processo de fortalecimento das sinapses que poderia durar dias até semanas (Bliss e Collingridge, 1993).

Posteriormente (1986), em estudo realizado por Morris, foi constatado que o bloqueio farmacológico dos receptores glutamatérgicos N-Metil-D-aspartato (NMDA) causava déficits da formação da memória e bloqueio da PLD. Esse trabalho forneceu as primeiras evidências de que os eventos de formação da memória estão correlacionados com o desenvolvimento da PLD (Morris *et al.*, 1986).

Adicionam-se a esses, inúmeros estudos que demonstram os eventos moleculares comuns ao desenvolvimento da PLD e os mecanismos de formação da memória, tais como a ativação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e AMPA como evento inicial e o posterior aumento da atividade de diversas proteínas cinases

intracelulares (ver detalhes em : Riedel *et al.*, 1999; Vianna *et al.*, 2000; Izquierdo *et al.*, 2008).

1.1. Classificação das memórias

1.1.1. Memória de curta e de longa duração

A memória de curta duração (MCD) consiste num processamento independente da síntese de proteínas e permanece por um tempo relativamente breve, aproximadamente de 3-6 h. Pode-se dizer que a MCD dura um tempo suficiente para que a consolidação celular da memória de longa duração (MLD) se complete. Na MCD não ocorre a formação de traço molecular, não ocorrendo alterações celulares significativas e não havendo incremento estrutural em nível sináptico (Vianna *et al.*, 2000, Barros *et al.*, 2004, Izquierdo, 2011).

A MLD é caracterizada por ser dependente de transcrição gênica e tradução de ácido ribonucleico (RNA), com consequente síntese de proteínas. Seu processo ocorre no hipocampo e depende de um período de cerca de 3-6 horas, paralelo a MCD, para que possa se estabilizar e concretizar sua consolidação, durante a qual fica suscetível à diversos fatores que podem prejudicar seu estabelecimento (traumas, fármacos, aquisição de outras informações). A MLD caracteriza-se por promover alterações morfológicas de grupos de neurônios e incremento estrutural e molecular das suas sinapses e por deixar traços que podem ser encontrados por períodos longos, como muitos dias, semanas ou até meses. (McGauch 1966; Viana *et al.*, 2000, Barros *et al.*, 2004; Izquierdo, 2011).

1.1.2. Memórias recentes e remotas

As memórias recentes corresponderiam as memórias que sofrem a completa consolidação celular/sináptica, duram poucos dias e ainda permanecem nas regiões pertinentes a aquisição das informações. Por outro lado, as memórias remotas já se encontram em nível de consolidação sistêmica, em circuitos cerebrais que sucedem funcionalmente as estruturas responsáveis pela aquisição; traços que sobrevivem aos estágios iniciais e que podem ser evocadas semanas a diante do aprendizado (Medina *et al.*, 2008).

Não há um consenso sobre a localização específica das memórias recentes e remotas, mas alguns autores sugerem que as memórias recentes seriam processadas e armazenadas no hipocampo, enquanto que as remotas seriam armazenadas no neocórtex, mas em alguns casos o hipocampo ainda seria determinante para seu rastreamento (Medina *et al.*, 2008, Goshen *et al.*, 2011).

1.2. Fases da Memória

O aprendizado altera os constituintes proteicos das sinapses do circuito neuronal responsável pela aquisição da nova memória, elevando a funcionalidade dessas sinapses e fortalecendo a codificação das informações. No entanto, o amadurecimento das memórias adquiridas não ocorre instantaneamente. As informações são gradualmente estabilizadas através da consolidação, o que se dá em diversos níveis de organização e complexidade e seu mecanismo varia dependentemente do tipo de memória envolvida (Kandel, 2001).

A consolidação das memórias é um processo bastante complexo em termos de envolvimento molecular e de estruturas cerebrais, sendo classificada em dois tipos: consolidação sináptica (celular) e consolidação sistêmica (Duday, 2004; Frankland e Bontempi, 2005).

A consolidação sináptica corresponde ao período que envolve eventos moleculares e celulares que ocorrem nas regiões cerebrais responsáveis pelo início do armazenamento das informações aprendidas recentemente. Inicia logo após a aquisição e é relativamente rápida, podendo durar de 3-6h (Izquierdo *et al.*, 2006) (Fig. 1).

O hipocampo, especialmente a região CA1, é uma área cerebral extremamente relevante para a ocorrência da consolidação celular da memória, sendo suas células piramidais os principais alvos das alterações morfológicas e estruturais que culminam com a estabilização do aprendizado adquirido (Kandel, 2001; Fernandez, Tendolkar, 2006; Takehara-Nishiuchi, Maal-Bared, Morrissey, 2011). Há registros de casos de humanos que após sofrerem lesão de estruturas como hipocampo e amígdala foram acometidos por prejuízos na formação da memória, o que também foi observado em indivíduos que sofreram lesão isquêmica bilateral especificamente na região CA1 do hipocampo. Cabe ressaltar que os déficits de memória sofridos por esses indivíduos restringiam-se a memória recente, não afetando a memória remota (Squire, 2009). Assim, pode-se inferir que as estruturas que compõe o lobo temporal medial estão relacionadas com o período inicial dos mecanismos pertinentes ao aprendizado.

Por outro lado, a consolidação sistêmica envolve mecanismos relativamente lentos, iniciando vários dias após a aquisição e pode se estender por semanas. Esta fase envolve regiões neocorticais em interação com outras estruturas do lobo temporal

medial pertinentes a reorganização da aprendizagem recente (como o hipocampo), sendo através desses mecanismos que as memórias aprendidas alcançam outras regiões cerebrais onde irão permanecer por um tempo prolongado (Dudai e Phillips, 2000; Dudai e Eisenberg, 2004; Restivo, Vetere, Bontempi, Ammassari-Teule, 2009; Vetere *et al.*, 2011).

Regiões como o hipocampo, a amígdala, o córtex entorrinal e o córtex parietal posterior são acessadas para a evocação da memória nos primeiros dias que seguem a aquisição. A evocação da memória após 30 dias da aquisição depende da atividade apenas dos córtex entorrinal e o parietal posterior e passados 60 dias apenas o córtex parietal posterior é necessário (Izquierdo e Medina, 1997; Teixeira *et al.*, 2006). Assim, parece que o hipocampo, a amígdala, o córtex entorrinal e o córtex parietal posterior seguem uma progressão sequencial no processamento da memória, que se dá ao longo do tempo a partir da aquisição (Izquierdo e Medina, 1997). O hipocampo é importante para a estabilização da memória, especialmente durante os primeiros dias, até as primeiras semanas após a aquisição. Após esse período as informações adquiridas e já estabilizadas vão sendo destinadas as demais estruturas adquirindo um caráter independente das atividades hipocampais (Izquierdo *et al.*, 2006; Bekinschtein *et al.*, 2007).

Uma vez consolidadas, as MLD podem persistir por um longo período que pode se estender por anos (Izquierdo, 2008). Cerca de 12 h pós-aquisição, uma nova fase dependente de eventos moleculares como síntese de novas proteínas é requerida nas células piramidais do hipocampo, a fim de formar um traço para persistência da MLD

adquirida. Essa fase é denominada persistência e resulta na manutenção da MLD (Bekinschtein *et al.*, 2007) (Fig. 1).

Dentre os elementos importantes para a fase de persistência da MLD estão o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e proteína cinase regulada por sinal extracelular (ERK). Há um aumento significativo nos níveis de BDNF e de fosforilação das proteínas cinase ativadas por mitógenos (MAPKs) /ERK $\frac{1}{2}$ 12 h após o aprendizado, além do aumento da síntese dos fatores de transcrição zif268 e c-Fos 24 h depois do treino (Bekinschtein *et al.*, 2007, Medina *et al.*, 2008).

Bekinschtein e colaboradores (2007) demonstraram que onde a atividade do BDNF foi inibida em neurônios da região CA1 do hipocampo, foi observado uma redução significativa nos níveis de expressão de c-Fos 9 h e 24 h depois do treino e uma expressiva redução na memória remota. A quantidade de ERK fosforilada também ficou comprometida nesses neurônios, uma vez que o BDNF é um importante ativador da ERK e de sua atividade nos processos de fosforilação do elemento de resposta ao AMPc (CREB) em função da PLD, importante forma de plasticidade sináptica nos mecanismos de persistência da memória de longa duração (Bekinschtein *et al.*, 2007a; Bekinschtein *et al.*, 2008).

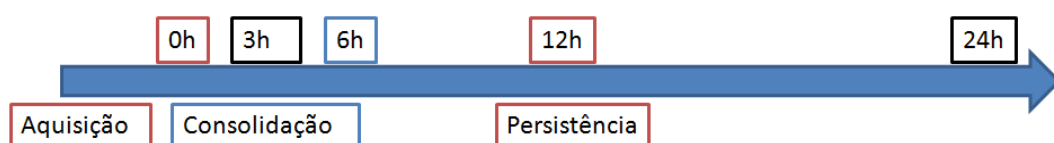


Figura 1. Diferentes fases da memória. A aquisição consiste na primeira fase da memória, que acontece durante a experiência a ser aprendida. Imediatamente após a aquisição tem início a consolidação, fase que requer a ativação de inúmeros mecanismos bioquímicos de sinalização e transcrição de proteínas e dura cerca de 6 horas. Ao redor de 12h a partir da aquisição inicia a fase de persistência da memória, uma reativação endógena dos mecanismos moleculares dependentes de nova síntese proteica na região CA1 do hipocampo, o que resulta na manutenção da MLD.

1.3. Morfologia celular

Os dendritos apresentam micro especializações na sua superfície, chamadas espinhas dendríticas, as quais são altamente enriquecidas com actina, além de serem compostas por microtúbulos e filamentos intermediários. Diversos estudos demonstram que condições que induzem a atividade sináptica levam a mudanças no formato e número das espinhas. Esse processo parece envolver a interação entre actina e outras proteínas associadas ao citoesqueleto, sendo de extrema relevância à formação do aprendizado e memória (Capani *et al.*, 2001; Merriam, 2011; Vastagh *et al.*, 2012) (Fig. 2).

Técnicas de imagem como microscopia confocal e eletrônica, têm possibilitado a visualização de mudanças estruturais em nível de espinhas dendríticas, por influência da atividade sináptica. A observação de cultura organotípica de células piramidais do hipocampo mostrou mudança na forma das espinhas dendríticas, especialmente em nível da cabeça dos espinhos. Tais alterações foram bloqueadas reversivelmente por citocalasina, um importante inibidor da polimerização da actina, sugerindo que o processo é mediado pela formação de polímeros dessa proteína (Nikonenko *et al.*, 2002).

