



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
NEUROCIÊNCIAS

O PAPEL DA MIOSINA IIB NA MANUTENÇÃO DA MEMÓRIA

MATEUS OLIVEIRA SILVA

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre/RS

2019

MATEUS OLIVEIRA SILVA

O PAPEL DA MIOSINA IIB NA MANUTENÇÃO DA MEMÓRIA

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Neurociências, para obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Lucas de Oliveira Alvares

Porto Alegre/RS

2019

DEDICATÓRIA

À minha família, por serem os protagonistas da minha felicidade e bem-estar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me permitiu todas as experiências vividas até agora e que, seguramente, tem me sustentado diante das adversidades.

À minha família, que certamente é o meu alicerce e o que possuo de mais precioso nesta terra.

Ao meu orientador Lucas por todo o suporte, ensinamentos e, claro, por ter me dado a oportunidade de grande aprendizado em seu laboratório.

Aos amigos mais chegados, aqueles que estão comigo em todas as situações, o meu muito obrigado por me permitir fazer parte das suas vidas, por poder crescer junto com vocês e por me ensinarem o valor de uma verdadeira amizade. Vocês sabem quem são.

Aos amigos e colegas de trabalho com quem tanto tenho aprendido sobre como fazer neurociência.

À toda família Steffen pelo cuidado comigo, por me apresentar Porto Alegre e a sua cultura e por ser quem vocês são para mim. Serei eternamente grato porque se não fosse pela sua receptividade principalmente no mês da minha chegada na cidade eu não poderia ter tido essa experiência de tanto crescimento. Levo vocês comigo do lado esquerdo do peito.

Por último, mas não menos importante, a todos que já passaram pela minha vida contribuindo, de forma geral, acadêmica e pessoalmente.

EPÍGRAFE

*“You can design and create, and build the most wonderful place in the world.
But it takes people to make the dream a reality.”*

Walt Disney

RESUMO

Eventos de plasticidade sináptica estão intrinsecamente ligados a espinhos dendríticos e ambos são substratos para a formação, armazenamento e expressão de memórias. A miosina IIB é um componente fundamental para a morfofisiologia dos espinhos dendríticos e para a regulação da plasticidade sináptica através da sua interação com o filamento de actina. A fosforilação de sua cadeia leve reguladora promove a contração do filamento de actina e é responsável pela estabilização e crescimento da cabeça do espinho. Nesse estudo, usamos o fármaco blebbistatina (blebb) para bloquear farmacologicamente a atividade da miosina IIB a fim de avaliar os efeitos de sua inibição nos processos de memória. Primeiro, verificamos que a infusão de blebb no hipocampo após o aprendizado prejudicou a consolidação da memória de longa duração, mas não a memória de curto prazo. Em seguida, mostramos que a blebb prejudicou a evocação da memória. Surpreendentemente, também descobrimos que a blebb era capaz de suprimir a retenção da memória quando infundida após a janela de consolidação, mesmo sem uma sessão de reativação. Em seguida, reproduzimos esses resultados em vários outros protocolos comportamentais envolvendo diferentes estruturas cerebrais, como os condicionamentos aversivos ao tom e ao sabor. Nossos resultados mostram que a miosina IIB desempenha um papel essencial não apenas na formação e expressão da memória, mas também na manutenção da memória através de sua dinâmica crucial com filamentos de actina nos espinhos dendríticos. Finalmente, nossos achados são extremamente relevantes para desvendar novos mecanismos na busca de intervenções farmacológicas que possam auxiliar no tratamento de distúrbios cognitivos relacionados à memória.

Palavras-chave: Plasticidade Sináptica, Miosina IIB, Blebbistatina, Manutenção da Memória.

ABSTRACT

Synaptic plasticity events are intrinsically linked to dendritic spines and both are substrates for the formation, storage and expression of memories. Myosin IIB is a fundamental component for the morphophysiology of dendritic spines and for the regulation of synaptic plasticity through its interaction with the actin filament. Phosphorylation of its regulatory light chain promotes the contraction of the actin filament and is responsible for the stabilization and growth of the spine head. In this study, we used the drug blebbistatin (blebb) to pharmacologically block the activity of myosin IIB in order to assess the effects of its inhibition on memory processes. First, we verified that the infusion of blebb in the hippocampus after learning impaired the consolidation of long-term memory, but not short-term memory. Next, we showed that blebb impaired memory retrieval. Surprisingly, we also found that blebb was able to suppress memory retention when infused after the window of consolidation, even without being reactivated. We then reproduced these results in several other behavioral protocols involving different brain structures, such as the auditory and taste aversion conditioning ones. Our results show that myosin IIB plays an essential role not only in the formation and expression of memory but also in maintaining memory through its crucial dynamics with actin filaments in dendritic spines. Finally, our findings are extremely relevant to unveil new mechanisms in the search for pharmacological interventions that may aid in the treatment of cognitive disorders related to memory.

Key-words: Synaptic Plasticity, Myosin IIB, Blebbistatin, Memory Maintenance.

LISTA DE IMAGENS

Figura 1. Classificação da memória de longa-duração. Adaptada de Squire & Zola, 1996.	11
Figura 2. Modelo esquemático dos eventos moleculares que dão início à potenciação de longa-duração recente e tardia no hipocampo.	12
Figura 3. Esquema representando a localização do hipocampo no cérebro de um roedor (acima); e a circuitaria tri-sináptica do hipocampo (abaixo).	15
Figura 4. Regiões do Hipocampo: giro dentado, CA3 e CA1.	16
Figura 5. Principal classificação morfológica dos espinhos dendríticos.	18
Figura 6. Estrutura primária da miosina II.	18
Figura 7. Mudança da conformação estrutural da miosina II.	19
Figura 8. Actina e miosina em sinapses do Sistema Nervoso Central.	20
Figura 9. O ciclo mecanoquímico da actomiosina.	21
Figura 10. Hipótese molecular do mecanismo da miosina II na manutenção da memória.	53

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Memória e Aprendizado	10
1.2 Plasticidade sináptica e a dinâmica dos espinhos dendríticos	16
2. OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivo geral.....	22
2.2 Objetivos específicos	22
3. RESULTADOS	23
3.1. Artigo – LONG-TERM MEMORY PERSISTENCE DEPENDS ON MYOSIN IIB’S ACTIVITY.....	23
4. DISCUSSÃO GERAL.....	48
5. CONCLUSÕES	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1. INTRODUÇÃO

1.1 Memória e Aprendizado

Ao longo das nossas vidas a capacidade de registrar as experiências que nos ocorrem vai determinar os nossos comportamentos em situações futuras e também moldará quem somos (Squire & Kandel, 2011; Kandel et al., 2014). O aprendizado é então o processo de aquisição das nossas experiências, enquanto a memória é o resultado deste processo, formando no nosso encéfalo um registro duradouro que nos permite utilizar esta informação no futuro. Por esse motivo a memória acaba sendo um processo adaptativo e de extrema importância para a sobrevivência dos animais dos mais variados filos.

Um dos estudos mais importantes que inaugurou a era moderna da pesquisa em memória foi o caso do paciente Henry Molaison (H.M). Este paciente passou a ter episódios graves e frequentes de crises epiléticas após um acidente na infância. Na fase adulta, a sua vida social e laboral ficou comprometida pelas suas crises, o que fez com que seu médico William Scoville optasse pela remoção bilateral de regiões do lobo temporal medial, onde suas crises eram originadas. Apesar de suas crises terem amenizado, a remoção de regiões importantes na formação da memória, como o hipocampo e a amígdala, gerou um grande prejuízo cognitivo. Estes déficits eram bem específicos, onde as memórias de eventos que ocorreram muito antes do acidente permaneceram aparentemente intactas. Entretanto, a sua habilidade de transformar memórias de curta duração em memórias de longa foi dramaticamente afetada (Scoville & Milner, 1957; Squire, 2009). Com isso, se verificou que há estruturas específicas responsáveis pela formação e armazenamento de memórias ao longo do tempo. Sendo assim, pode-se classificar a memória de maneiras distintas.

Uma das classificações mais clássicas divide as memórias em de curta (do inglês *short-term memory*, **STM**) e longa-duração (*long-term memory*, **LTM**). A STM pode ser definida como aquela memória que nos permite manter em um estado facilmente acessível, uma pequena quantidade de informação recentemente adquirida por um curto período de tempo. As LTM são subclassificadas de acordo com o seu conteúdo em: declarativas ou não-declarativas. As memórias declarativas estão relacionadas ao conhecimento de pessoas, locais, informações e eventos de nossa vida, sendo mais

flexíveis e dependentes de uma evocação consciente. Já as memórias não-declarativas são aquelas relacionadas a informações sobre como realizar uma tarefa motora, procedurais; não dependem de uma evocação consciente e são mais rígidas (Squire e Zola, 1996; Squire, 1992; Squire & Kandel, 2011) (Figura 1).

A memória de longa-duração por sua vez não é formada imediatamente após a entrada da informação no nosso sistema. Esse processamento mnemônico pode ser subdividido em três fases: aquisição, consolidação e evocação. Na aquisição a atenção e integração sensorial são essenciais para que a informação tenha sua adequada entrada no sistema. Na fase de consolidação o traço mnemônico é fortalecido, sendo esta fase responsável pelo armazenamento de um registro duradouro do traço mnemônico (Dudai, 2004).

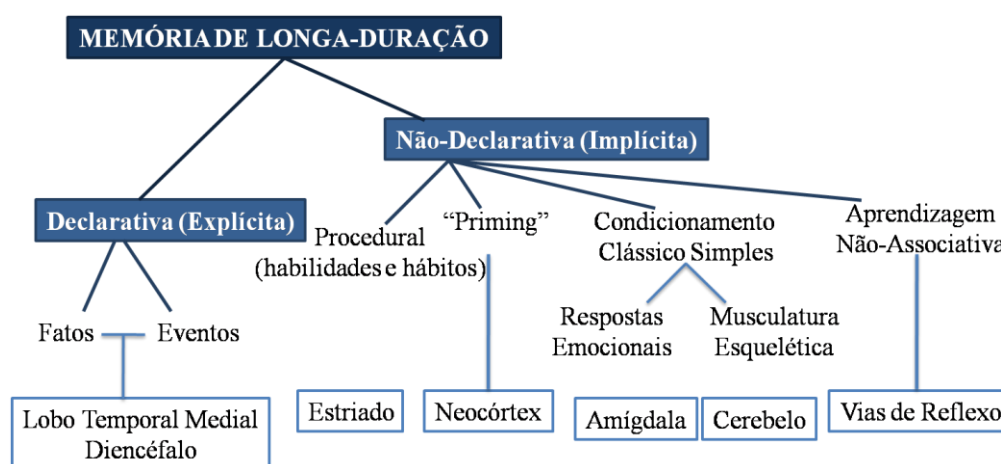


Figura 1. Classificação da memória de longa-duração. Adaptada de Squire & Zola, 1996.

Para que esse haja a formação de um traço permanente alguns eventos moleculares como aumento na expressão de alguns genes e de fatores de transcrição, síntese proteica e ativação de cinases devem ser induzidos (Kandel, 2012). A sinalização de receptores de glutamato como o AMPA leva à entrada de cálcio através dos receptores NMDA induzindo a ativação da proteína Ca^{2+} /Calmodulina, que por sua vez ativa a produção do segundo mensageiro cAMP (monofosfato de adenosina cíclico). Com esse aumento de concentração do cAMP e Ca^{2+} na célula pós-sináptica há um aumento na atividade de PKA (proteína cinase A) que leva, ultimamente, à fosforilação de CREB-1 (proteína de ligação em resposta ao elemento AMP cíclico), que é um ativador de fatores de transcrição. A ativação de CREB parece ser conservada durante a evolução e muitos

aspectos do papel da CREB na plasticidade sináptica descrita em invertebrados também foram observados em outros animais (Kandel, 2012) (Figura 2). A ativação dessa cascata molecular pode, então, levar a uma persistência mais duradoura das memórias.