Com auxílio de microscopia eletrônica foi possível estimar a faixa de densidade de espinhos nos dendritos adultos de células piramidais da região CA1 e de células granulares do hipocampo. Essas regiões são densamente compostas por espinhas dendríticas, aproximando-se de 2-4 espinhos por micrômetro de dendritos. As dimensões das espinhas sinápticas da região CA1 do hipocampo estão fortemente relacionadas com as da densidade pós-sináptica (DPS), já tendo sido evidenciadas correlação dimensional

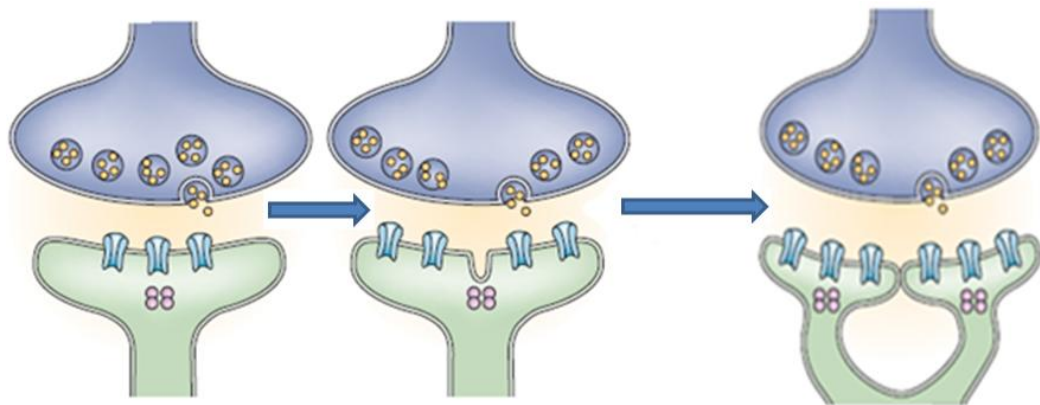
entre a PSD e a área da cabeça das espinhas (Herris, Stevens, 1989; Nimchinsky *et al.*, 2002).

Através da utilização de técnicas de marcação por coloração de F-actina, foi observada alta concentração de F-actina na cabeça das espinhas dendríticas, mas a presença dos filamentos diminui ou desaparece no pescoço das espinhas, sugerindo que F-actina é mais numerosa na cabeça do que no pescoço dos espinhos (Fifková e Delay, 1982; Landis e Reese, 1983; Hirokawa, 1989; Hotulainen *et al.*, 2009). A existência de altos níveis de actina em espinhas dendríticas está de acordo com estudos anteriores usando imunocitoquímica bem como em exame de ultra-estrutura de tecido nervoso, onde também se confirmou a presença de altos níveis de F-actina, com cerca de 8-9 nm de diâmetro, nas cabeças das espinhas dendríticas adultas (Capani *et al.*, 2001; Nimchinsky *et al.*, 2002).

Espinhas dendríticas da região CA1 do hipocampo de ratos podem sofrer mudanças em sua forma e número, em resposta a estimulação tetânica que induz a PLD. As alterações na dimensão das espinhas podem influenciar a eficácia sináptica, constituindo uma base celular para a plasticidade neuronal e formação da memória (Herris e Stevens, 1989; Lamprecht *et al.*, 2004) (Fig. 2).

A (DPS) é uma especialização do citoesqueleto na junção sináptica, é ligeiramente curva e segue o contorno da cabeça da coluna dendrítica, sendo quase invariavelmente encontrada em oposição direta à zona ativa da terminação pré-sináptica. Palay em 1958 percebeu que a membrana pós-sináptica era mais espessa e mais densa na região que ficava em oposição ao terminal pré-sináptico, em detrimento dos demais locais da membrana (Ziff, 1997; Capani *et al.*, 2001).

A DPS consiste de citoesqueleto e proteínas regulamentares, algumas das quais ficam em contato com a rede de canais iônicos pós-sinápticos. Além disso, a DPS apresenta uma matriz estrutural que ancora proteínas cinases, fosfatases e demais moléculas sinalizadoras, o que sugere que essa região é organizadora geral da maquinaria de sinalização e transdução pós sináptica. A DPS é claramente visualizada com técnicas de microscopia eletrônica, em sinapses glutamatérgicas da região CA1 do hipocampo e de células de Purkinje (Hering e Sheng, 2001; Cingolane e Goda, 2008; Spruston e Nelson, 2008).



(Lamprecht *et al.*, 2004)

Figura 2. Aumento no número de espinhas pós-sinápticas em resposta ao estímulo pré-sináptico, nos neurônios piramidais da região CA1 do hipocampo. Essas alterações na morfologia e no número das espinhas são acompanhadas por um encremento no número e distribuição dos receptores glutamatérgicos e de polirribossomos, bem como na atividade das cinases e outras moléculas envolvidas no processo de sinalização intracelular em CA1 do hipocampo, em função do aprendizado.

1.4 Bases moleculares do aprendizado e memória e sinalização intracelular

O processo de plasticidade na região CA1 do hipocampo é desencadeado pela ativação de neurônios glutamatérgicos. Os neurônios pré-sinápticos liberam o neurotransmissor glutamato na fenda sináptica, o qual se liga nos receptores glutamatérgicos pós-sinápticos do tipo AMPA, NMDA e metabotrópicos. Assim, os

receptores AMPA, que são canais iônicos, permitem a entrada de Na^+ despolarizando a célula. A despolarização celular juntamente com a ligação do glutamato nos receptores NMDA, os quais também são canais iônicos, resulta na abertura desses receptores e influxo de Ca^{+2} na célula, iniciando uma cascata de eventos moleculares que irão afetar a expressão gênica e o arranjo proteico nas células (Lamprecht *et al.*, 2004) (Fig. 3).

O aumento da concentração de Ca^{+2} intracelular ocorre principalmente pelo influxo através dos canais iônicos glutamatérgicos AMPA e NMDA ou pela liberação do cálcio intracelular a partir de seus reservatórios. Esse aumento nos níveis de Ca^{+2} intracelular leva a ativação de algumas proteínas cinases, dentre elas a proteína cinase ativada por cálcio (PKC), proteína cinase cálcio calmodulina dependente II (CamKII) e proteína cinase dependente de AMPc (PKA), além de outras moléculas como segundos mensageiros e fatores de transcrição. A CamKII é ativada por fosforilação no hipocampo diretamente pelo influxo de Ca^{+2} intracelular, principalmente nos primeiros minutos após a aquisição de uma memória; sua atividade é intensamente elevada aos 30 min após a aquisição, mas retorna aos níveis basais em até 120 minutos. Ainda nos primeiros minutos após um treino comportamental a CamKII torna-se capaz de se autofosforilar, induzindo sua atividade independente do influxo de Ca^{+2} celular (Izquierdo e Medina, 1997; West *et al.*, 2001; Frankland *et al.*, 2004; Izquierdo *et al.*, 2006) (Fig. 3).

Evidências substanciais demonstram que nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo, a atividade de CamKII é o gatilho da PLD. A CamKII fosforila os receptores ionotrópicos do tipo AMPA favorecendo suas funções de canalização de Na^+ para o meio intracelular e prolongando a excitabilidade celular (Maiford *et al.*, 1996; Bejar *et*

al., 2002) além de fosforilar inúmeras proteínas da DPS (Biedenkapp e Rudy, 2007; Medina *et al.*, 2008) (Fig. 3).

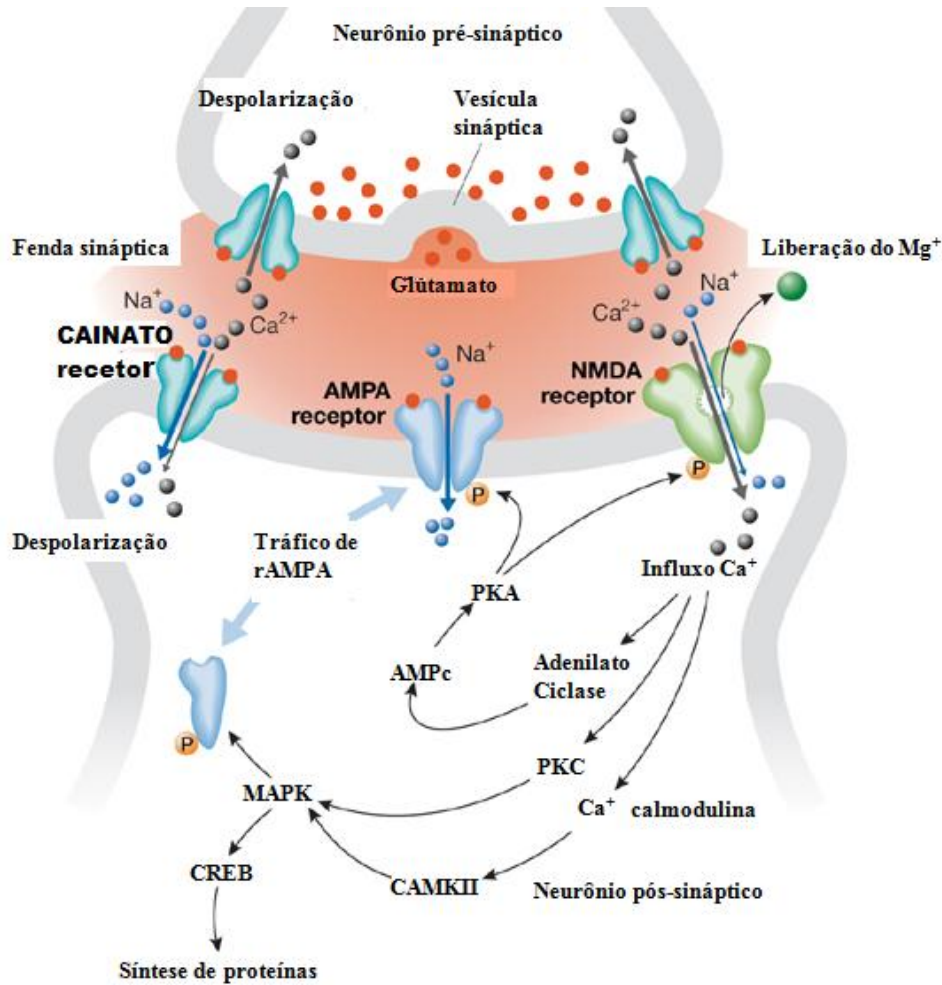
A proteína cinase dependente de cálcio (PKC) é moduladora da atividade sináptica e essencial para continuidade da PLD após sua indução em CA1 do hipocampo. Essa cinase está fortemente ativa aos 30 min após aquisição e sua atividade pós-sináptica ativa a enzima adenilil ciclase, o que resulta na indução da PKA. Esta última, por sua vez, também adiciona fosfato nos receptores glutamatérgicos do tipo AMPA, mas principalmente fosforila o fator de transcrição CREB. Com esta ação sobre o CREB, a PKA modula a expressão gênica e a síntese de proteínas que irão estruturar a célula e desenvolver o processo de plasticidade (Shafe *et al.*, 1999; McGaugh, 2000, Vianna *et al.*, 2000; Izquierdo *et al.*, 2006) (Fig. 3).

Além desse incremento na célula pós-sináptica devido à melhoria estrutural com o aumento da síntese de novas proteínas, e molecular pelo aumento da fosforilação de diversas proteínas e receptores celulares, também há uma regulação positiva na liberação de glutamato pela célula pré-sináptica. Esse mecanismo se dá pela ação de uma isoforma de PKC pré-sináptica e da proteína cinase dependente de guanosina monofosfato cíclico (PKG). A primeira fosforila a proteína associada ao crescimento 43 kd (GAP-43) na terminação pré-sináptica, aumentando a liberação de glutamato na fenda sináptica. Já a PKG, que é ativada pelo aumento da concentração intracelular de guanosina monofosfato cíclico (GMPc), atua em nível pós-sináptico induzindo a função de três importantes mensageiros retrógrados, o óxido nítrico (NO), o monóxido de carbono (CO) e o fator de ativação plaquetário (PAF). Essas três moléculas realizam o

transporte retrógrado até a célula pré-sináptica onde estimulam a liberação de glutamato (Izquierdo, Medina, 1997; Fitzsimonds e Poo, 1998; Zhuo, 1998; Ota *et al.*, 2010).

Outras importantes moléculas relacionadas com a plasticidade sináptica são as Rho GTPases, pertencente a superfamília da Ras GTPases monoméricas. As Rho estão envolvidas com a comunicação entre a superfície celular e o citoesqueleto de actina. Essas moléculas, assim como as demais pertencentes à superfamília da Ras, variam entre as formas ativas e inativas devido ao fator de troca de nucleotídeo guanina (GEFs), que ativa a Rho desligando-a do GDP e associando-a a um GTP. A inativação da Rho ocorre através das GTPases da Rho, que hidrolizam o GTP trocando-o por um GDP. No SNC os GEFs são ativados principalmente pelo influxo de Ca^{+2} na célula e pela atividade do diacilglicerol, sendo esses dois, importantes desencadeadores da atividade das Rho GTPases (Saneyoshi *et al.*, 2010).

Dentre os substratos da Rho está a proteína cinase ativada por mitógeno (MAPKKK/Raf). Esta é a primeira molécula ativa numa cascata de eventos conhecida como via da Erk/MAPK, a qual atua no núcleo celular resultando em mudanças na expressão gênica e na atividade proteica. Após MAPKKK/Raf ser ativada por Rho ela fosforila uma segunda molécula da via da Erk, a Mek/MAPKK, a qual fosforila e ativa a própria Erk/MAPK. Esta finalmente atua sobre o núcleo celular fosforilando o CREB e induzindo a transcrição de genes que codificam a síntese de proteínas que incrementarão a estrutura pós-sináptica (Frost *et al.*, 1997; Eblen *et al.*, 2002; Bozon *et al.*, 2003).



http://1.bp.blogspot.com/_G8UspQQKWhY/S6ZJA4oRfjI/AAAAAAAAADI/VjRowv2CFlo/s320/ampa+nmda.jpg, alterado por André Peres Koth

Figura 3. Receptores glutamatérgicos e o gatilho do processo de plasticidade sináptica no aprendizado. O glutamato liberado pela terminação pré-sináptica atua sobre os receptores AMPA na célula pós-sináptica levando a sua despolarização pelo influxo de sódio. Com a redução do potencial de membrana ocorre o influxo de cálcio na célula através dos receptores NMDA, canais iônicos assim como os receptores AMPA, a despolarização levando ao influxo de sódio e despolarização da célula. O influxo de cálcio desencadeia uma cascata de sinalização intracelular envolvendo a atividade de diversas moléculas tais como as cinases CaMKII, PKC, MAPK e PKA, o segundo mensageiro AMPc, dentre outras. Esse processo resulta na fosforilação e aumento na atividade dos receptores AMPA, bem como na fosforilação e ativação do fator de transcrição CREB e consequente síntese de proteínas que irão incrementar o citoesqueleto e aumentar o número de moléculas e organelas importantes ao mecanismo de plasticidade sináptica.

1.4.1 Cinase ativada por p21 (PAK)

A polimerização da actina é um evento fundamental para o incremento do citoesqueleto, acarretando no aumento da superfície pós-sináptica, do número de receptores de superfície celular e desenvolvimento das espinhas dendríticas e da densidade pós-sináptica. Dentre as diversas moléculas que participam da cascata enzimática que modula esse processo de polimerização proteica nos neurônios piramidais da região CA1 do hipocampo estão as cinases ativadas por p21 (PAK), outro substrato das Rho GTPases, mais precisamente das Rac-1 e Cdc42 (Saneyoshi *et al.*, 2010).

Nos mamíferos as PAK estão distribuídas em dois grandes grupos de diferentes isoformas: Grupo I, com as PAK 1, 2 e 3 e Grupo II, com as PAK 4, 5 e 6. Diversos estudos têm demonstrado o envolvimento das PAK na dinâmica do citoesqueleto, movimento, migração e proliferação celular. As PAK do grupo I estão presentes no encéfalo e sua atividade está sendo implicada em funções como retardo mental, doença de Alzheimer e processamento da memória (Bokosh, 2003; Miller *et al.*, 2006; Kreis e Barnier, 2009).

As PAK do grupo I são estruturalmente semelhantes e nos mamíferos apresentam uma homologia superior a 90%. As isoformas 2 e 3 das PAK tem respectivamente 97% e 93% dos seus amino ácidos iguais aos da isoforma 1, mas suas funções não são semelhantes. Em roedores e primatas a PAK 1 é encontrada nos axônios, dendritos e núcleo celular, principalmente em células do hipocampo, cerebelo e córtex (Manser *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2005) enquanto a PAK 3 é

mais expressa nos corpos celulares e dendritos, preferencialmente em células do hipocampo, córtex, amígdala e bulbo olfatório (Manser *et al.*, 1995; Ong *et al.*, 2002).

Acredita-se que as PAK encontram-se na forma inativa de um homodímero pela associação de duas moléculas, onde o domínio N-terminal regulatório de uma se liga e inibe o domínio C-terminal catalítico da outra. As pequenas GTPases, como a Cdc42 e a Rac1, induzem uma alteração conformacional nas PAKs possibilitando a sua fosforilação por outras cinases, resultando na sua ativação. Primeiramente a Cdc42 ou Rac1 se ligam a região reguladora N-terminal na molécula da PAK, no domínio de ligação de p21(PBD), perturbando a dimerização e levando a molécula a expor seu sítio de fosforilação. Para que a PAK torne-se ativa é necessário que ela sofra uma regulação alostérica, realizada pelas GTPases Cdc42 e Rac-1, e seja fosforilada por outras cinases, tais como a proteína cinase dependente de fosfatidilinositol (PDK1) (Kreis e Barnier, 2009).

As PAK são importantes nos processos de polimerização da actina e incremento do citoesqueleto em diferentes regiões do SNC, inclusive em CA1 do hipocampo. O laboratório do pesquisador Tonegawa forneceu os primeiros sinais experimentais acerca da participação das PAK na plasticidade sináptica. Através de estudos realizados com ratos que apresentavam alteração transgênica para essas cinases, eles observaram que a interferência na atividade das PAK resultava em redução das espinhas dendríticas em neurônios corticais e déficit de memória (Hayashi *et al.*, 2004).

Em um trabalho experimental com neurônios hipocámpais mutantes que superexpressavam PAK1 e PAK3, foi observado um aumento significativo no desenvolvimento dos dendritos, bem como no número e comprimento das espinhas. O

aumento no número de espinhas dendríticas e das saliências dendríticas nos neurônios hipocâmpais que expressaram a PAK1 em relação aos controles foi de 39% e 176%, respectivamente. Dados que mais uma vez sugerem que a atividade cinase das PAK é importante para morfogênese das espinhas dendríticas e para formação das sinapses excitatórias (Zhang *et al.*, 2005).

Ainda, as PAK exercem um papel significativo nos eventos que possibilitam o incremento do citoesqueleto de células glutamatérgicas, através de uma importante via que reduz a atividade da enzima coafilina, a principal reguladora da polimerização da actina. Essa enzima, quando desfosforilada, torna-se ativa e liga-se a actina desestabilizando a formação dos polímeros. A LIMK, uma outra cinase de expressiva competência na morfologia dendrítica e PLD, a qual fosforila a coafilina suprimindo sua atividade, inibindo a ligação desta com a actina e, portanto, favorecendo a polimerização. As PAK quando ativadas fosforilam a LIMK induzindo sua função de cinase inibitória sobre a coafilina e elevando os níveis de polimerização de actina (Asrar *et al.*, 2009; Kreis e Barnier, 2009; Saneyoshi *et al.*, 2010).

As PAK também atuam na transmissão de sinal intracelular através da via da Erk, que resulta na ativação de fatores de transcrição intranuclear e síntese de novas proteínas. Estudos mostram que as PAK exercem regulação positiva na MAPKKK/Raf-1 no resíduo Ser-338, melhorando seu acoplamento Ras-Raf, contribuindo para sua máxima atividade (Frost *et al.*, 1997). Também foi observado a capacidade das PAK de fosforilar a MAPKK/Mek1 no resíduo Ser-298, induzindo a autofosforilação em sua alça de ativação, tornando-a ativa independentemente da via Ras/Raf. Estas observações tornam as PAK importante reguladoras da Erk (Frost *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 2000;

Slack-Davis *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2007). Evidências experimentais com camundongos *knockouts* (KO) para PAK 3 demonstram uma diminuição da fosforilação do fator de transcrição CREB, o que fortalece a ideia de que essa cinase está envolvida na regulação do incremento do citoesqueleto e no desenvolvimento da plasticidade sináptica e memória (Meng *et al.*, 2005; Muller *et al.*, 2006).

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Identificar o envolvimento das cinase ativada por p21 (PAK) do grupo I, no processamento da memória aversiva em ratos.

2.2. Objetivos Específicos

- Identificar o envolvimento das PAK I, na fase de aquisição das memórias de curta e longa duração, no teste de medo condicionado contextual;
- Verificar a participação das PAK I, nas fases inicial e tardia da consolidação da memória de longa duração, no teste de medo condicionado contextual;
- Verificar a importância das PAK I, na evocação da memória de longa duração, avaliada na tarefa de medo condicionado contextual;
- Investigar o envolvimento das PAK I, na persistência da memória de longa duração, através do teste de medo condicionado contextual.

3. Artigo

Participation of p21 activated kinase in aversive memory processes in rats

André P. Koth¹, Gustavo M. Parfitt¹, Gessyka Veleda², Juliana de Quadros Buonocore², Daniela M. Barros^{1,2}

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Fisiologia Animal Comparada - Laboratório de Neurociências - (FURG)

² Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, 96300-900, BRAZIL.

Revista: *Neurobiology of Learning and Memory*

(Fator de impacto: 3,721)

Research Paper

Running title: PAK - consolidation and persistence of memory

Title: Participation of p21-activated kinase in aversive memory processes in rats

André P. Koth¹, Gustavo M. Parfitt¹, Gessyka Veleda², Juliana de Quadros Buonocore², Daniela M. Barros^{1,2}

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Fisiologia Animal Comparada - Laboratório de Neurociências - (FURG)

² Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, 96203-900, BRAZIL

Correspondence concerning this article should be addressed to Daniela Martí Barros - Laboratório de Neurociências, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande (FURG) – Av Itália, Km 8 - Rio Grande, RS, 96203-900, Brazil

e-mail: barrosdm@yahoo.com.br

Keywords: p21-activated kinases, memory persistence, memory consolidation, contextual fear conditioning.