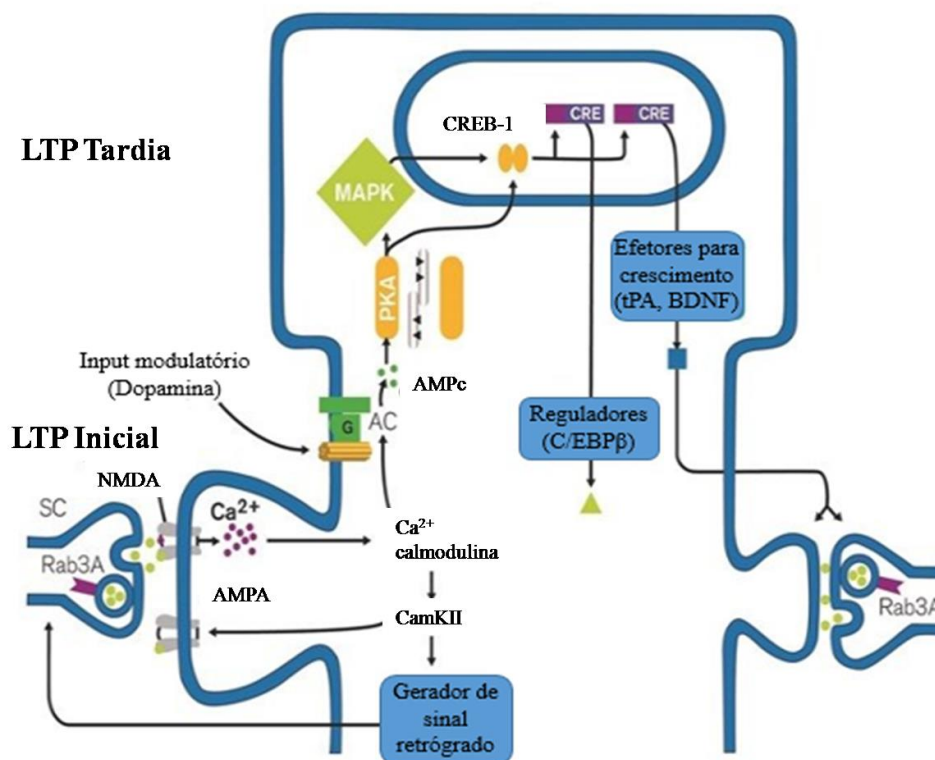


Figura 2. Modelo esquemático dos eventos moleculares que dão início à potenciação de longa-duração recente e tardia no hipocampo. Esses eventos estão ligados à formação da própria memória. Figura adaptada do livro *Princípios de Neurociências* por Kandel & Schwartz (5ª edição, 2014).

A persistência de uma memória é uma característica importante e definidora das nossas memórias, pois só podemos saber da existência de uma memória se ela persistir ao longo do tempo, de forma que possa ser utilizada no futuro. Para que uma memória persista ao longo do tempo, ela precisa passar pela consolidação, a qual é composta por duas fases: a consolidação celular e a sistêmica. A consolidação celular, é mais rápida e ocorre a nível sináptico, envolvendo a modulação na expressão de genes, ativação de fatores de transcrição e reorganização de proteínas específicas (cinases e fosfatases) (Medina et al., 2008). A consolidação sistêmica é mais lenta e envolve gradualmente a integração de regiões corticais, quando o hipocampo vai deixando de ser uma estrutura fundamental na evocação de determinadas memórias (Hardt & Nadel, 2017; Kitamura et al., 2017).

Bekinschtein e colaboradores, em 2007, demonstraram que bloqueando a expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, do inglês *Brain-derived neurotrophic factor*) durante a fase de síntese proteica tardia no hipocampo afeta o armazenamento persistente de uma memória aversiva, mas não a formação, mostrando que, o BDNF, por exemplo, é crucial para a persistência da memória. O BDNF faz parte de um grupo de fatores de crescimento, presentes no sistema nervoso central de adultos e importantes para a sobrevivência de subpopulações de células neurais (Hyman et al., 1991). Já foi demonstrado uma relação entre o BDNF e a proteína PKM ζ , (uma isoforma atípica da PKC ativada na LTP) e tem sido associada à persistência do traço mnemônico. Na presença de um inibidor da síntese proteica, o BDNF sustenta a LTP por meio da manutenção de níveis suficientes da PKM ζ . Além disso, também já foi demonstrado que a supressão sozinha de BDNF ou PKM ζ não é capaz de interferir na LTP, apenas uma co-inibição destas proteínas é capaz de bloquear completamente a manutenção da LTP. Este fato nos sugere que a PKM ζ atua em paralelo e de forma sinérgica ao BDNF na manutenção da plasticidade de longa duração (Mei et al., 2011). A persistência de memórias formadas em uma tarefa espacial e associativa foi prejudicada também pela inibição da PKM ζ no hipocampo (Pastalkova et al., 2006) e córtex, respectivamente (Shema et al., 2007). A PKM ζ tem sido alvo de muitos estudos sobre a manutenção de memórias de longa-duração porque ela aumenta os níveis de transmissão sináptica através de um aumento no número de receptores AMPA funcionais na membrana pós-sináptica e impedindo a endocitose da subunidade GluA2 desses receptores (Saktor, 2008; Miguez et al., 2010; Miguez et al., 2014; Hardt et al., 2010).

Além disso, Bekinschtein e colaboradores (2010) demonstraram que genes imediatos como o *c-Fos* e Homer 1a tiveram seus níveis aumentados 24 horas e 18 horas após o treino (*c-Fos*) e algumas proteínas como CamKII α , ERK-2 e Akt também aumentam seus níveis 18 horas após o treino. Esse e outros estudos demonstram, portanto, que existem outros elementos que estão envolvidos na persistência de memórias de longa-duração. Algumas alterações de humor, como o estresse, parecem ser capazes de modular a persistência deste tipo de aprendizado (Yang et al., 2013).

As memórias que foram armazenadas ficam disponíveis para serem utilizadas no futuro, momento que chamamos de evocação, onde os registros armazenados são analisados novamente, filtrando as informações para descartar o que é irrelevante e manter o que pode ser utilizado mais adiante (Kragel et al., 2017). O resultado da evocação de uma memória pode levar a processos antagonísticos, pois neste momento ela

volta a ficar lábil, estando exposta a interferências. Isso pode acarretar em atualizações, fortalecimento ou enfraquecimento através de um processo chamado reconsolidação (Debiec et al., 2002; Milekic & Alberini, 2002; Duvarci & Nader, 2004; Lee et al., 2004; Alberini, 2005; Nader et al., 2005; Nader & Hardt, 2009; Nader & Einarsson, 2010; Nader, 2015). A teoria da reconsolidação da memória diz que é imprescindível que ocorra uma desestabilização da memória depois da sua evocação para que a memória que está num estado mais fixo possa se tornar lábil novamente e assim, ser reconsolidada (Haubrich & Nader, 2016).

A memória em estado lábil pode ainda ser sobreposta por informações mais relevantes através de um processo chamado de extinção (Lupien & McEwen, 1997; Cammarota et al., 2005; Inda et al., 2011; Rossato et al., 2010). O processo de extinção forma uma nova memória e não uma atualização de uma previamente formada. Essa nova memória formada é geralmente mais fraca por não possuir a reapresentação do estímulo não-condicionado (usualmente um choque) e acaba inibindo a memória original, que a longo prazo pode retornar por recuperação espontânea, *reinstatement*, *renewal*.

Estudos sobre a memória nos ajudaram a entender o papel fundamental do hipocampo no processamento mnemônico, principalmente de memórias declarativas (Alvarez & Squire, 1994). O hipocampo se localiza no lobo temporal medial, o qual é dividido em sub-regiões: os Cornos de Amon (CA1, CA2, CA3), região com predominância de neurônios piramidais; e pelo giro denteado, composto majoritariamente por células granulares. O seu nome deriva do grego (*hippos* = cavalo, *kampos* = monstro marinho) por conta da sua grande semelhança com o cavalo-marinho.

O hipocampo é organizado em uma circuitaria trissináptica, conectando as suas sub-regiões com outras regiões corticais e subcorticais. A maioria das projeções que chegam ao hipocampo são provenientes do córtex entorrinal pela via perforante, seguindo até as células granulares do giro denteado. Os axônios dessas células granulares, (comumente chamados de fibras musgosas por apresentarem varicosidades durante todo o seu comprimento, dando um aspecto musgoso aos mesmos) se projetam para as células piramidais de CA3. As projeções que saem dessa região para a CA1 formam as colaterais de Schaffer. Finalmente, as projeções de CA1 são projetadas para a região subicular e então retornam para o córtex entorrinal (McNaughton et al., 1989; Amaral & Witter, 1989; Witter et al. 1988; Leuner & Gold, 2010) (Figura 3).

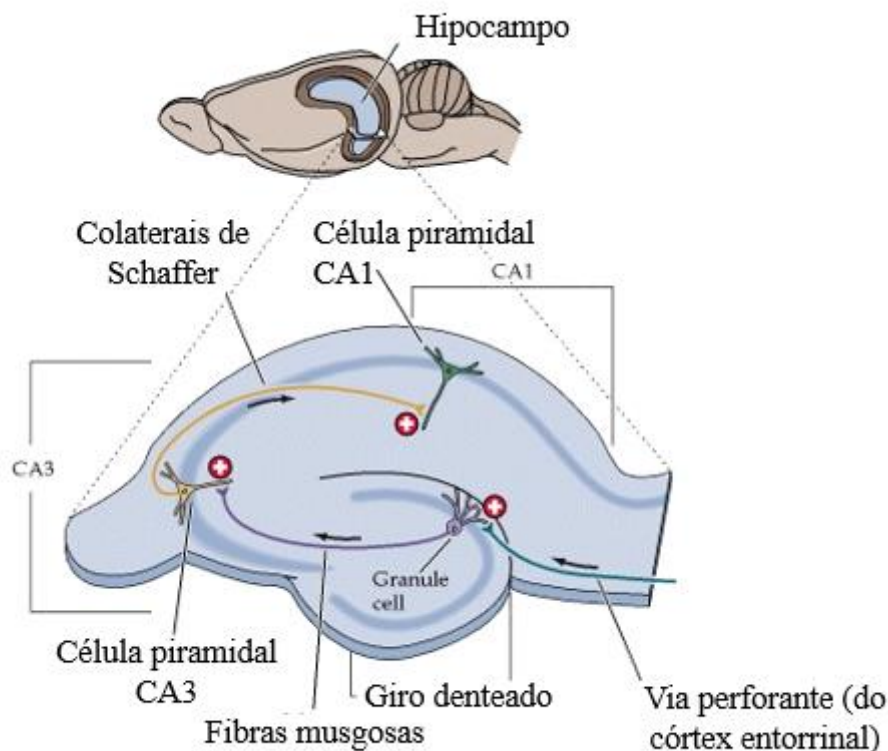


Figura 3. Esquema representando a localização do hipocampo no cérebro de um roedor (acima); e a circuitaria trissináptica do hipocampo (abaixo).

O estudo da circuitaria hipocampal tem sido muito importante para entender como as conexões sinápticas são modificadas em resposta ao aprendizado. Em 1949, o pesquisador canadense Donald Hebb propôs que o aprendizado provoca a ativação conjuntos de neurônios em sequência, sendo repetidamente ativados e causando alterações químicas nas sinapses. Estas alterações, conhecida como plasticidade sináptica, seriam capazes de fortalecer as conexões em questão e assim manter o traço mnemônico ativo (Hebb, 1949). Anos mais tarde, baseando-se nas teorias de Hebb, Timothy Bliss e Terje Lømo demonstraram pela primeira vez, no hipocampo, um mecanismo de fortalecimento de conexões sinápticas chamado potenciação de longa duração (LTP; do inglês – *Long-Term Potentiation*), o qual até hoje em dia é aceito como a base celular da formação de LTM (Bliss & Lømo, 1970; 1973). A LTP é um dos fenômenos plásticos diretamente associado ao processamento mnemônico.