Abstract

Several studies have shown the involvement of p21-activated kinase (PAK) in the dynamics of cellular cytoskeleton, resulting in cognitive and mnemonic changes. The aim of this work was to verify the role of group I PAK in aversive memory, set through the contextual fear conditioning (CFC) task in rats treated with an inhibitor of group I PAK, IPA-3 (0.5, 1.0 or 2.0 mM). The inhibitor was infused in the CA1 region of the hippocampus while control groups received saline or vehicle (DMSO 3%). Treatments were performed 15 min before, or 15 min, 3, 6 or 12 h after the training session (TrS) in the CFC, in order to analyze the effect of this enzyme upon acquisition, consolidation, retrieval and memory persistence. Test sessions (TS) were carried out 90 min after training in the groups treated 15 min prior to TrS and 15 min after TrS in an attempt to verify the participation of group I PAK in short-term memory (STM). Further TS were carried out 24 h after TrS in order to evaluate the treatments against long-term memory (LTM) parameters. Groups treated with IPA-3 at three concentrations, 12 h after TrS, were also tested 7 days afterwards to evaluate memory persistence. Results show that the inhibition of group I PAK hindered the early and late phases of consolidation as well as the persistence of memory. No effects were observed on STM, neither on the acquisition nor on the retrieval of LTM. These findings suggest that group I PAK plays an important role in consolidation and persistence of memory, since the inhibition of PAK in the CA1 region of hippocampus yielded an amnesic effect in rats subjected to contextual fear conditioning task.

1. Introdução

Memory formation relies on a complex process which involves molecular mechanisms and morphological alterations that stabilize the acquired information (Lamprecht & LeDoux, 2004). However, this process is not immediate and occurs in distinct phases. The hippocampus is a crucial region for the acquisition, consolidation, retrieval and persistence of information (Bernabeu et al., 1997). After acquisition, memory undergoes a process of consolidation that lasts from 3 to 6 hours. Then, the acquired information is stabilized through morphological and molecular changes in the synapses involved in the activation of the system (Kandel, 2001). Synaptic plasticity is the basis of long-term potentiation (LTP) and memory formation (Bliss & Collingridge, 1993). In this process, there is an increase in the polymerization and distribution of actin in the cytoskeleton as well as an increment in pyramidal cells in the hippocampus (Sweatt, 1999). The molecular events that lead to the polymerization of actin and protein synthesis in the hippocampal CA1 region involve the activity of several proteins (Izquierdo, Bevilaqua, Rossato, Bonin, Medina, & Cammarota, 2006; Fortin et al., 2010). Among these proteins is the p21 serine/threonine activated kinase (PAK), which has been linked to mechanisms of plasticity and mnemonic processes by an increasing number of studies *in vitro* as well as with knockout (KO) animals (Meng, Meng, Hanna, Janus, & Jia, 2005; Boda, Jourdain, & Muller, 2008).

The activity of PAK is regulated by Rho GTPases Cdc42 and Rac1. These GTPases induce a conformational change in PAK, allowing its phosphorylation by other kinases and resulting in its activation. PAK has been implicated in important intracellular signaling pathways that regulate many morphogenetic processes, such as

changes in cytoskeleton and development of cellular plasticity. Studies performed on this kinase have demonstrated its importance in some areas of human health, including the neurological field (Chan & Manser, 2012). Also, several studies have shown the involvement of PAK in cellular cytoskeleton dynamics, resulting in cognitive and mnemonic deficits (Manser et al., 1995). Research by Tonegawa provided the first experimental insights about the participation of PAK in synaptic plasticity, through a study on transgenic rats with low PAK activity. The animals presented a reduction in the density of dendritic spines in cortical neurons as well as memory deficits (Hayashi et al., 2004).

While active, PAK can directly induce the activity of Raf1 and/or MEK, enhancing Erk signaling pathway and culminating in CREB phosphorylation and protein synthesis. Furthermore, the activity of PAK in the Rac-LIMK pathway promotes the phosphorylation and consequent inactivation of cofilin, thus inducing polymerization of actin (Meng et al., 2005). A study with KO mice for the gene that encodes PAK3 showed that the animals presented a deficit in the late phase of LTP, as well as decreased levels of phosphorylated CREB (Meng, Meng, Hanna, Janus, & Jia, 2005). These data point to the role of PAK in the formation, maturation and establishment of dendritic spines (Asrar, Meng, Zhou, Todorovski, Huang, & Jia, 2008; Kreis & Barnier, 2009; Saneyoshi, Fortin, & Soderling, 2010).

The aim of this study was to verify the role of group I PAK in the acquisition, consolidation, persistence and retrieval of aversive memory, set through the task of contextual fear conditioning in rats treated with IPA-3, an inhibitor of PAK from group I, infused in the CA1 region of the hippocampus.

2. Materials and Methods

2.1 Subjects and stereotaxic surgery

The animal model used in this study was *Rattus norvegicus*, of the Wistar strain. Male rats n = 350 (age 2-3 months; weight 250-280 g) were obtained from the breeding colony of Universidade Federal do Rio Grande (Rio Grande, RS, Brazil). The animals were kept in groups of five in each cage, with a 12 h light/dark cycle, at a temperature of 22 °C ± 1 °C, with food and water *ad libitum*.

After a week of acclimation, the animals were submitted to a stereotaxic surgery for the bilateral implant of cannulae in the CA1 region of the hippocampus (see details, Barros, Ramirez, Dos Reis, & Izquierdo, 2004), under Ketamin (62.5 mg/kg) and Xilazin (13 mg/kg) anesthesia. The guide cannulae were fixed with acrylic resin 1 mm above CA1 region of dorsal hippocampus, following the coordinates relative to bregma: anteroposterior, 4.3 mm; mediolateral, 3.0 mm; dorsoventral, 1.8 mm (Paxinos & Watson, 1997). At the end of the surgery, in order to prevent infections, the animals were treated with an antibiotic association (Pentabiótico®, Brazil). This work has been approved by the ethics committee for animal experimentation of FURG, under the register 067/2011.

2.2 Treatments

Treatments were administered through an injection of either saline solution, DMSO 3% (vehicle, Sigma), or IPA-3 (PAK I inhibitor, Sigma) at concentrations of 0.5, 1.0 or 2.0mM (Deacon, 2008), bilaterally into the CA1 region of the hippocampus. An infusion cannula, coupled with a polyethylene tube in a Hamilton microsyringe,

protruded 1.0 mm beyond the guide cannula introduced in the CA1 region of the hippocampus. In all the infusion procedures, 1 μ L of solution was slowly injected at a constant rate for 30 s, after which the infusion cannula was left in its place for an additional 15 s in order to avoid backflow. Infusions were carried out first on one side and then on the other, so the total infusion time was about 90 s. The treatments were administered either 15 min prior to the training session, or 15 min, 3 or 6 or 12 h after training; or 15 min prior to the test session, in order to verify the participation of PAK I in acquisition, consolidation, persistence and retrieval of memory, respectively, in rats submitted to the contextual fear conditioning task (Barros, Ramirez, & Izquierdo, 2005; Parfitt, Campos, Barbosa, Koth, & Barros, 2012).

2.3 Behavioral tests

2.3.1 Contextual fear conditioning

After recovering from surgery, the animals were manipulated for three days during 10 min to avoid neophobia and then submitted to the contextual fear conditioning task (CFC). The CFC apparatus consisted in an acrylic box (25X25X25 cm), whose floor consisted of parallel stainless steel bars spaced 1.0 cm apart from each other.

During the training session, the animals were placed in the apparatus for a period of 5 min. After the first 3 minutes of habituation, the animals underwent a sequence of 3 footshocks of 0.7 mA, each lasting 2 s. After the shocks, they remained in the device until completing the period of 5 min. In order to evaluate short-term memory, a test session was performed 90 min after the training. Memory retention was tested 24 h or 7 days post-training in order to evaluate long-term and persistence of memory,

respectively. Test session procedure was similar to the training, also lasting for 5 minutes. However, no foot shock was applied, and the latency of ‘freezing’ behavior was registered. Freezing was defined as the time during which the animals showed no motion except for breathing movements (Bekinschtein, Cammarota, Igaz, Bevilaqua, Izquierdo, & Medina, 2007).

2.3.2 Open Field

In order to discard any possible effects of the treatments in the motor activity of the animals, a test using the open field (OF) task was individually performed after the CFC. The OF apparatus consisted in a wood box (40x60x50cm) with the floor divided into 12 identical squares and the front wall made of glass. Initially, the subjects were placed on the posterior left square area of the box and allowed to explore the arena for a period of 5 min. During this period an observer registered the number of times the animals crossed the lines, as well as the number of times the animals adopted rearing position.

2.4 Cannulae placements

Post-mortem verification of cannulae placements were performed as previously described (Barros, Ramirez, Dos Reis, & Izquierdo, 2004; Barros, Ramirez, & Izquierdo, 2005; Parfitt, Campos, Barbosa, Koth, & Barros, 2012). Briefly, 1 µl of 4% methylene blue in saline solution was infused through the cannulae. The animals were then sacrificed by decapitation and had their brains stored in formalin for at least 48h. The cannulae placements, as verified by histological examination, were found to be correct (within 1mm of the intended site) in 93% of the animals. Only the behavioral data from these animals were analyzed.

2.5 Statistical Analysis

Results obtained from contextual fear conditioning are expressed in the percentage relation to the control groups, and open field habituation task data are expressed in mean \pm SEM. After verifying the normality and homogeneity of variance, statistical analysis was made through analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test ($P < 0.05$ was considered to indicate statistical significance).

3. Results

Among the groups infused with saline (control) or DMSO (vehicle), the results showed no significant difference ($P > 0.05$, ANOVA followed by Dunnett's test, $n = 10$) on CFC, suggesting that this vehicle did not cause any changes in the behavior of the subjects.

Animals infused 15 min before the training session were tested twice: first 90 min and then 24 h after the training session, in order to evaluate the effects of the treatments upon short- and long-term memory, respectively. When infused 15 min prior to the training session, treated groups showed no significant difference from control group ($P > 0.05$; ANOVA followed by Dunnett's test; $n = 10-13$) when tested 90 min and 24 h after training (figure 1). Also, when infused 15 min after the training, treated and control groups showed no significant differences ($P > 0.05$; ANOVA followed by Dunnett's test; $n = 10-15$) when tested 90 min after the training session. However, when tested 24 h post training, the animals treated with IPA-3, at concentrations 0.5, 1.0 and

2.0 mM, showed impairments in long-term memory ($P < 0.05$; ANOVA followed by Dunnett's test; $n = 10-15$) (figure 2A).

All doses of IPA-3 administered 3 h post training hindered ($P < 0.05$; ANOVA followed by Dunnett's test; $n = 10-14$) long-term memory on the subjects (figure 2B). Conversely, no differences among the groups ($P > 0.05$; ANOVA followed by Dunnett's test; $n = 10$) that received a group I PAK I inhibitor 6 h after training were observed in the tests carried out 24 h after training session (figure 2C).

The animals infused 12 h after training were tested on the contextual fear conditioning task 24 h or 7 days after training, in an attempt to verify the LTM and persistence of memory, respectively. The group tested 24 h post training showed no memory impairment whatsoever ($P > 0.05$; ANOVA followed by Dunnett's test; $n = 9-15$) (figure 3A). Conversely, in the groups treated with IPA-3 12 h after training, a significant impairment on memory was observed on the animals tested 7 days post training (figure 3B) when compared to the control group ($P < 0.05$; ANOVA followed by Dunnett's test; $n = 10-15$).

When the infusion was carried out 15 min prior to LTM test session, no significant differences were observed among treated and control groups ($P > 0.05$; ANOVA followed by Dunnett's test; $n = 10-12$) (figure 4).

The animals were also submitted to the OF, in order to detect any possible influences of the treatment on their motor activity. However, no abnormalities or significant differences were observed when the treated and control groups were compared ($P > 0.05$; ANOVA followed by Dunnett's test), suggesting that the treatments caused no interference in the motor activity of the animals (Table 1).

In summary, no dose-dependent effect on the memory of the rats was shown by the administration of IPA-3 in the CA1 region of the hippocampus, since the amnesic effect caused by this inhibitor was significantly similar in all the 3 doses administered.

4. Discussion

Results obtained in this work highlight the participation of PAK in memory processes. We observed that the inhibition of group I PAK, through the antagonist IPA-3, impaired the early and late phases of memory consolidation. Also, when the inhibitor was infused twelve hours after the training session, which is an important window for the persistence of memory, its maintenance was impaired.

On the other hand, when IPA-3 was administered 15 min prior to the training session or 6 h afterwards, as well as 15 min prior to the test session, no significant differences were observed in relation to the control groups. These data may suggest that group I PAK is not crucial to acquisition, to the late phase of consolidation (6 h after training session) or to memory retrieval. Importantly, these results may not be attributed to motor activity alterations, since there were no significant differences between control and groups that received IPA-3 at three concentrations 15 min before the exposure in the open field apparatus, concerning crossings and rearings (Table 1).

These findings corroborate the work of Hayashi and collaborators (Hayashi et al., 2004) with mice expressing a dominant-negative PAK transgene. The animals presented mnemonic alterations when tested on the CFC 24 h after training. However, this effect was not observed when the animals were tested 40 min post training. The

authors also verified a reduction in the density of dendritic spines in the cortical neurons of these animals (Hayashi et al., 2004).

The infusion of cytochalasin in the lateral amygdala of rats inhibited actin polymerization in this region, thus impairing long-term, but not short-term memory. The rats had their memory tested on the CFC 1 h after training and no alterations were observed. Conversely, results of the test carried out 24 h after the training showed severely impaired memory formation (Mantzur, Joels, & Lamprecht, 2009).

Additionally, several substrates are triggered by PAK and Rac1, such as Raf and Mek, inducing CREB and LIMK phosphorylation, leading to gene expression and actin polymerization (Muller, Boda, Nikonenko, & Alberi, 2006). Meng and co-workers (2005) have observed a reduction in LTP levels in hippocampal neurons of knockout mice that lacked PAK3 gene. Deficits in the actin polymerization hinder synaptic plasticity, since LTP formation is preceded by an enhancement in the cofilin phosphorylation through LIMK (Okamoto, Nagai, Miyawaki, & Hayashi, 2004).

The time points in which PAK impaired learning in the present study match the periods in which MAPK/Erk and PKA present high activity. It also coincides with the increase in phosphorylated CREB that leads to gene transcription and protein synthesis (Bernabeu et al., 1997; Vianna et al., 2000). The activity of Erk increases significantly in the hippocampus after the training of fear conditioning. Its inhibition immediately after learning impairs memory retention tested 24 h later (Runyan, Moore, & Dash, 2004; Villarreal & Barea-Rodriguez, 2006). Another study using mutant mice lacking the α and δ isoforms of CREB report long-term memory deficits in these animals, in spite of a preserved short-term memory (Bourtchuladze, Frenguelli, Blendy, Cioffi,

Schutz, & Silva, 1994). The present data corroborates previous findings of Izquierdo and co-workers, on several biochemical, pharmacologic, morphological and behavioral distinctions between short- and long-term memory, which were observed through conditioning tasks, especially inhibitory avoidance (Vianna, Izquierdo, Barros, Walz, Medina, & Izquierdo, 2000).

In this work, we also showed that the inhibition of PAK hindered the persistence of long-term memory, in a process taking place about 12 h after training, when a phase known as memory persistence occurs (Bekinschtein, Cammarota, Igaz, Bevilaqua, Izquierdo, & Medina, 2007; Parfitt, Campos, Barbosa, Koth, & Barros, 2012).

In the persistence phase of memory there is an increase in BDNF expression and in Erk activity. Also, increases in the levels of transcription factors zif/268 and c-Fos take place 24 h after training. Any interference in the pathways involving these molecules can vitiate the maintenance of long-term memory (Bekinschtein, Cammarota, Izquierdo, & Medina, 2008; Katche et al., 2010). BDNF binding to Trk receptors affects the phosphorylation of CREB and also the synthesis of proteins through the activation of Rho GTPases, which in turn trigger PAK and Erk signaling pathways (Bekinschtein, Cammarota, Izquierdo, & Medina, 2008). These data led us to raise the hypothesis of a possible influence that PAK may exert on cytoskeleton morphology and learning processes.

Moreover, changes in the activity of PAK were also observed in neurodegenerative pathologies, such as Alzheimer's disease (AD). This condition is characterized by the development of β -amyloid plaques, neurofibrillary tangles and also considerable reduction in neurons and dendritic spines (Zhao et al., 2006). According to

Ma and collaborators (2008), β -amyloid plaques spoil the effectiveness of signaling pathways involving PAK, yielding abnormalities in the distribution as well as in the activity of this enzyme in the hippocampus of AD patients (Ma et al., 2008). Studies with transgenic mice that express AD revealed that young animals (3 months), in which the symptoms are still discrete, showed increased levels of phosphorylated PAK1 in hippocampal cells. However, in older animals (13 months), with high levels of β -amyloid plaques, the phosphorylation of PAK was significantly reduced. In the same study, the authors observed that *post-mortem* samples of hippocampal tissue from patients severely assailed by AD showed significantly higher levels of phosphorylated PAK when compared to samples from normal patients (Nguyen et al., 2009).

In conclusion, the data presented in this work suggest that group I PAK play an important role in the consolidation and persistence of memory, since the inhibition of this kinase in the CA1 region of the hippocampus yielded an amnesic effect in rats subjected to CFC. Further studies concerning the elucidation of signal transduction mechanisms involved in the morphological changes of the cytoskeleton, as well as their correlation with cognitive performance, may be helpful for better understanding the diseases related to memory, such as AD.

Acknowledgments

This study was supported by research grants from the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq). Daniela Martí Barros is a CNPq research fellow. André Peres Koth and Gustavo Morrone Parfitt received a CNPq graduate fellowship, whereas Gessyka Veleda and Juliana de Quadros Buonocore

received CNPq and FAPERGS undergraduate fellowships, respectively. We would like to acknowledge Renan Costa Campos for his suggestions on English writing.

Legend figures

Figure 1. Light gray bars represent STM and dark gray bars represent effects of IPA-3 on LTM. The infusion of IPA-3 in the CA1 region of hippocampus 15 min after training did not interfere in memory acquisition and learning, nor did it hinder memory retrieval when animals were tested 90 min and 24h after training ($P > 0.05$; ANOVA followed by Dunnett's test; $n = 10-13$). Results are expressed in percentage of freezing (mean \pm SEM).

Figure 2. Group I PAK participates in the consolidation of LTM in the CFC (A). The infusion of IPA-3 in the CA1 region of the hippocampus 15 min after training hindered LTM consolidation, also interfering in evocation 24h after training ($P < 0.05$; Dunnett after ANOVA; $n = 10-15$). Conversely, evocation of STM was not affected in the tests carried out 90 min after training ($P > 0.05$; ANOVA followed by Dunnett's test; $n = 10-15$). (B) Infusion of IPA-3 3h after training impaired LTM consolidation, as tested 24h after training ($P < 0.05$; ANOVA followed by Dunnett's test; $n = 14-10$) (C) Infusion of IPA-3 6 h after training did not affect LTM consolidation ($P > 0.05$); ANOVA followed by Dunnett's test; $n = 10$). Results are expressed in percentage of freezing (mean \pm SEM). Asterisks mean significant differences between control and treated groups.

Figure 3. (A) There were no deficits in the formation of LTM when animals were treated with IPA-3 12 h after training ($P > 0.05$; ANOVA followed by Dunnett's test; $n = 15-9$). (B) Infusion of IPA-3 in the dorsal hippocampus 12 h after training impairs memory persistence, as tested 7 days after training ($P < 0.05$; ANOVA followed by Dunnett's test; $n = 10-15$). Results are expressed in percentage of freezing (mean \pm SEM). Asterisks mean significant differences between control and treated groups.

Figure 4. Infusion of IPA-3 in the CA1 region of the hippocampus of rats 15 min prior to the test performed 24 h after training session did not disrupt memory retrieval ($P > 0.05$; ANOVA followed by Dunnett's test; $n = 10$).

References

- Asrar, S., Meng, Y., Zhou, Z., Todorovski, Z., Huang, W. W., & Jia, Z. (2009). Regulation of hippocampal long-term potentiation by p21-activated protein kinase 1 (PAK1). *Neuropharmacology*, *56*(1), 73-80.
- Barros, D. M., Ramirez, M. R., Dos Reis, E., & Izquierdo, I. (2004). Participation of hippocampal nicotinic receptors in acquisition, consolidation and retrieval of memory for one trial inhibitory avoidance in rats. *Neuroscience*, *126*(3), 651-656.
- Barros, D. M., Ramirez, M. R., & Izquierdo I. (2005). Modulation of working, short- and long term memory by nicotinic receptors in the basolateral amygdala in rats. *Neurobiology of learning and memory*, *83*(2), 113-118.
- Bernabeu, R., Bevilaqua, L., Ardenghi, P., Bromberg, E., Schmitz, P., Bianchin, M., et al. (1997). Involvement of hippocampal cAMP/cA MP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. *Neurobiology*, *94*(13), 7041-7046.
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Igaz, L. M., Bevilaqua, L. R. M., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2007). Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. *Neuron*, *53*(2), 261-277.

- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2008). BDNF and memory formation and storage. *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, 14(2), 147-56.
- Bliss, T. V. P., & Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361(), 31-39.
- Boda, B., Jourdain, L., & Muller, D. (2008). Distinct, but compensatory roles of PAK1 and PAK3 in spine morphogenesis. *Hippocampus*, 18(9), 857-61.
- Bokoch, G. M. (2003). Biology of the p21-activated kinases. *Annu. Rev. Biochem*, 72(), 743-81.
- Bourtchuladze, R., Frenguelli, B., Blendy, J., Cioffi, D., Schutz, G., & Silva, J. (1994). Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell*, 79(1), 59-68.
- Chan, P. M., & Manser, E. (2012). PAKs in human disease. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 106(), 171-87.
- Kandel, E. R. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* (New York, N.Y.), 294(5544), 1030-8.
- Deacon, S. W., Beeser, A., Fukui, J. A., Rennefahrt, U. E. E., Myers, C., Chernoff, J., et al. (2008). An Isoform-Selective, Small-Molecule Inhibitor Targets the Autoregulatory Mechanism of p21-Activated Kinase. *Chem. Biol*, 15(4), 322-331.
- Fortin, D. A., Davare, M. A., Srivastava, T., Brady, J. D., Nygaard, S., Derkach, V. A., et al. (2010). LTP-dependent Spine Enlargement Requires Synaptic Ca²⁺- permeable AMPARs Recruited by CaM-kinase I. *NIH Public Access*, 30(35), 11565-11575.
- Hayashi, M. L., Choi, S., Rao, B. S. S., Jung, H., Lee, H., Zhang, D., et al. (2004). Altered cortical synaptic morphology and impaired memory consolidation in forebrain-specific dominant-negative PAK transgenic mice. *Neuron*, 42(5), 773-787.
- Izquierdo, I., Bevilaqua, L. R. M., Rossato, J. I., Bonin, J. S., Medina, J. H., & Cammarota, M. (2006). Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends in neurosciences*, 29(9), 496-505.
- Kandel, E. R. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*, 294(5544), 1030-8.
- Katche, C., Bekinschtein, P., Slipczuk, L., Goldin, A., Izquierdo, I. A., Cammarota, M., et al. (2010). Delayed wave of c-Fos expression in the dorsal hippocampus involved specifically in persistence of long-term memory storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(14), 349-54.
- Kreis, P., & Barnier, J. V. (2009). PAK signalling in neuronal physiology. *Cellular Signalling*, 21(3), 384-393.
- Lamprecht, R., & LeDoux, J. (2004). Structural plasticity and memory. *Nature reviews. Neuroscience*, 5(1), 45-54.

- Li, F., Adam, L., Vadlamudi, R. K., Zhou, H., Sen, S., Chernoff, J., et al. (2002). p21-activated kinase 1 interacts with and phosphorylates histone H3 in breast cancer cells, *EMBO Rep.* 3(8), 767–773.
- Lømo, T. (1966). Frequency potentiation of excitatory synaptic activity in the dentate area of the hippocampal formation. *Acta Physiologica Scandinavica*, 68(Suppl 277), 128.
- Ma, Q., Yang, F., Calon, F., Ubeda, O. J., Hansen, J. E., Weisbart, R. H., et al. (2008). p21-activated kinase-aberrant activation and translocation in Alzheimer disease pathogenesis. *The Journal of biological chemistry*, 283(20), 14132- 43.
- Manser, E., Chong, C., Zhao, Z., Leung, T., Michael, G., Hall, C., et al. (1995). Molecular Cloning of a New Member of the p21-Cdc42/Rac-activated Kinase (PAK) Family. *The journal of biological chemistry*, 270(42), 25070–25078.
- Mantzur, L., Joels, G., & Lamprecht, R. (2009). Actin polymerization in lateral amygdala is essential for fear memory formation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 91(1), 85–88.
- McGaugh, J., & Roozendaal, B. (2002). Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. *Current Opinion in Neurobiology*, 12(2), 205-210.
- Meng, J. S., Meng, Y. H., Hanna, A., Janus, C., & Jia, Z. P. (2005). Abnormal long-lasting synaptic plasticity and cognition in mice lacking the mental retardation gene Pak3. *J. Neurosci*, 25(28), 6641–6650.
- Muller, D., Boda, B., Nikonenko, I., & Alberi, S. (2006). Central Nervous System Functions of PAK Protein Family. *Molecular Neurobiology*, 34(1-2), 67-80.
- Nguyen, T. V., Galvan, V., Huang, W., Banwait, S., Tang, H., Zhang, J., et al. (2009). Signal transduction in Alzheimer disease: p21-activated kinase signaling requires C-terminal cleavage of APP at Asp66. *NIH Public Access Author Manuscript*, 104(4), 1065-1080.
- Okamoto, K. I., Nagai, T, Miyawaki, A., & Hayashi, Y. (2004). Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nature neuroscience*, 7(10), 1104-12.
- Ong, W.Y., Wang, X. S., & Manser, E. (2002). Differential distribution of alpha and beta isoforms of p21-activated kinase in the monkey cerebral neocortex and hippocampus. *Exp. Brain Res*, 144(2), 189–199.
- Parfitt, G. M., Campos, R. C., Barbosa, A. K., Koth, A. P., & Barros, D. M. (2012). Participation of hippocampal cholinergic system in memory persistence for inhibitory avoidance in rats. *Neurobiology of learning and memory*, 97(), 183-88.
- Paxinos, G., & Watson, C. (1997). The rat brain in stereotaxic coordinates. *Elsevier Academic Press, Amsterdam*.

- Sara, S. J., Roulet, P. & Przybylski, J. Consolidation of memory for odor-reward association: β -adrenergic receptor involvement in the late phase. *Learn. Mem.* **6**, 88–96 (1999).
- Tronel, S., Feenstra, M. G. & Sara, S. J. Noradrenergic action in prefrontal cortex in the late stage of memory consolidation. *Learn. Mem.* **11**, 453–458 (2004).
- Runyan, J. D., Moore, A. N., Dash, P. K. (2004). A role for prefrontal cortex in memory storage for trace fear conditioning. *J. Neurosci.* **24**(6), 1288–1295.
- Saneyoshi, T., Fortin, D. A., & Soderling, T. R. (2010). Regulation of spine and synapse formation by activity-dependent intracellular signaling pathways. *Current opinion in neurobiology*, **20**(1), 108-15.
- Squire, L. R. (2009). The legacy of patient H.M. for neuroscience. *Neuron*, **61**(1), 6-9.
- Singh, R. R., Song, C., Yang, Z., & Kumar, R., (2005). Nuclear localization and chromatin targets of p21-activated kinase 1. *The Journal of biological chemistry*, **280**(18), 18130-7.
- Sweatt, J. D., (1999). Toward a Molecular Explanation for Long-Term Potentiation. *Learning & Memory*, **6**(5), 399-416.
- Vianna, M. R. M., Alonso, M., Viola, H., Quevedo, J., Paris, F., Furman, M., et al. (2000). Role of Hippocampal Signaling Pathways in Long-Term Memory Formation of a Nonassociative Learning Task in the Rat. *Learning & Memory*, **7**(5), 333-340.
- Villarreal, J. S., & Barea-Rodriguez, E. J., (2006). ERK phosphorylation is required for retention of trace fear memory. *Neurobiol. Learn. Mem.* **85**(1), 44–57.
- Vianna, M. R. M., Izquierdo, L. A., Barros, D. M., Wals, R., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2000). Short- and Long-term memory: Differential involvement of neurotransmitter systems and signal transduction cascades. *Memory*, **72**(2), 353-364.
- Zhao, L., Ma, Q., Calon, F., Harris-White, M., Yang, F., Lim, G. P., et al. (2006). Role of p21-activated kinase pathway defects in the cognitive deficits of Alzheimer disease. *Nature Neuroscience*, **9**(2), 234-42.