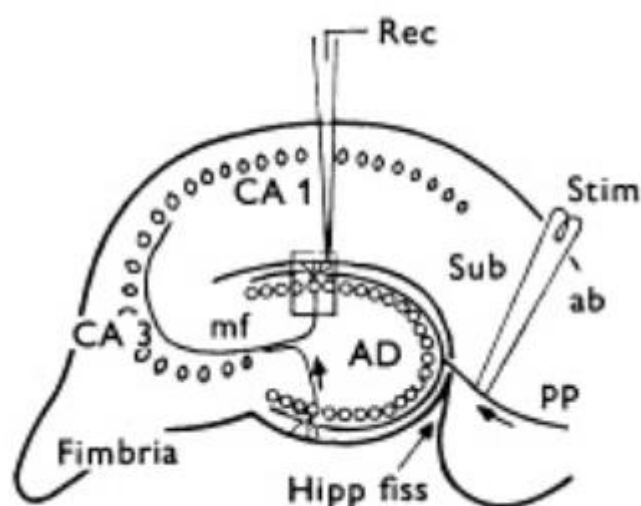


Figura 4. Regiões do Hipocampo: giro dentado, CA3 e CA1. Além disso, estão representados o estímulo aplicado na via perforante e medidor posicionado no giro dentado. Figura retirada de Bliss e Lømo, 1973.

Estes eventos plásticos capacitam o cérebro a reorganizar circuitos neuronais envolvidos na aquisição de novas experiências (Lynch, 2004; Pascual-Leone et al, 2005). Atualmente, outros processos plásticos, os quais interferem ou são necessários à formação de novas memórias, têm sido estudados; e.g. o enfraquecimento das conexões sinápticas. O fenômeno de enfraquecimento é conhecido como (LTD; do inglês, *Long-Term Depression*), proposta inicialmente por Gunter Stent em 1973 e desenvolvida nos anos seguintes por outros pesquisadores (Stent, 1973; Lynch et al., 1977). Acredita-se que tanto a LTP quanto a LTD são fenômenos importantes na aquisição e no armazenamento de LTM. De certa forma o específico fortalecimento e enfraquecimento de conexões definiria quais informações serão descartadas ou armazenada (Markram, Gerstner & Sjöström, 2011).

1.2 Plasticidade sináptica e a dinâmica dos espinhos dendríticos

Os eventos de plasticidade sináptica estão intrinsecamente interligados com os espinhos dendríticos, que são pequenas protruções que emergem dos dendritos dos neurônios e compõem em sua maior parte as sinapses excitatórias glutamatérgicas. A indução de uma potenciação ou depressão de longa-duração promovem efeitos

antagônicos de proliferação ou diminuição de espinhogênese, respectivamente, e isso se dá por meio de uma dinâmica rápida na interação de duas proteínas importantes do citoesqueleto, a miosina e a actina (Hlushchenko et al., 2016). Kneussel e Wagner, 2013 retratam que após segundos de indução da LTP observa-se uma reorganização e polimerização nos filamentos de actina. A actina é uma proteína bastante abundante nas células eucarióticas e transita entre suas formas monomérica (G-actina) e filamentosa (F-actina). Isso lhes confere funções como motilidade e forma celular. A miosina, por sua vez, é uma proteína motora que interage com a actina através da ligação da porção da cabeça ao filamento de actina, hidrolisando o ATP para gerar movimento e força, e assim, contrair esse filamento. Essa rápida dinâmica de interação entre a actina e a miosina que oscilam entre polimerização e despolimerização é capaz de gerar formas heterogêneas aos espinhos, que se classificam como cogumelo, espesso, filopódio e fino (Kasai et al., 2003; Hering & Sheng, 2002) (Figura 5).

Existem variadas classes de miosinas que são codificadas por genes diferentes e possuem formas e funções variadas. No nosso projeto, porém, nos atemos à miosina II que demonstrou ser necessária para a formação de memória dependente de hipocampo e plasticidade sináptica no sistema nervoso maduro (Rex et al., 2010). As miosinas motoras da classe II podem ser subdivididas em sarcoméricas e não-musculares de acordo com a sequência do seu domínio motor e cada isoforma é codificada por um gene específico (*MyH9*, *MyH10* e *MyH14*, por exemplo) existindo várias delas no reino animal (Thompson & Langford, 2002).

Em quase todos os tipos celulares e órgãos a dinâmica de actina é controlada por miosinas motoras da classe II (Rubio et al., 2011; Vincente-Manzanares et al., 2009; Young et al., 2016; Kasai et al., 2003).

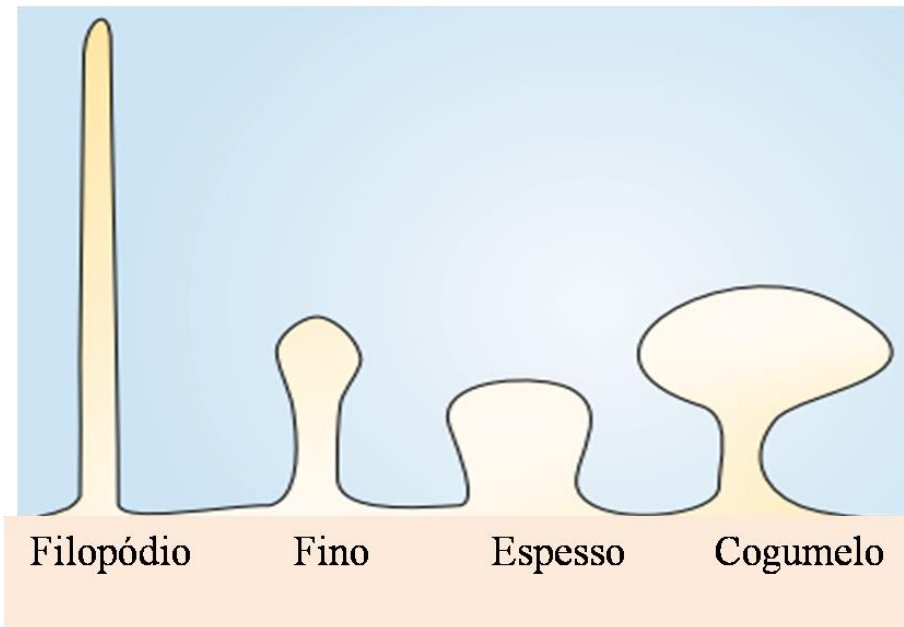


Figura 5. Principal classificação morfológica dos espinhos dendríticos. Do inglês, *filopodium*, *thin*, *stubby* e *mushroom*. Figura retirada e adaptada de Hering e Sheng, 2002.

As miosinas II são constituídas por duas cadeias pesadas e dois pares de cadeias leves relacionadas à Calmodulina e possuem estrutura hexamérica (Figura 6).

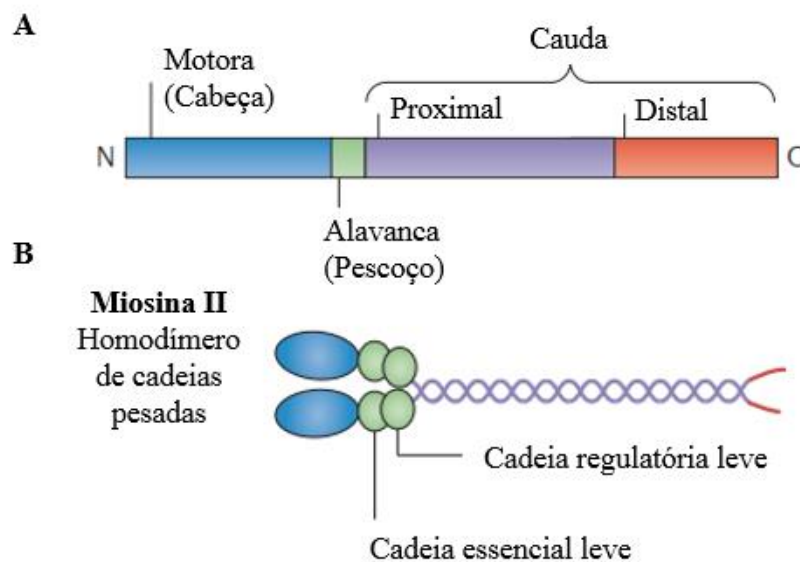


Figura 6. Estrutura primária da miosina II. **A.** Representação da estrutura geral das miosinas apresentando uma região N-terminal e outra C-terminal. A região motora (cabeça) é seguida por uma alavanca (pescoço) e pela cauda com terminações proximal e distal. **B.** Cada miosina II é composta por um homodímero de cadeias pesadas na porção

N-terminal, seguido por um pescoço onde se encontram dois pares de cadeias leves (uma cadeia regulatória e outra essencial leve). Na porção C-terminal encontra-se uma região não-helicoidal. Figura adaptada de Kneussel & Wagner, 2013.

A fosforilação das regiões Thr¹⁸ e Ser¹⁹ na cadeia leve regulatória é o que muda a conformação da miosina para um estado com mais afinidade ao ATP (Figura 7), aumentando a atividade de ATPase, sendo várias as proteínas que fazem essa fosforilação como a ROCK (*Rho-associated protein kinase*) e a MLCK (*Myosin light-chain kinase*) (Rex et al., 2010). As miosinas não-musculares já foram descritas como reguladoras diretas da polimerização de actina nos espinhos dendríticos (Rex et al., 2010), e que, através de sua inibição por meio farmacológico e genético, previne-se a formação de memória de medo. As miosinas II não-musculares podem ainda existir em duas isoformas, A e B, sendo mais predominante no encéfalo a isoforma B (Ryu et al., 2006).

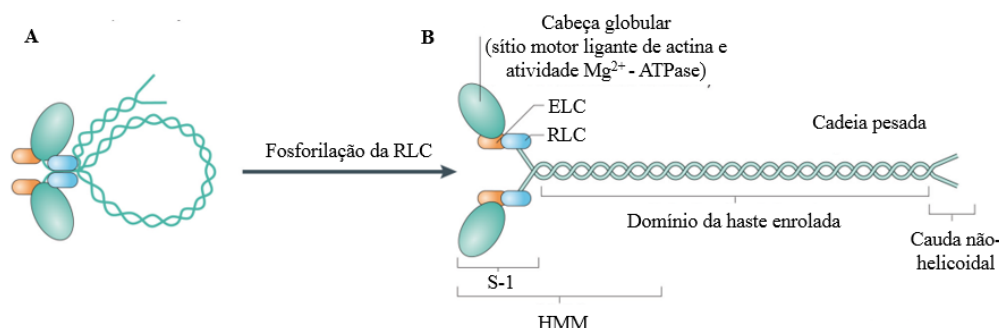


Figura 7. Mudança da conformação estrutural da miosina II. A. Estrutura da miosina II antes de a cadeia leve regulatória ser fosforilada. B. Estrutura pós-fosforilação apresentando uma cabeça globular que realiza a atividade ATPase. ELC – *Essential light chain*, RLC – *Regulatory light chain*, S-1 é um fragmento de NMII que contém o domínio motor e pescoço, mas falta o domínio da haste e por isso não dimeriza, HMM – *Heavy meromyosin*. Figura adaptada de Vincente-Manzares et al., 2009.

Em neurônios maduros do hipocampo encontram-se nos espinhos (no pescoço e na região proximal da cabeça), principalmente na PSD (densidade pós-sináptica, do inglês *postsynaptic density*) (Kneussel e Wagner, 2013) (Figura 8).