Figures

Figure 1

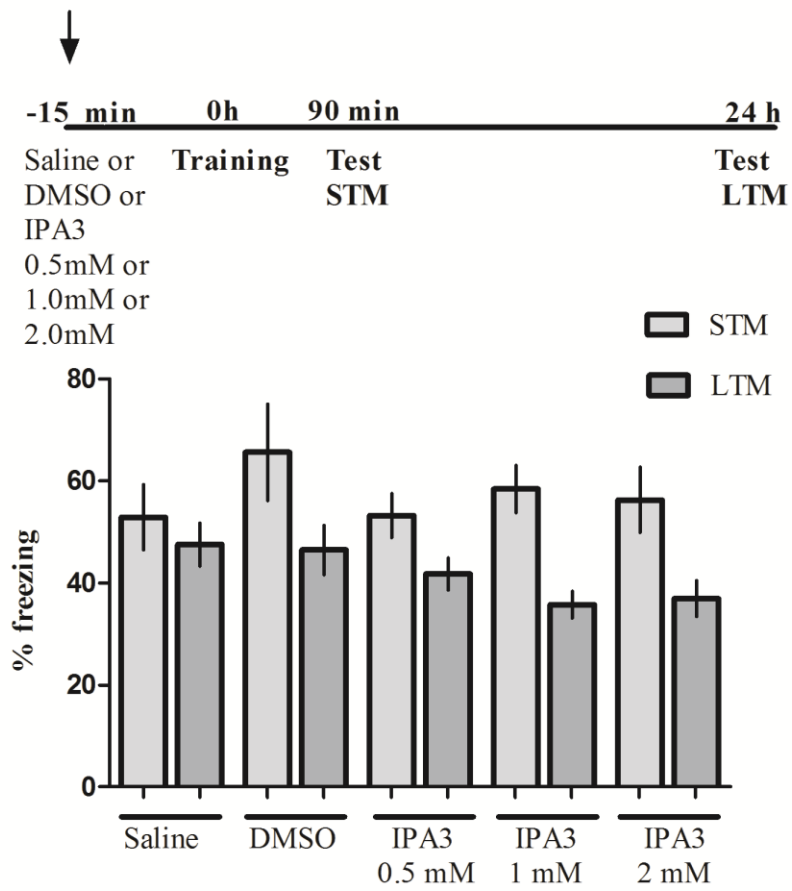


Figure 2

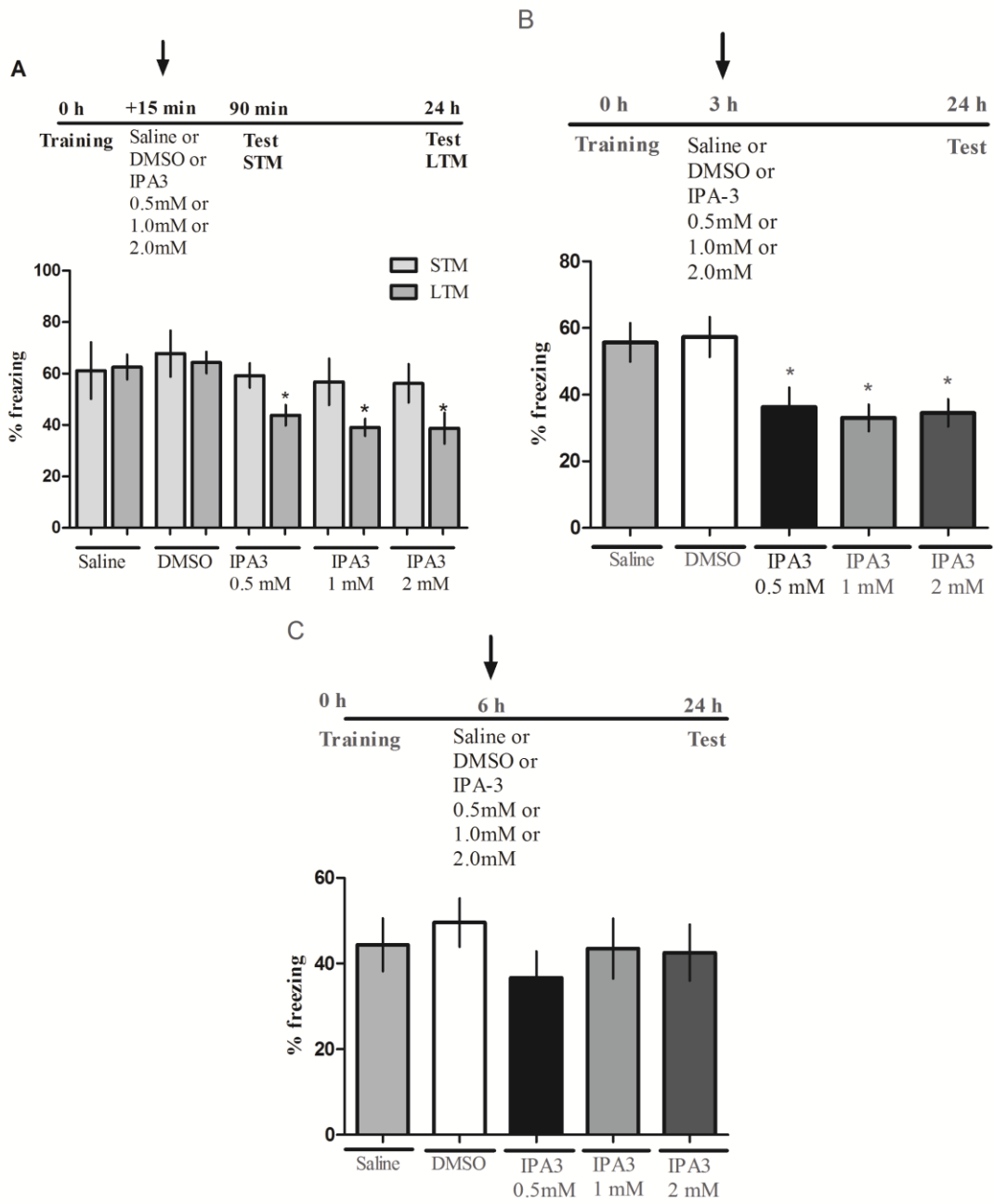


Figure 3

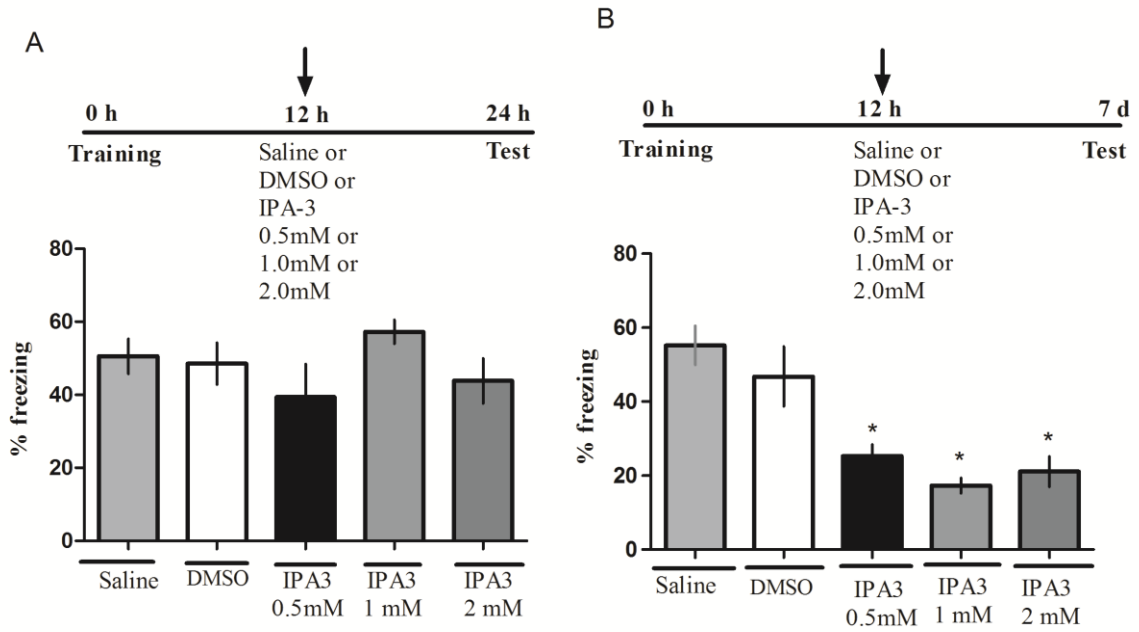
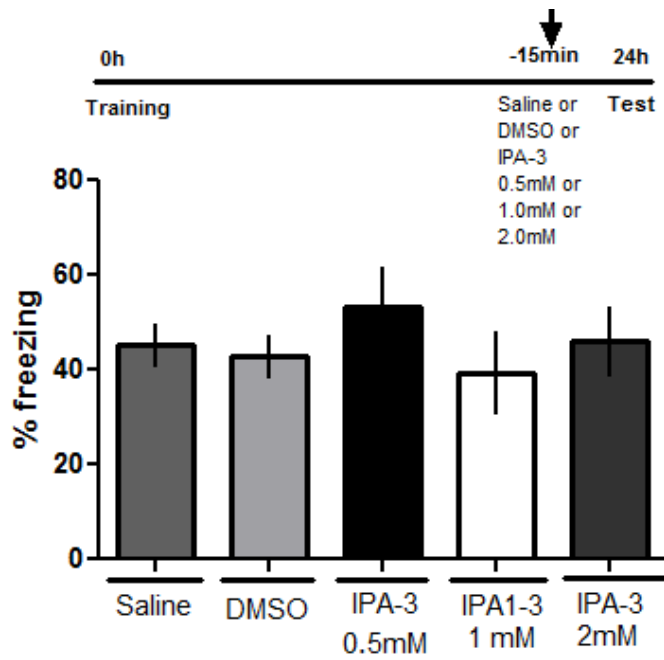


Figure 4



Table

Table 1

Results from locomotor activity in the open field apparatus. Data of crossings and rearings are expressed in mean \pm standard error. The animals were treated 15 min prior to open field task.

Treatments	Rearings	Crossings
Saline	29.6 \pm 7.85	72.6 \pm 11.17
DMSO	29.0 \pm 5.12	54.6 \pm 7.50
IPA -3 0.5 mM	26.33 \pm 2.77	60.58 \pm 4.09
IPA- 3 1.0 mM	23.00 \pm 3.69	55.20 \pm 5.47
IPA -3 2.0 mM	21.92 \pm 3.07	56.33 \pm 4.69

There were no significantly difference between control and treated groups ($P > 0.05$ ANOVA followed by Dunnett's test; $n=10$).

4. Considerações Finais

Com base no que este estudo nos forneceu de resultados concluímos que as cinases ativadas por p21 do grupo I são importantes no processamento da memória, especialmente na região CA1 do hipocampo de ratos durante o início e às 3 h da consolidação da memória aversiva de longa duração, assim como nos eventos de manutenção às 12 h após a aquisição, que tornam persistente essa memória. Observou-se que a inibição dessas cinases antes da sessão de treino não prejudica a aquisição, o período tardio da fase de consolidação e a evocação da memória longa duração, quando o bloqueador foi infundido 6 h após o treino ou 15 min antes da sessão de teste. Além disso, não foi constatado nenhum déficit na memória de curta duração causado pela inibição das PAK I, mostrando que esse grupo de cinases não participa dos eventos de formação dessa memória na tarefa comportamental de medo condicionado contextual.

5. Referências bibliográficas

- Asrar S, Meng Y, Zhou Z, Todorovski Z, Huang WW, and Jia Z. 2009. Regulation of hippocampal long-term potentiation by p21-activated protein kinase 1 (PAK1). *Neuropharmacology* **56**: 73-80.
- Barros DM, Ramirez MR., Dos Reis E, Izquierdo I. 2004. Participation of hippocampal nicotinic receptors in acquisition, consolidation and retrieval of memory for one trial inhibitory avoidance in rats. *Neuroscience* **126**: 651-656.
- Bejar R, Yasuda R, Krugers H, Hood K, and Mayford M. 2002. Transgenic calmodulin-dependent protein kinase II activation: dose-dependent effects on synaptic plasticity, learning, and memory. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **22**: 5719-26.
- Bekinschtein P, Cammarota M, Igaz LM, Bevilacqua LRM, Izquierdo I, and Medina JH. 2007. Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. *Neuron* **53**: 261-77.
- Bekinschtein P, Cammarota M, Katche C, Slipczuk L, Rossato JI, Goldin A, Izquierdo I, and Medina JH. 2008. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 2711-6.
- Biedenkapp JC, and Rudy JW. 2007. Context preexposure prevents forgetting of a contextual fear memory: implication for regional changes in brain activation patterns associated with recent and remote memory tests. *Learning & memory* **14**: 200-3.
- Bliss TVP, Collingridge GL. 1993. A synaptica model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **361**: 31-39
- Bokoch GM. 2003. Biology of the p21-activated kinases. *Annual review of biochemistry* **72**: 743-81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12676796> (Accessed July 27, 2011).
- Bozon B, Kelly A, Josselyn S a, Silva AJ, Davis S, and Laroche S. 2003. MAPK, CREB and zif268 are all required for the consolidation of recognition memory. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **358**: 805-14.
- Capani F, Martone ME, Deerinck TJ, and Ellisman MH. 2001. Selective localization of high concentrations of F-actin in subpopulations of dendritic spines in rat central nervous system: a three-dimensional electron microscopic study. *The Journal of comparative neurology* **435**: 156-70.
- Cingolani L, and Goda Y. 2008. Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nature reviews. Neuroscience* **9**: 344-56.
- Dudai Y, Phillips P. 2000. The shaky trace From insulator to superconductor. *Nature* **406**: 686-687.