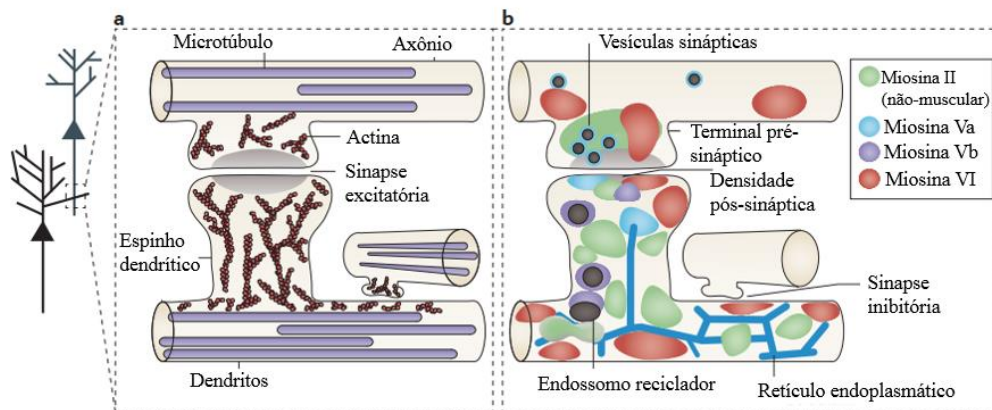


Figura 8. Actina e miosina em sinapses do Sistema Nervoso Central. **A.** Organização dos filamentos de actina nas sinapses. **B.** Distribuição esquemática de alguns tipos de miosina nas proximidades da sinapse. Figura adaptada de Kneussel & Wagner, 2013.

Um inibidor da miosina IIB, a blebbistatina, que é altamente penetrável no cérebro, já foi usado em culturas de células hipocâmpais e observou-se que os espinhos com formato de cogumelo foram transformados em espinhos do tipo filopódio, mostrando a relação da miosina II com a morfologia dos espinhos (Ryu et al., 2006). Em experimentos *in vivo* Gavin et al., 2012 encontraram que infusões da blebbistatina na região CA1 do hipocampo provocaram prejuízo na consolidação de memória de longa-duração associando um choque ao contexto. Ao mesmo tempo, Young et al., 2016 demonstraram prejuízo no armazenamento de memórias associadas a metanfetamina (METH) quando a blebbistatina foi aplicada na amígdala e que o tratamento reduziu a densidade de espinhos. Esses dados mostram o envolvimento da miosina IIB com diferentes tipos de memória através da dinâmica conformacional dos filamentos de actina no citoesqueleto. Esses poucos estudos sugerem que a miosina IIB possui um papel importante nos processos de memória.

A blebbistatina é um inibidor não-competitivo, de alta afinidade e específico da maioria das formas de miosina II (Zhao et al., 2008). Ela exerce o seu papel inibitório, impedindo a ligação mútua dos filamentos de actomiosina através de sua ligação ao complexo miosina-ADP-Pi, (Kovács et al., 2014) (Figura 9).

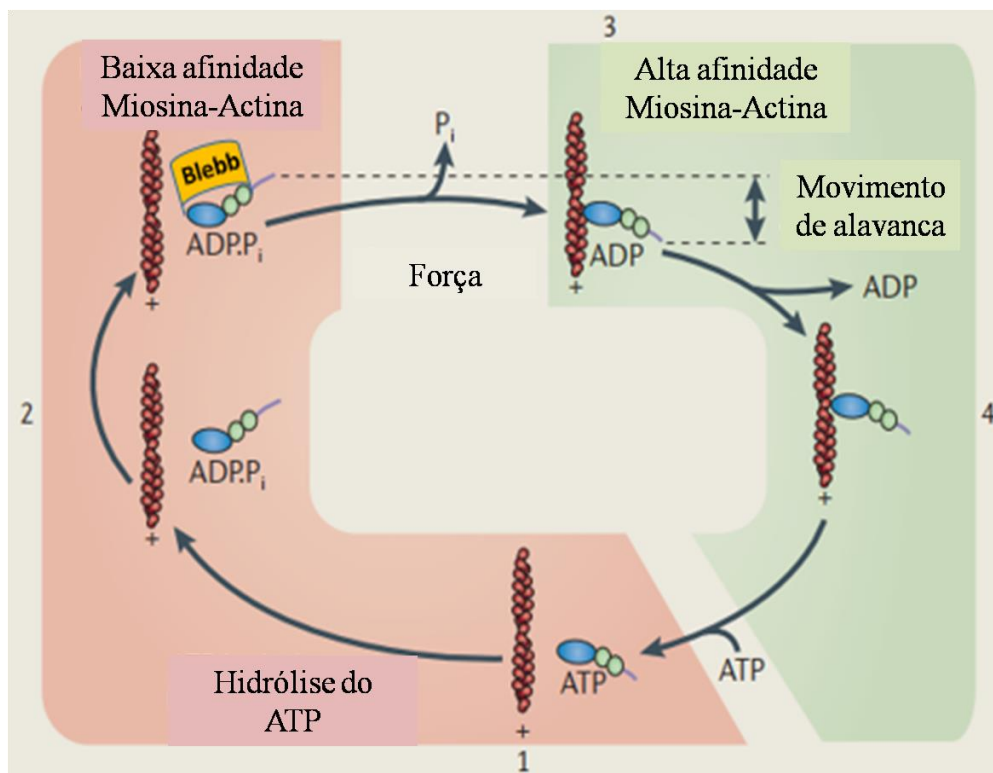


Figura 9. O ciclo mecanoquímico da actomiosina. Do lado direito (verde) está representado o estado de alta afinidade em que se encontram a miosina a actina. Do lado esquerdo (rosa) encontra-se o filamento de actina e a miosina pós-hidrólise de ATP com $ADP + P_i$ apresentando baixa afinidade para se ligar à actina. Finalmente o inibidor, a blebbistatina interferindo no processo de liberação do fosfato. Figura retirada e adaptada de Kneussel & Wagner, 2013.

Dado isso, nosso trabalho surgiu com a intenção de aprofundar os conhecimentos da atuação da miosina IIB em estados de alta plasticidade sináptica, como a consolidação, reativação e extinção da memória. Foi quando esbarramos na função crucial da miosina IIB na manutenção da memória, onde sua inibição tinha efeito mesmo fora da janela de consolidação e surpreendentemente sem precisar de reativação, tornando essa proteína um alvo promissor no tratamento de doenças que levam a déficits cognitivos e prejuízos da memória.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o papel da Miosina IIB na manutenção da memória.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito de duas diferentes doses do inibidor da MIIB sobre a consolidação de uma memória de condicionamento aversivo ao contexto de longa duração no hipocampo.
- Verificar o papel da MIIB na memória de curto prazo e na consolidação de uma memória de longo prazo no condicionamento aversivo ao contexto no hipocampo.
- Avaliar o papel da MIIB na evocação de uma memória de condicionamento aversivo ao contexto envolvida com o hipocampo.
- Verificar a importância da MIIB para a manutenção da memória no hipocampo e se o efeito de sua inibição é dependente de reconsolidação.
- Avaliar se o bloqueio da MIIB antes da sessão de treino prejudicaria o aprendizado da tarefa de condicionamento aversivo ao contexto no hipocampo.
- Verificar a importância da MIIB para a manutenção da memória de aprendizados subsequente em dois contextos diferentes no hipocampo.
- Avaliar o papel da MIIB na manutenção de uma memória de extinção no hipocampo.
- Verificar se a MIIB é necessária para manutenção de memórias remotas no hipocampo.
- Avaliar o papel da MIIB na manutenção de uma memória de condicionamento aversivo ao tom na amígdala basolateral.
- Verificar o papel da MIIB na manutenção de uma memória de condicionamento aversivo ao sabor no córtex insular.
- Verificar o papel da MIIB na manutenção de uma memória de localização de objetos no hipocampo.

3. RESULTADOS

3.1. Artigo – LONG-TERM MEMORY PERSISTENCE DEPENDS ON MYOSIN IIB'S ACTIVITY. *Mateus Oliveira Silva^{1,3}, Bruno Popik^{1,3}, Rossana Rosa Porto^{1,3}, Ana Paula Crestani^{2,3}, Jorge Alberto Quillfeldt^{2,3}, Lucas de Oliveira Alvares^{1,3*}*

Será submetido à revista The Journal of Neuroscience

LONG-TERM MEMORY MAINTENANCE DEPENDS ON MYOSIN IIB'S
ACTIVITY

Mateus Oliveira Silva^{1,3}, Bruno Popik^{1,3}, Rossana Rosa Porto^{1,3}, Ana Paula Crestani^{2,3}, Lucas de Oliveira Alvares^{1,3*}

1. Neurobiology of Memory Lab, Biophysics Department, Bioscience Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

2. Psychobiology and Neurocomputation Lab, Biophysics Department, Bioscience Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil; Neurosciences Graduate Program, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

3. Neurosciences Graduate Program, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

*Corresponding author: Dr. Lucas de Oliveira Alvares. Neurobiology of Memory Laboratory, Biosciences Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 91501-970, Brazil. Tel/Fax: +55 51 3308-7607. E-mail: lucas.alvares@ufrgs.br

Abstract

Synaptic plasticity events are intrinsically linked to dendritic spines and both are substrates for the formation, storage and expression of memory. Myosin IIB is a main component for the morphophysiology of the dendritic spines and for the regulation of synaptic plasticity through the binding to the actin filament. The phosphorylation of its regulatory light chain promotes actin filament contraction and is responsible for LTP establishment, maintenance, and spine head growth. In this study, we used blebbistatin (Blebb) to pharmacologically block myosin IIB to assess the effects of its inhibition on memory processes. We first found that immediate post-training infusion of blebb in the hippocampus impaired long-term fear memory consolidation, but not short-term memory. In addition, it did not affect a memory that has undergone system consolidation. Next, we showed that pre-test infusion of the drug hindered memory retrieval. Surprisingly, we also found that blebb was able to suppress memory retention when applied after the consolidation window, even without reactivation. We then replicated those results in a number of other behavioral protocols involving different brain structures. Our results show that Myosin IIB plays an essential role not only in memory formation and expression, but also memory maintenance. Finally, our findings are extremely relevant to unravel new mechanisms in the search for new pharmacological intervention that may help in the treatment of memory related cognitive disorders.

Key-words: Synaptic Plasticity, Myosin IIB, Blebbistatin, Memory Maintenance.

1. INTRODUCTION

The major part of the synapses occurs at the dendritic spine site where many cellular and molecular events happen in order to help the transmission of electrical signals throughout the neuron. Dendritic spines are known to be actin-rich short protrusions (Matus, 2000) that can have different shapes and sizes due to their high cytoskeleton dynamics (Hering and Sheng, 2001). Those dynamics support several forms of synaptic plasticity which is believed to be the basis of learning and memory, relying on two key mechanisms: formation of new synapses and/or elimination of old ones; and selective strengthening and weakening of existing synapses (Kneussel and Wagner, 2013; Südhof and Malenka, 2008). Plastic events such as long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD) can induce or decrease spinogenesis in the brain through actin-myosin interaction mechanisms (Hlushchenko et al., 2016). Myosins are mechanoenzymes that interact with actin filaments and hydrolyze ATP to generate movement. This process has been shown to be important for the normal development and function of dendritic spines (Ryu et al., 2006; Kneussel and Wagner, 2013). The interaction with actin filaments oscillates between polymerization and depolymerization generating different spine morphologies. Myosins have hexameric structure and are composed of two heavy chains and two pairs of calmodulin-related light regulatory chains and the different myosin classes are determined by their motor domain, encoded by different genes.

Moreover, following an LTP, there is a Ca^{2+} influx through NMDARs activating several enzymes in dendritic spines including ROCK (Rho-associated protein kinase), PKC (protein kinase C) and MLCK (Myosin light-chain kinase) which are capable of phosphorylating the regulatory light chain of myosin IIB in the Thr¹⁸ and Ser¹⁹ regions. This phosphorylation changes myosin's conformational structure to a higher ATP-affinity state, increasing its ATPase activity (Rex et al., 2010). A highly specific brain penetrant and non-competitor inhibitor, blebbistatin (Blebb) has been widely used to study bodily functions, including memory formation and expression, because of its power to block myosin IIB's ATPase activity (Kovács et al., 2004).