- Dudai, Y. 2004. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu. Rev. Psychol* **55**: 51–86
- Dudai Y, and Eisenberg M. 2004. Rites of passage of the engram: reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. *Neuron* **44**: 93-100.
- Eblen ST, Slack JK, Weber MJ, and Catling AD. 2002. Rac-PAK Signaling Stimulates Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) Activation by Regulating Formation of MEK1-ERK Complexes. *Society* **22**: 6023-6033.
- Fernandez G, Tendolkar I. 2006. The rhinal cortex: “gatekeeper” of the declarative memory system. *Trends Cogn. Sci.(Regul.Ed.)* **10**: 358–362.
- Fifková E, and Delay RJ. 1982. Cytoplasmic actin in neuronal processes as a possible mediator of synaptic plasticity. *J. Cell Biol.* **95**:345–350.
- Fitzsimonds RM, and Poo MM. 1998. Retrograde signaling in the development and modification of synapses. *Physiological reviews* **78**: 143-70.
- Frankland PW, Josselyn S a, Anagnostaras SG, Kogan JH, Takahashi E, and Silva AJ. 2004. Consolidation of CS and US representations in associative fear conditioning. *Hippocampus* **14**: 557-69.
- Frankland PW, Bontempi B. 2005. The Organization of Recent and Remote Memories. *Neuroscience* **6**: 119-130
- Frost J a, Steen H, Shapiro P, Lewis T, Ahn N, Shaw PE, and Cobb MH. 1997. Cross-cascade activation of ERKs and ternary complex factors by Rho family proteins. *The EMBO journal* **16**: 6426-38.
- Goelet P, Castellucci VF, Schacher S, Kandel E. 1986. The long and the short of long-term memory – a molecular framework. *Nature* **322**:419-422
- Goshen I, Brodsky M, Prakash R, Wallace J, Gradinaru V, Ramakrishnan C. 2011. Dynamics of Retrieval Strategies for Remote Memories *Cell* **147**: 678–689
- Hayashi ML, Choi S-Y, Rao BSS, Jung H-Y, Lee H-K, Zhang D, Chattarji S, Kirkwood A, and Tonegawa S. 2004. Altered cortical synaptic morphology and impaired memory consolidation in forebrain- specific dominant-negative PAK transgenic mice. *Neuron* **42**: 773-87.
- Harris KM, and Stevens JK. 1989. Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **9**: 2982-97.
- Hering H, and Sheng M. 2001. Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nature reviews. Neuroscience* **2**: 880-8.
- Hirokawa, N. 1989. The arrangement of actin filaments in the postsynaptic cytoplasm of the cerebellar cortex revealed by quick-freeze deep-etch electron microscopy. *Neurosci. Res.* **6**:269–275.

- Hotulainen P., et al. 2009. Defining mechanisms of actin polymerization and depolymerization during dendritic spine morphogenesis. *J. Cell Biol.* **185**: 323–339
- http://1.bp.blogspot.com/_G8UspQQKWhY/S6ZJA4oRfjI/AAAAAAAAADI/VjRowv2CFIo/s320/ampa+nmda.jpg, acessado em 10/02/2012.
- Izquierdo I, Medina JH. 1997. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiology of learning and memory* **68**: 285-316.
- Izquierdo I, Bevilaqua LRM, Rossato JI, Bonini JS, Medina JH, and Cammarota M. 2006. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends in neurosciences* **29**: 496-505.
- Izquierdo I, Bevilaqua LR, Rossato JI, Lima RH, Medina JH, and Cammarota M. 2008. Age-dependent and age-independent human memory persistence is enhanced by delayed posttraining methylphenidate administration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 19504-7.
- Izquierdo I, Bevilaqua LRM, Rossato JI, Silva WC, Bonini J, Medina JH, Cammarota, M. 2008. The molecular cascades of long-term potentiation underlie memory consolidation of one-trial avoidance in the CA1 region of the dorsal hippocampus, but not in the basolateral amygdala or the neocortex. *Neurotoxicity research* **14**: 273-294.
- Izquierdo I (2011) Memória (2^a ed.). Artmed, Porto Alegre. 136p.
- Kandel ER. 2001. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science (New York, N.Y.)* **294**: 1030-8.
- Kreis P, and Barnier J-V. 2009. PAK signalling in neuronal physiology. *Cellular Signalling* **21**: 384-393.
- Lamprecht, R., LeDoux, J. 2004. Structural plasticity and memory. *Nature Reviews Neuroscience* **5**: 45-54
- Landis DM, and Reese TS. 1983. Cytoplasmic organization in cerebellar dendritic spines. *J. Cell Biol.* **97**:1169–1178.
- Li F, Adam L, Vadlamudi RK, Zhou H, Sen S, Chernoff J, Mandal M, and Kumar R. 2002. phosphorylates histone H3 in breast cancer cells. *EMBO Reports* **3**: 767-773.
- Lømo, T. 1966. Frequency potentiation of excitatory synaptic activity in the dentate area of the hippocampal formation. *Acta Physiologica Scandinavica* **68** (Suppl 277): 128.
- Malinow R, Malenka RC. 2002. AMPA RECEPTOR TRAFFICKING AND SYNAPTIC PLASTICITY. *Annu. Rev. Neurosci.* **25**:103–26
- Manser E, Chong C, Zhao ZS, Leung T, Michael G, Hall C, and Lim L. 1995. Molecular cloning of a new member of the p21-Cdc42/Rac-activated kinase (PAK) family. *The Journal of biological chemistry* **270**: 25070-8.

- Martin SJ, Grimwood PD, and Morris RGM. 2000. Synaptic plasticity and memory: An Evaluation of the Hypothesis. *Annu. Rev. Neurosci* **23**: 649-711
- Mayford M, Bach ME, Huang YY, Wang L, Hawkins RD, and Kandel ER. 1996. Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science (New York, N.Y.)* **274**: 1678-83.
- McGaugh JL. 2000. Memory--a Century of Consolidation. *Science* **287**: 248-251. <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.287.5451.248> (Accessed June 22, 2011).
- Meng J, Meng Y, Hanna A, Janus C, and Jia Z. 2005. Abnormal long-lasting synaptic plasticity and cognition in mice lacking the mental retardation gene Pak3. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **25**: 6641-50.
- Medina JH, Bekinschtein P, Cammarota M, Izquierdo I. 2008. Do memories consolidate to persist or do they persist to consolidate? *Behavioural Brain Research* **192**: 61-69.
- Merriam EB, et al. 2011. NMDA receptor composition modulates dendritic spine morphology in striatal medium spiny neurons. *PLoS One* **6**: 276-88.
- Morris, R.G., Garrud, P., Rawlins, J.N., and O'Keefe, J. 1982. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* **297**: 681-683.
- Muller D, Boda B, Nikonenko I, Alberi S. 2006. Central Nervous System Functions of PAK Protein Family. *Molecular Neurobiology* **34**: 67-80.
- Nimchinsky E a, Sabatini BL, and Svoboda K. 2002. Structure and function of dendritic spines. *Annual review of physiology* **64**: 313-53.
- Nikonenko I, Jourdain P, Alberi S, Toni N, and Muller D. 2002. Activity-induced changes of spine morphology. *Hippocampus* **12**: 585-91.
- Ong WY, Wang XS, and Manser E. 2002. Differential distribution of alpha and beta isoforms of p21-activated kinase in the monkey cerebral neocortex and hippocampus. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Expérimentation cérébrale* **144**: 189-99.
- Ota KT, Monsey MS, Wu MS, Young GJ, and Schafe GE. 2010. Synaptic plasticity and NO-cGMP-PKG signaling coordinately regulate ERK-driven gene expression in the lateral amygdala and in the auditory thalamus following Pavlovian fear conditioning. *Learning & Memory* **17**: 221-235.
- Park ER, Eblen ST, and Catling AD. 2007. MEK1 activation by PAK: a novel mechanism. *Cellular signalling* **19**: 1488-96.
- Restivo L, Vetere G, Bontempi B, Ammassari-Teule M. 2009. The formation of recent and remote memory is associated with time-dependent formation of dendritic spines in the hippocampus and anterior cingulate cortex. *J Neurosci* **29**: 8206-8214.

- Riedel G, J. Micheau J, Lam AGM, Roloff EVL, Martin SJ, Bridge H, Hoz L, Poeschel B, McCulloch J, Morris RGM. 1999. Reversible neural inactivation reveals hippocampal participation in several memory processes. *Nature Neuroscience* **2** (10): 898-905.
- Saneyoshi T, Fortin D a, and Soderling TR. 2010. Regulation of spine and synapse formation by activity-dependent intracellular signaling pathways. *Current opinion in neurobiology* **20**: 108-15.
- Schafe GE, Nadel NV, Sullivan GM, Harris A, and Ledoux JE. 1999. Memory Consolidation for Contextual and Auditory Fear Conditioning Is Dependent on Protein Synthesis, PKA, and MAP Kinase. *Learning & memory* **6**:97–110
- Singh RR, Song C, Yang Z, and Kumar R. 2005. Nuclear localization and chromatin targets of p21-activated kinase 1. *The Journal of biological chemistry* **280**: 18130-7.
- Slack-Davis JK, Eblen ST, Zecevic M, Boerner S a, Tarcsafalvi A, Diaz HB, Marshall MS, Weber MJ, Parsons JT, and Catling AD. 2003. PAK1 phosphorylation of MEK1 regulates fibronectin-stimulated MAPK activation. *The Journal of cell biology* **162**: 281-91.
- Spruston N. 2008. Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nature reviews. Neuroscience* **9**: 206-21.
- Sun H, King a J, Diaz HB, and Marshall MS. 2000. Regulation of the protein kinase Raf-1 by oncogenic Ras through phosphatidylinositol 3-kinase, Cdc42/Rac and Pak. *Current biology : CB* **10**: 281-4.
- Takehara-Nishiuchi K, Maal-Bared G, Morrissey MD. 2012. Increased entorhinal prefrontal theta synchronization parallels decreased entorhinal hippocampal theta synchronization during learning and consolidation of associative memory. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* **5**:
- Teixeira CM, Pomedli SR, Maei HR, Kee N, and Frankland PW. 2006. Involvement of the anterior cingulate cortex in the expression of remote spatial memory. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **26**: 7555-64.
- Vastagh C, *et al.* 2012. NMDA receptor composition modulates dendritic spine morphology in striatal medium spiny neurons. *Commun Integr Biol* **2**: 268-70
- Vetere G. 2011. Spine growth in the anterior cingulate cortex is necessary for the consolidation of contextual fear memory. *PNAS* **108**: 8456–8460.
- Vianna MRM. 2000. Role of Hippocampal Signaling Pathways in Long-Term Memory Formation of a Nonassociative Learning Task in the Rat. *Learning & Memory* **7**: 333-340.
- Victor AD, Michael CO, Eric SG, and Thomas RS. 2007. Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience* **8**: 101-113

- Wasling P, Strandberg J, Hanse E. 2012. AMPA Receptor Activation Causes Silencing of AMPA Receptor-Mediated Synaptic Transmission in the Developing Hippocampus. *PLoS ONE* 7: 34474-34474
- West a E, Chen WG, Dalva MB, Dolmetsch RE, Kornhauser JM, Shaywitz a J, Takasu M a, Tao X, and Greenberg ME. 2001. Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 11024-31.
- Zhang H, Webb DJ, Asmussen H, Niu S, and Horwitz AF. 2005. A GIT1/PIX/Rac/PAK signaling module regulates spine morphogenesis and synapse formation through MLC. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 25: 3379-88.
- Zhuo M, Laitinen JT, Li XC, and Hawkins RD. 1998. On the respective roles of nitric oxide and carbon monoxide in long-term potentiation in the hippocampus. *Learning & memory* 5: 467-80.
- Ziff EB. 1997. Enlightening the Postsynaptic Density Review. *Cell* 19: 1163-1174.