Using *in vivo* experiments Gavin and colleagues (2012) showed that blebbistatin infusion into the CA1 region of the dorsal hippocampus impaired an aversive long-term memory consolidation. Additionally, Young et al., 2016 have shown a methamphetamine-associated (METH) memory storage impairment when

blebbistatin was infused in the basolateral amygdala (BLA) observing also less spine density. In cultured neurons blebb was also able to transform mature *mushroom* spines into *filopodia*-like ones (Ryu et al., 2006) demonstrating that myosin IIB is indeed related to a number of plastic events occurring throughout the brains.

It has been shown that the myosin IIB is involved in a number of memory processes but there is a lack of information when it comes to the protein's role for long-term memory maintenance. Briggs et al., 2014 have demonstrated that cocaine (COC) and amphetamine (AMP)-associated memories' persistence are disrupted when blebbistatin was infused 2 days in the *nucleus accumbens* after training in a conditioned place preference task; however, little is known about how memories are maintained over time. One mechanism suggested is through the activation of the protein kinase C atypical isoform (PKM ζ) which is increased in the long-term potentiation and it, in turn, increases the number of functional AMPA receptors in the post synaptic membrane (Saktor et al., 1993; Saktor, 2008). It has been demonstrated that the persistence of memories formed in a spatial and in an associative task were disrupted by the inhibition of PKM ζ in the hippocampus (Pastalkova et al., 2006) and in the cortex (Shema et al., 2007).

Despite the existing studies regarding the influence of myosin IIB on memories there is scarce data demonstrating how it plays a role maintaining memories. Thus, we hypothesized that myosin IIB would be especially important for memory persistence in distinct behavioral tasks, not only the ones forming aversive memories, possibly because of its high interference with actin filaments and its treadmilling rate. Here, we aimed to analyze the role of myosin IIB in long-term memory maintenance.

2.METHODS

2.1 Animals

We used male Wistar rats (age 2–3 months, weight 290–350 g) from our breeding colony that were housed in plastic cages (four per cage), with water and food available ad libitum. The animals were maintained under a 12/12 h light/dark cycle (lights on at 7 a.m.) in a constant temperature of 24 ± 1 °C. All experiments were performed in accordance to the national animal care legislation and guidelines (Brazilian Law 11.794/2008) and approved by the Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul (CEUA n. 33025).

2.2 Stereotaxic Surgery and Cannula Placement

Rats were deeply anesthetized via an intraperitoneal injection of ketamine/xylazine (75 and 10 mg/kg, respectively) and bilaterally implanted in the brain targeting either the dorsal hippocampus (dHPC), the basolateral amygdala (BLA) or the insular cortex (IC) with a 27-gauge guide cannula. Coordinates were different according to the region where the blebbistatin was meant to be infused. For the dHPC cannulation the coordinates were anteroposterior (AP) -4.0 mm (from bregma), laterolateral (LL) ± 3.0 mm, and dorsoventral (DV) -1.6 mm; for the IC they were AP $+ 1.2$ mm, LL ± 5.5 mm, DV $- 3.0$ mm; for the BLA they were AP -2.5 mm, LL ± 5.1 mm, DV $- 3.0$ mm. Before the behavioral tests, animals were allowed to recover for a period of 5 to 7 days. Following the behavioral experiments, subjects were euthanized and their brains were dissected and preserved in 30% sucrose and 4% paraformaldehyde to verify cannula position. Only animals with correct cannula placements were included in the statistical analysis.

2.3 Drugs

Blebbistatin (Tocris), a specific inhibitor of myosin II ATPase activity, was prepared in a vehicle solution (10% DMSO in sterile isotonic saline, pH 7.4). The dose used was based on previous *in vivo* studies that demonstrated effects on memory consolidation, being 90ng/ μ l.

2.4 Intracerebral Infusion

At the time of infusion, a 30-gauge infusion needle was inserted into the guide cannulae, with its tip protruding 1.0 mm beyond the tip of the cannula and aimed either to the dHPC, BLA or IC. A volume of 0.5 μ L of blebbistatin or vehicle (DMSO 10%) was bilaterally infused at a slow rate (20 μ L/h) in a time of ~90 seconds, and the needle removed only after waiting for an additional 30 sec.

2.5 Behavioral Tests

2.5.1 Contextual Fear Conditioning (CFC)

The chamber (context A) used for contextual fear conditioning consisted of an illuminated Plexiglas box (25.0 \times 25.0-cm grid of parallel 0.1-cm caliber stainless steel bars spaced 1.0 cm apart). Context B had the same grid base but a circular wall with straps and vanilla essence, performed in a different room and context C had dark walls with no smell and performed in a third room. The illumination inside the room was ~400–800 lx. In the conditioning session (training), rats were placed in the chamber for 3 min for habituation and then received two 2 s foot shocks, of 0.7 mA, separated by a 30 s interval. Animals were kept in the conditioning environment for an additional 30 s before returning to their home cages. *Reactivation session*: subjects were reexposed to the training context 2 days after training, without the unconditioned stimulus (US), during 5 min to induce memory reconsolidation. *Extinction session*: subjects were reexposed to the training context 2 days after training, without the unconditioned stimulus (US) during 30 min, to induce memory extinction. *Test session*: Animals were tested for 4 min in the same context and freezing behavior was quantified, registered using a stopwatch in real time by an experienced observer that was unaware of the experimental conditions. Freezing was defined as total immobilization except for movements required for respiration.

2.5.2 Auditory Fear Conditioning (AFC)

The conditioning chamber (context) consisted of an illuminated Plexiglas box (33 \times 22 \times 22 cm grid of parallel 0.1 cm caliber stainless steel bars spaced 1.0 cm apart). Rats were habituated for 2 days in context A (10 min each), and 24 h later, they were placed in a different context (context B), where they received 3 conditioning trials consisting of a 30-s presentation of a 5-kHz, 75-dB tone (CS) that co-terminated with a 0.5 mA, 1 s duration footshock (US) (three tone-footshock pairings). The interval between pairings was 1 min. Rats were returned to their home cages one minute after

the last pairing. They were then tested in context A 24 h after training, where three 30-s tones were presented with 1-min intervals after 2 min habituation. Animals were returned to their home-cages 1 min later. The time percentage of freezing during tone presentation was quantified.

2.5.3 Conditioned Taste Aversion (CTA)

Five to seven days after bilateral cannulae placement into the insular cortex animals were introduced in the CTA training, as described by (Moguel-Gonzalez et al., 2008; Rodriguez-Duran et al., 2011). Rats were habituated to drink water from a single graduated cylinder twice a day (once in the morning and in the afternoon), during 10 min trials for 4 days, after being water-deprived for 24 h. On the acquisition day, water was substituted for saccharin solution in a concentration of 0.1% (Êxodo científica, Brazil), and after 10 min, the animals received a 7.5 ml/kg intraperitoneal injection of a 0.15-M solution of LiCl, which induces digestive malaise. After two more days of water consumption (baseline), it was substituted by a 0.1% saccharin solution to test the aversion reaction. The reduction of saccharin consumption with respect to baseline intake was used as a measure of aversion.

2.5.4 Object Localization (OL)

For the object location (OL) task we used a black square arena (60×60×60cm) made of wood with distinct visual cues in the walls. The animals underwent 4 consecutive days of 5 min exposure for habituation in the absence of objects followed by a three-trial training session (5 minutes each) with two identical objects positioned in opposite corners (15 cm distant of the walls). The test session was performed during 5 min, one day after the infusion, which happened 24 h after training, where one of the identical objects was displaced into a different position in the arena. Memory retention was expressed as a percentage of the total exploration time to both objects. The exploration index was calculated as $t_{\text{novel}} \times 100 / (t_{\text{familiar}} + t_{\text{novel}})$. The exploration was only registered when animals sniffs the object, being evaluated manually by a trained observer blind to experimental conditions.

2.6 Histology

The position of the cannulae was verified at the end of the experiments. The brains were removed and immersed in a fixation solution of 30% sucrose and 4%

paraformaldehyde. Brains were then frozen and sliced (50 μm coronal sections) using a cryostat. Sections were stained with Cresyl violet and, subsequently, examined to verify the location of the cannulae. Statistical analysis considered only animals with correct cannulae placements.

2.7 Statistics

All data were analyzed through the statistical software GraphPad Prism 6. Memory was quantified by the freezing behavior, usually depicted in percentages. Since all experimental groups were proven to be normally distributed, results were then analyzed with unpaired t test, one-way ANOVA, repeated measures two-way ANOVA or ordinary two-way ANOVA followed by a Bonferroni post hoc test for within and between comparisons. The level of significance used was always set at $P < 0.05$.

3. RESULTS

3.1 Myosin IIB is necessary for long-term memory consolidation but not for short-term memory

Since Myosin IIB has been demonstrated to be important for plasticity-related events (Koskinen et. al, 2014; Ryu et. al, 2006) and memory formation (Mantzur et. al, 2009; Rex et. al, 2010; Gavin et. al, 2012; Young et. al, 2014; Young et. al, 2016; Briggs et. al, 2017), we aimed to analyze the consequences of its inhibition in the dorsal hippocampus of rats trained in contextual fear.

Firstly, we conducted a dose-response curve experiment, infusing the myosin IIB inhibitor, blebbistatin, immediately after training at two different concentrations, 45 and 90 ng/ μ l. Animals were trained in contextual fear conditioning task and tested 48 h later. Only the dose of 90 ng/ μ l was able to impair memory consolidation (**Figure 1A**; $F_{(2,24)} = 14,55$; $P < 0.0001$), showing lower freezing levels when compared to control (Bonferroni post hoc, $P < 0.0001$) and 45 ng/ μ l (Bonferroni post hoc, $P = 0.003$). We then adopted the effective dose for all subsequent experiments. Since we observed that its impaired long-term memory consolidation in a contextual fear conditioning (CFC) protocol, we decided to verify if it also inhibits short-term memory. Our results showed that blebb did not affect a short-term memory when animals were tested 2 h after training, but LTM was again impaired (**Figure 1B**; **STM**: $t_{15} = 0.1873$, $P = 0.8540$. **LTM**: $t_{15} = 4.546$; $P = 0.0004$).

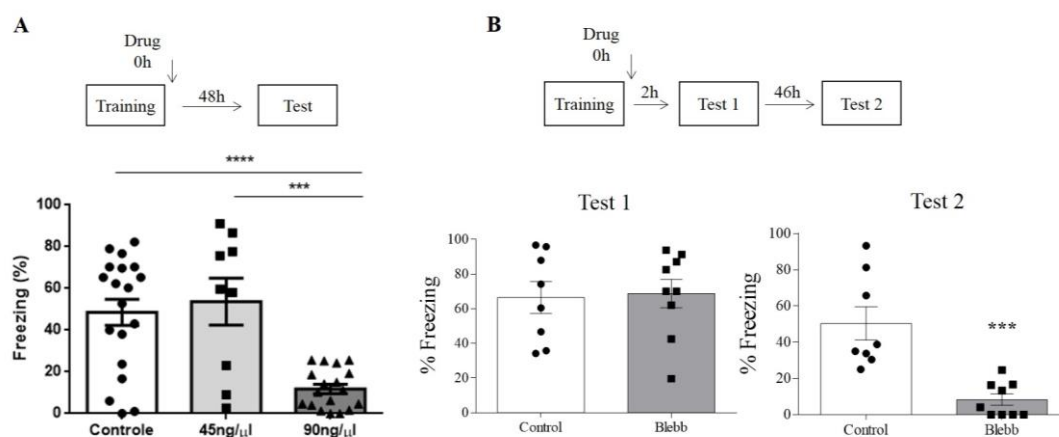


Figure 1. Myosin IIB is required for long-term memory consolidation but not short-term memory. A. The myosin IIB inhibitor was infused in the dorsal

hippocampus immediately after training at different concentrations (45 or 90 ng/ μ l) and freezing behavior was quantified 48 h later during the test session. One-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc. **B.** The myosin IIB inhibitor was infused in the dorsal hippocampus immediately after training at a concentration of 90 ng/ μ l and freezing behavior was quantified 2 h later to test for short-term memory retention and 46 h later to test for long-term memory retention. ($***P < 0.001$; $**** P < 0.0001$). Data are expressed in mean \pm SEM.

It has been shown that blebb has an immediate effect on spine morphology and motility (Ryu et. al, 2006), as well as methamphetamine-associated memory retrieval (Young et. al, 2014; Young et. al, 2016). Then we decided to evaluate its effect infusing the drug in the dorsal hippocampus 20 min before contextual fear conditioning retrieval. Rats treated with blebb expressed a lower freezing level in the test (**Figure 2**, $t_{16}=4.498$, $P=0.0004$). This result suggests that myosin IIB activity is required for memory retrieval.

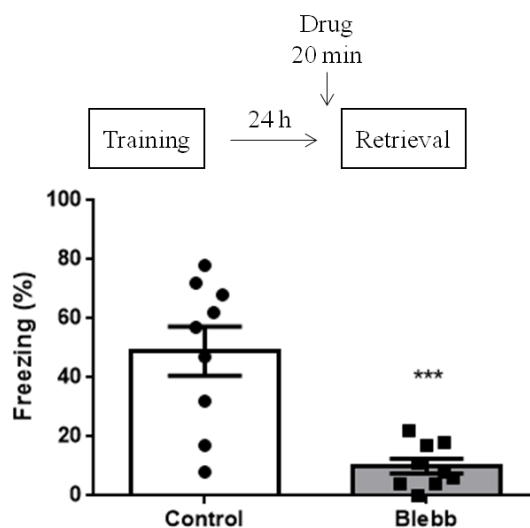


Figure 2. Myosin IIB is necessary memory retrieval. The myosin IIB inhibitor was infused in the dorsal hippocampus 20 min before the retrieval session and freezing behavior was analyzed. Unpaired t test ($P=0.0004$). Data are mean \pm SEM.

3.2 Myosin IIB is necessary for CFC memory maintenance

Myosin IIB has been demonstrated to be important for some memory processes as shown above, thus, we next evaluated the effects of myosin IIB inhibition in reconsolidation. A set of animals were fear conditioned and divided in three different

groups, a control one that received the vehicle and underwent a reactivation session, a drug group that was also reactivated and a non-reactivated drug group. The myosin IIB inhibitor was infused in the dorsal hippocampus in the drug groups 20 min before the reactivation session. Freezing behavior was quantified 24 h later (**Figure 3A**). In the reactivation session animals displayed reduced freezing levels in the drug group (**Figure 3B** = $t_{17} = 4.577$; $P = 0.0003$). One day later, in the test session, we found a drug effect in the reactivated blebbistatin group compared to the controls (**Figure 3C**; $F_{(2,21)} = 28.24$; $P < 0.0001$; Bonferroni post hoc, $P < 0.0001$ trikingly, we also found the same effect in the non-reactivated group (**Figure 3C**; $F_{(2,21)} = 28.24$; $P < 0.0001$; Bonferroni post hoc, $P < 0.0001$), where the blebb-infused animals showed reduced freezing levels when compared to control. Those results showed that myosin IIB is indeed important for memory maintenance

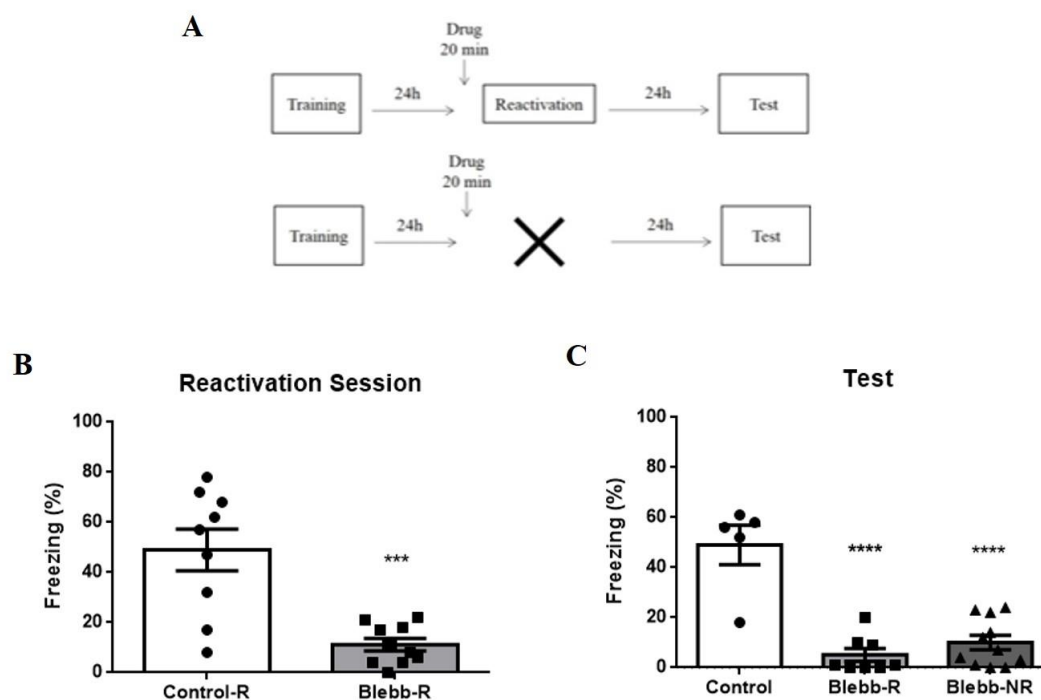


Figure 3. Myosin IIB is important for memory maintenance. **A.** The myosin IIB inhibitor was infused in the dorsal hippocampus 24 h after training and 20 min before the reactivation session in the reactivated group. **B.** A control and a drug group underwent a reactivation session and freezing was quantified during it. Unpaired t Test ($P=0.0003$). **C.** The same groups from the previous graph (B) were then tested 24 h after the reactivation, and one more non-reactivated drug group was tested along. One-way ANOVA ($P < 0.0001$) followed by Bonferroni post hoc ($***P < 0.001$, $****P < 0.0001$). Data are mean \pm SEM.

Since blebb was able to considerably reduce freezing behavior in our animals, we wondered if the drug itself could cause any damage to the learning process. Therefore, we infused the inhibitor 24 h before the training session and tested the animals 72 h later. We observed that the treated group expressed the same freezing levels compared with controls (**Figure 4**; $t_{14}=0.9262$; $P=0.3700$),

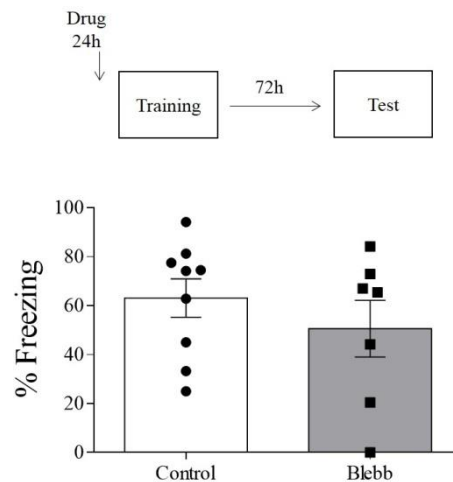


Figure 4. Myosin IIB inhibition a day before fear conditioning has no effect on long-term fear memory. The myosin IIB inhibitor was infused in the dorsal hippocampus 24 h before training at a concentration of 90 ng/ μ l and freezing behavior was quantified 72 h later to test if it interferes with animals' learning. Unpaired t test ($P = 0.3700$). Data are mean \pm SEM.

Our results so far have shown that blebb impairs long-term memory consolidation, persistence and retrieval. Next, we asked if it would exert its effect on a single memory or if it would disrupt previous memories as well. First, we trained the animals in two different contexts, separated by 48 h. The inhibitor was infused 48 h after the second learning and freezing was assessed in the first and second context (separated by one day). There was an interaction between drug and treatment ($F_{(2,34)} = 35.56$, $P < 0.0001$) and an effect of the drug ($F_{(1,17)} = 19.55$, $P = 0.0004$) and test ($F_{(2,34)} = 57.92$, $P < 0.0001$). Both memories were affected by inhibition of myosin IIB, indicating that it's not specific to a single memory (**Figure 5**, $P < 0.0001$).

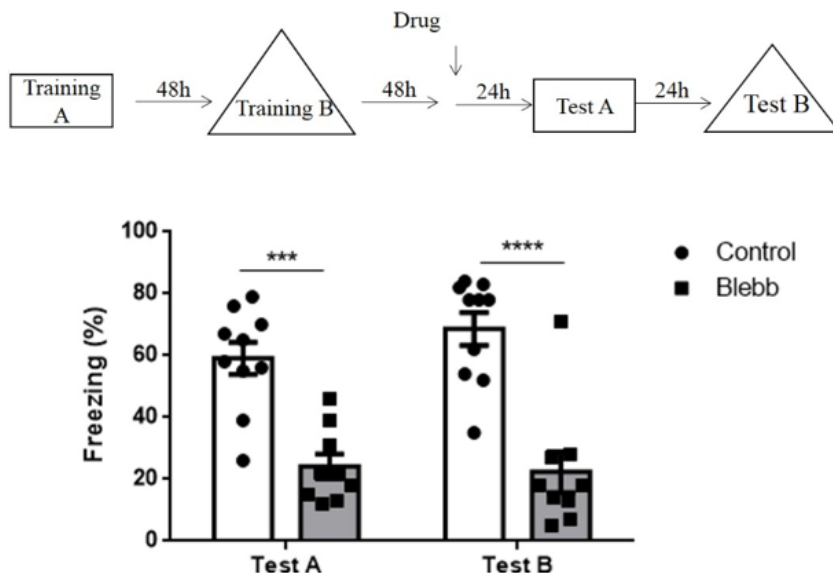


Figure 5. Myosin IIB inhibition impairs the maintenance of two different subsequent memories. The myosin IIB inhibitor was infused in the dorsal hippocampus 48 h after the second learning (context B) and freezing behavior was analyzed in the first training context (A) 24 h later and in context B in the next day. Two-way ANOVA of repeated measures followed by Bonferroni post hoc (***) $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$). Data are mean \pm SEM.

We then aimed to evaluate if either a training or an extinction session (which forms an inhibitory trace), or both memories would be disrupted by the drug. We hypothesized that if blebb indeed affects extinction memory, we would expect higher freezing levels in the drug group in the test session. However, if it affects the previous fear memory, we would expect lower freezing levels in the subsequent test and no spontaneous recovery would be seen. Our extinction protocol was performed 48 h after exposure to the CFC and the inhibitor was infused 24 h later. Animals were tested first one day later and then 20 days after for spontaneous recovery. There was no effect of treatment ($F_{(1,13)} = 1.342$, $P = 0.2674$), but there was an effect in the test ($F_{(1,13)} = 7.629$, $P = 0.0162$) and an interaction between drug and test (**Figure 6**, $F_{(1,13)} = 13.43$, $P = 0.0029$), where the control group showed an spontaneous recovery 20 days after extinction protocol ($P = 0.0171$), however, the treated animals didn't. These results confirmed that the inhibition of myosin IIB impaired not only extinction memory but also the previously acquired contextual fear memory.

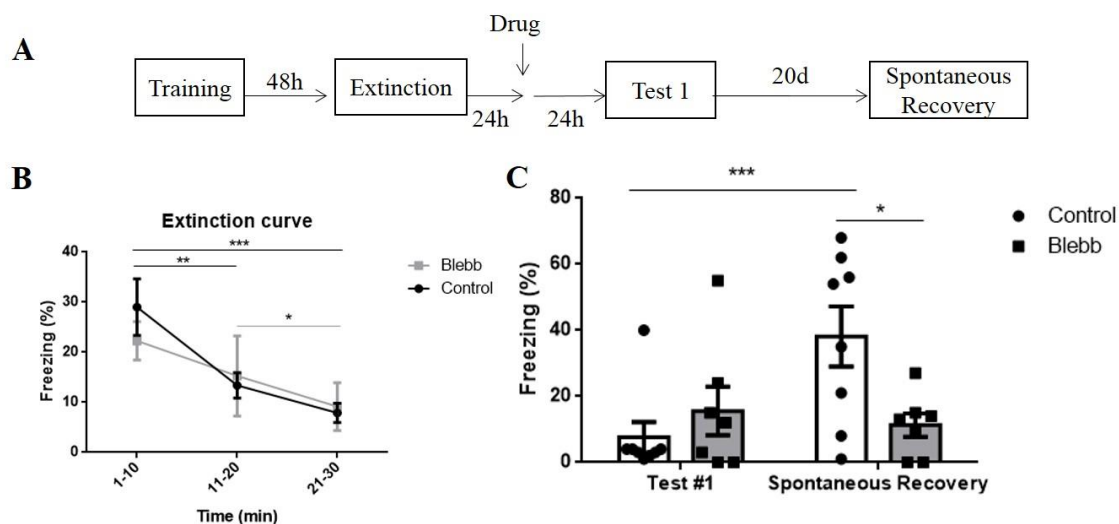


Figure 6. Myosin IIB inhibition impairs both training and extinction memory maintenance. The myosin IIB inhibitor was infused in the dorsal hippocampus 24 h after the extinction protocol and freezing behavior was quantified one day after the infusion and 20 days later to test for spontaneous recovery. **B.** Extinction curve in blocks of 10 min. **C.** Test 1 was performed 24 h after extinction and spontaneous recovery 20 days later. Two-way ANOVA of repeated measures followed by Bonferroni post hoc (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). Data are mean \pm SEM.

The Standard Model Theory of memory consolidation posits that memory is initially stored in the hippocampus. However, with the passage of time, the hippocampus induces a distributed representation of the memory trace in the neocortex, establishing a cortically based memory that is capable of being retrieved independently of the hippocampus (Teng and Squire, 1999). This process is called systems consolidation. Considering that the hippocampus is no longer necessary for memory retrieval after 40 days following training (Bontempi, 1999), we hypothesized that blocking myosin IIB wouldn't impair memory retention. To test our hypothesis, we infused blebb in the dorsal hippocampus 39 days after the training session at a concentration of 90 ng/ μ l and freezing behavior was quantified 24 h later. There was no difference between control and drug (**Figure 7**; $t_{17} = 0.4165$; $P = 0.6823$), showing that inhibiting myosin IIB does not affect a memory that has gone through system consolidation, as expected, since by that time point, the mainly responsible for memory storage is anterior cingulate cortex.

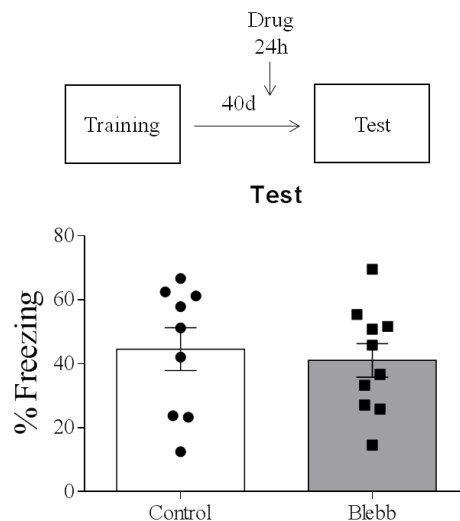


Figure 7. Myosin IIB is not engaged in memory maintenance in the hippocampus after system consolidation. The myosin IIB inhibitor was infused in the dorsal hippocampus 39 days after training at a concentration of 90 ng/ μ l and freezing behavior was quantified 24 h later to test if it interferes with system consolidation. Unpaired t test ($P = 0.6823$). Data are mean \pm SEM.

3.3 Distinct brain areas and memory types requires Myosin IIB for memory maintenance

Our previous experiments were performed using only contextual fear conditioning task and the hippocampus as brain target. Next, we expanded the possible role played by MIIB in memory persistence in other brain areas and distinct memory types in order to verify whether this function is a general mnemonic phenomenon.

Firstly, we trained animals in the hippocampus-independent auditory fear conditioning task. Blebb was infused 24 h after training session in the basolateral amygdala. The animals' freezing behavior in response to the tone was analyzed 24 h later. The drug was able to reduce freezing levels when compared to the control group (**Figure 8**, $t_{(15)} = 6.579$, $P < 0.0001$), showing that myosin IIB is necessary for memory maintenance in the BLA in the auditory fear conditioning.

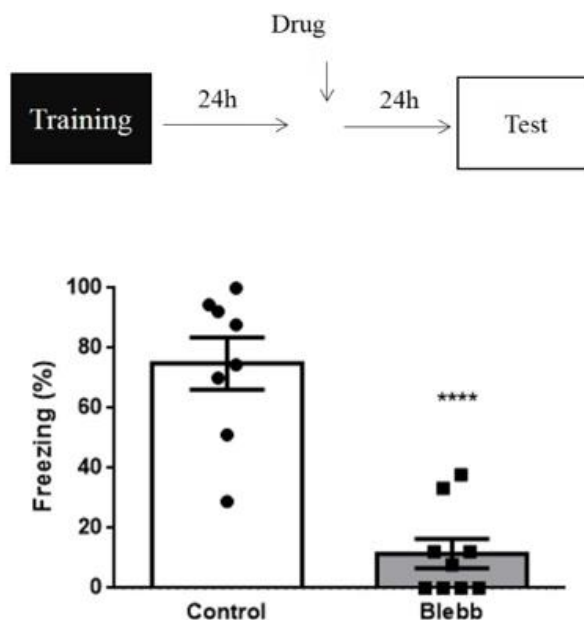


Figure 8. Myosin IIB is required for an auditory fear memory maintenance in the basolateral amygdala. The myosin IIB inhibitor was infused in the basolateral amygdala 24 h after auditory fear conditioning training in a context A and freezing behavior was quantified 24 h after the infusion in a context B. Unpaired *t* test ($***P < 0.0001$). Data are mean \pm SEM.

Next, we investigated whether myosin IIB would also be necessary to the memory maintenance of a distinct type of memory, such as conditioned taste aversion (CTA). Then, we infused the myosin IIB inhibitor in the insular cortex (IC), a neocortical region closely associated with CTA. This protocol consists of habituating the animals to consume water (baseline), then conditioning saccharine to LiCl, which causes digestive malaise, forming an aversive memory. The drug was infused one day after the acquisition phase and animals underwent an aversive test after a second baseline period. There was an interaction between treatment and time analyzed (**Figure 9**, $F_{(1,17)} = 17.36$, $P = 0.0006$), as well as an effect of treatment ($F_{(1,17)} = 6.566$, $P = 0.0202$). The control animals developed an aversion to saccharine ($P = 0.0059$) while the treated group did not, showing increased values of saccharine intake in the test session when compared to controls ($P = 0.0001$).

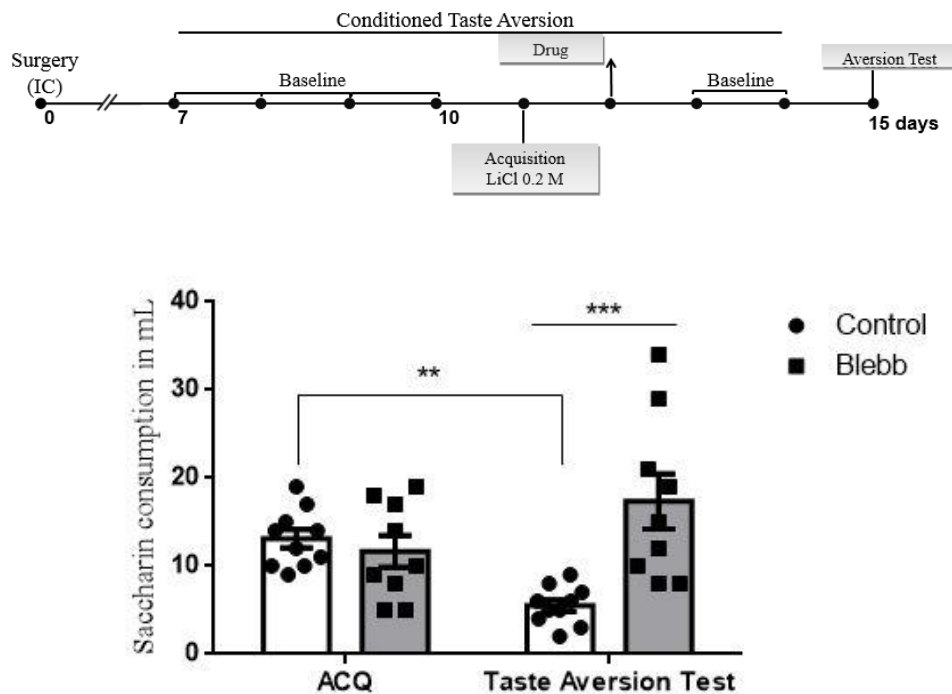


Figure 9. Myosin IIB is necessary for the maintenance of a conditioned taste aversion memory in the insular cortex. The myosin IIB inhibitor was infused in the insular cortex 24 h after acquisition phase at a concentration of 90 ng/ μ l and saccharin consumption was quantified 3 days later in the aversion test day. Two-way ANOVA of repeated measures followed by Bonferroni post hoc (** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). Data are mean \pm SEM.

The above experiments had a strong aversive component involved. We then asked whether myosin IIB would also be required to memory maintenance of an emotionally neutral hippocampus-dependent memory, as the object location task. Animals learn to explore an object that has been dislocated because of the novelty of the new location. The drug was infused in the hippocampus 24 h after the exposure to the two equal objects and animals were tested one day later. When we analyzed each group using the exploration index relating to 50% spent in each object in the training session, only control animals spent more time in the displaced object (**Figure 10**, one sample, control $t_8 = 3.966$, $P = 0.004$; blebb $t_8 = 0.6177$, $P = 0.55$). The control group was also different from the animals that received blebb, which didn't discriminate between objects in the test session (**Figure 10**, unpaired t test, $t_{16} = 2.347$, $P = 0.03$).

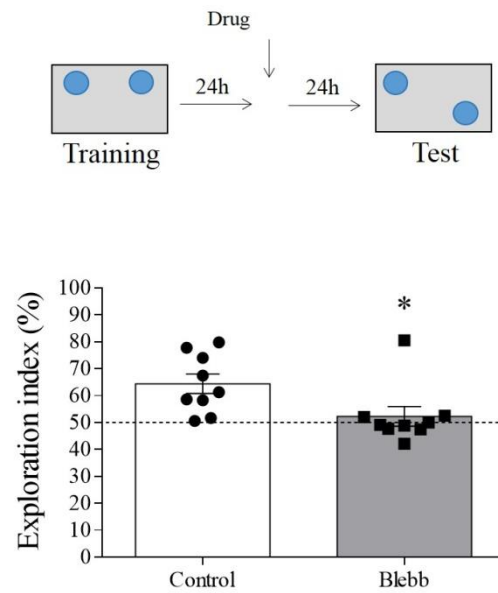


Figure 10. Myosin IIB is required for memory maintenance in a neutral test in the hippocampus. The myosin IIB inhibitor was infused in the dorsal hippocampus 24 h after object localization training and animals were tested 24 h later. The total exploration in each object was quantified using the exploration index relating to 50% spent in each object in the training session (dashed line). One sample *t* test (Control: $P = 0.004$; Blebb: $P = 0.55$), unpaired *t* Test ($P = 0.03$). Data are mean \pm SEM.

4. Discussion

Our study aimed to investigate the role of non-muscular myosin IIB in the persistence of different types of memories. We found that myosin IIB was not only important for memory consolidation but also memory retrieval and more importantly, for the maintenance of different types of memories.

We used an ATPase inhibitor of myosin IIB, blebbistatin, which prevents the release of phosphate from the myosin IIB / ADP / phosphate complex, thus preventing the formation of an interaction of actomyosin (Rauscher et al., 2018). Infusion of 90 ng / μ l of blebb into the hippocampus immediately after training impaired memory consolidation, as demonstrated by Rex et al. (2010), while half of that dose failed to produce an effect on memory. Still in agreement with his study, we did not find interference in short-term memory. Similar results were found in two other studies, where LTM was affected but not STM. They infused the drug 30 min before or immediately after training, both in the hippocampus and in the amygdala (Mantzur et al., 2009; Gavin et al., 2012)

We showed that myosin IIB also participates in the active process of memory retrieval. When we infused the inhibitor 20 min prior to recall, contrasting to other authors that didn't find any effect on memory retrieval (Mantzur et al., 2009; Gavin et al., 2012). It should be pointed out that the target structure of our experiment was the hippocampus and the other two studies were performed on the amygdala, which may characterize a specific effect of the structure involved in learning. In addition, in this specific period of 24 h after training, there are several ongoing molecular events ensuring memory persistence. Among them, the renew of free G-actin monomers pool used to polymerize F-actin at the tip of the cone, increasing the relative size of F-actin in the head of the spines (Koskinen et al., 2014). On the other hand, Young et al. (2014) found an effect of blebb (infused on the basolateral amygdala) in the retrieval of methamphetamine-associated place preference. Briggs et al. (2017) observed the same effect with amphetamine in the nucleus accumbens, corroborating our findings. Furthermore, the effect of blebb is very fast, causing changes in dendritic spines as fast as 6 min (Ryu et al., 2006), thus, 20 min would be enough to destabilize this memory in the moment of recalling.

Studies have already related the effect of myosin IIB in the maintenance of memories associated with drugs abuse, where blockade by blebb caused a loss in the

retention of this association (Young et al., 2014; Young et al., 2017; Briggs et al., 2017). Surprisingly, inhibition of myosin IIB 1 day after training was able to interfere with CFC memory, when the consolidation time window is already closed. In order to confirm these findings, we then used two other aversive tasks, the auditory fear conditioning (less dependent on the hippocampus and more on the amygdala) and conditioned taste aversion (relying on the insular cortex). In the AFC, blebb infusion was performed in the basolateral amygdala 1 day after training and it erased memory. In the CTA, blebb infusion occurred 1 day after the acquisition phase, resulting in an increase in saccharin consumption, since the animals in the drug group did not remember the discomfort caused by LiCl. Finally, to verify if myosin IIB is also required to maintain a neutral memory, we infused blebb into the hippocampus 1 day after the object localization training. The animals treated with the drug had no preference for the displaced object, demonstrating that myosin IIB plays an essential role in maintaining memory overtime regardless of the brain structure and the memory type.

Another striking result, which has not yet been demonstrated, is that the inhibitory effect of blebb on memory maintenance is not restricted to just a single or the latest memory acquired, but with, at least, two distinct memories acquired at different time-points. Similarly, in an extinction protocol, where a new memory is formed transiently overshadowing the fear original memory, blebb interfered with both the original memory and the extinction memory, since there was no fear expression presented both in the test and in the spontaneous recovery probe. Young et al. (2017) found the same pattern of results when applied blebb 1 day after the session of extinction of an associative memory of methamphetamine in instrumental conditioning, where both memories were impaired.

Interesting results using the blockade of another molecule involved in memory maintenance were found by Barry et al. (2012). Intra-hippocampal infusion of PKM ζ inhibitor profoundly altered the firing of specific place cells in CA1, providing an explanation of why similar injections erase a spatial memory that is hippocampus-dependent. They argued that such memory losses occur not because the animal has forgotten the task itself, but because it disrupts similar map representations of familiar environments maintained by the hippocampus. Thus, the rat cannot accurately use environmental cues because the animal is lost in an effectively unexplored space.

It has already been showed that PKM ζ synthesis connects actin polymerization

to the persistence of increased synaptic transmission during LTP (Kelly et al., 2006). Although actin polymerization is usually seen as a structural mechanism and therefore part of LTP expression, the study results indicates that actin polymerization is critical for PKM ζ synthesis, preceding the signaling cascade leading to the maintenance of LTP. In addition, myosin IIB is essential because it drives the turnover of large F-actin filaments into small actin structures that are then depolymerized passively. This process replenishes the set of free G-actin monomers used to polymerize F-actin at the tip of the growth cone. If myosin II function is lost, the actin flux is disrupted and the growth cone collapses. Myosin IIB imparts a similar mechanical force that drives the polymerization of F-actin from the spine. This reorganizes the cytoskeleton to support stable expression of LTP as well as hippocampus and amygdala-dependent memories (Young et al., 2014). Thus, there will be an increase in the formation of spines, especially in the mushroom type, with widening of the head to a more stable form.

Therefore, our molecular hypothesis of blebbistatin mechanism in memory maintenance is that blebb blocks myosin IIB, not allowing the phosphate to be released, primarily affecting actin turnover to renew the free G-actin monomers to polymerize the F-actin. Mushroom-like spines then retract to filopodia because there is no stabilization of the actin filament by increasing the treadmilling rate of the dynamic pool of F-actin on the surface of the spine. This modification of the spines induced by blebb has already been demonstrated by Ryu and colleagues (2006), where it caused the shrinkage of mushroom-like spines into irregular processes similar to filopodia. Its action was very rapid, revealing profound changes in the morphology and motility of spines occurring within only dozens of minutes after drug administration. The shrinkage of a mushroom into a filopod spine may be a more serious consequence of the loss of surface tension in the spine head, suggesting that myosin ATPase activity is not directly contributing to the elongation of actin filament but it is important to establish a balance between stable and unstable filaments within the dendritic spines.

In order to investigate whether the drug caused any damage to the structure, as a control, we infused blebb 24 h prior to training in the hippocampus. We then observed that both groups were able to learn equally the control group, suggesting that there was no lesion in the region studied.

Brain structures that support memory may change from hippocampus-dependent to hippocampus-independent, in a process known as systems consolidation that take place in a few weeks (Teng and Squire, 1999). Thus, we wanted to investigate

whether blocking myosin IIB in the hippocampus 39 days after training, in a time-point where systems consolidation took place, would still be able to cause interference in a remote memory. Blebb was not able to change a memory that had already undergone systems consolidation, which now depends more on cortical regions than the hippocampus.

Uniting all the findings, we can affirm that myosin IIB is a key protein in memory-related processes, especially in its maintenance. Its inhibition is capable of impairing both memory consolidation and retrieval, not interfering with short-term memory. The most surprising data, however, is the role of myosin IIB even after the closing of the consolidation window, being able to modulate different types of memory without the need of its labilization through a reactivation session. These results are extremely important to clarify mechanisms involved in the maintenance of long-lasting memories in order to develop drugs with therapeutic potential for pathologies related to memory mechanisms deficits.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors were supported by the Brazilian's agencies: National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES) and Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS). The authors acknowledge Zelma Regina V. de Almeida and Isabel Cristina M. Scarello for their kind technical assistance.

Author contributions

MOS, BP, APC and RRP conducted the behavioral experiments. MOS, BP and LOA developed the experimental design and analyzed the data together with RRP. MOS, RRP and LOA wrote the paper. All authors read and approved the manuscript.

Compliance with Ethical Standards

All experiments were performed in accordance to the national animal care legislation and guidelines (Brazilian Law 11.794/2008) and approved by the Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul.

6. REFERENCES

- Allingham JS, Smith R, Rayment I (2005). The structural basis of blebbistatin inhibition and specificity for myosin II. **Nature Structural & Molecular Biology**, 12(4), 378-379.
- Briggs SB, Blouin AM, Young EJ, Rumbaugh G, Miller CA (2017). Memory disrupting effects of nonmuscle myosin II inhibition depend on the class of abused drug and brain region. **Learning & Memory**. 24: 70-75. Doi: 10.1101/lm.043976.116.
- Bontempi B, Laurent-Demir C, Destrade C, Jaffard R (1999). Time-dependent reorganization of brain circuitry underlying long-term memory storage. **Nature**, 400, 671-675.
- Dash PK, Hebert AE, Runyan JD. A unified theory for systems and cellular memory consolidation. **Brain Research Reviews**. 45, 30 – 37. 2004. Doi:10.1016/j.brainresrev.2004.02.001.
- Gavin CF, Rubio MD, Young E, Miller C, Rumbaugh G (2012). Myosin II motor activity in the lateral amygdala is required for fear memory consolidation. **Learning & Memory**. 19: 9-14. Doi: 10.1101/lm.024042.111.
- Haubrich J, Nader, K. Memory reconsolidation. **Behavioral Neuroscience of Learning and Memory**, p. 151-176, 2016.
- Hering, H. and Sheng, M. (2001) Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. **Nature Reviews Neuroscience**. 2, 880–888.
- Kelly MT, Yao Y, Sondhi R, Sacktor TC (2007). Actin polymerization regulates the synthesis of PKM ζ in LTP. **Neuropharmacology**, 52, 41-45.
- Kneussel M, Wagner W (2013). Myosin motors at neural synapses: drivers of membrane transport and actin dynamics. **Nature Reviews: Neuroscience** 14: 233-247. Doi: 10.1038/nrn3445
- Koskinen M, Bertling E, Hotulainen R, Tanhuanpää K, Hotulainen P (2014). Myosin IIb controls actin dynamics underlying the dendritic spine maturation. **Molecular and Cellular Neuroscience** 61: 56-64. Doi: 10.1016/j.mcn.2014.05.008.
- Kovács M, Tóth J, Hetényi C, Málnási-Csizmadia A, Sellers JR (2004). Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. **The Journal of Biological Chemistry**, 279(34), 35557-35563.
- Lesburguères, E.; Bontempi, B. Making our memories last: the necessity of an early neocortical tagging process. **Medicine Sciences**. 27(12):1048-50. 2011.
- Mantzur, L., Joels, G., Lamprecht, R. Actin polymerization in lateral amygdala is essential for fear memory formation. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 91, p. 85-88, 2009.
- Matus, A. (2000) Actin-based plasticity in dendritic spines. **Science** 290, 754–758.
- Rauscher AA, Gyimesi M, Kovács M, Málnási-Csizmadia A (2018). Targeting myosin by blebbistatin derivatives: optimization and pharmacological potential. **Trends in Biochemical Sciences**, 43(9), 700-713.
- Rex CS, Gavin CF, Rubio MD, Kramar EA, Chen LY, Jia Y, Haganir RL, Muzyczka N, Gall CM, Miller CA, Lynch G, Rumbaugh G (2010). Myosin IIB regulates actin dynamics during synaptic plasticity and memory formation. **Neuron** 67(4): 603–617. doi:10.1016/j.neuron.2010.07.016
- Ryu J, Liu L, Wong TP, Wu DC, Burette A, Weinberg R, Wang YT, Sheng M (2006). A critical role for Myosin IIB in dendritic spine morphology and synaptic function. **Neuron** 49: 175-182. Doi: 10.1016/j.neuron.2005.12.017

- Serrano P, Friedman EL, Kenney J, Taubenfeld SM, Zimmerman JM, Hanna J, Alberini C, Kelley AE, Maren S, Rudy JW, Yin JCP, Sacktor TC, Fenton AA (2008). PKM ζ maintains spatial, instrumental and classically conditioned long-term memories. **PLOS Biology**, 6(12): e318.
- Shema, R.; Sacktor, T.C.; Dudai, Y. Rapid erasure of long-term memory associations in the cortex by an inhibitor of PKM zeta. **Science**. 317(5840):951-3. 2007.
- Si K, Kandel ER (2016). The role of functional prion-like proteins in the persistence of memory. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 1-18.
- Straight AF, Cheung A, Limouze J, Chen I, Westwood NJ, Sellers JR, Mitchison TJ (2003). Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II inhibitor. **Science**, 299(5613), 1743-1747.
- Südhof, T. C., & Malenka, R. C. (2008). Understanding synapses: past, present, and future. **Neuron**, 60(3), 469-76.
- Teng E, Squire LR (1999). Memory for places learned long ago is intact after hippocampal damage. **Nature**, 400, 675-677.
- Young EJ, Aceti M, Griggs, Fuchs RA, Zigmond Z, Rumbaugh G, Miller CA (2014). Selective, retrieval-independent disruption of metamphetamine-associated memory by actin depolymerization. **Biological Psychiatry**, 75(2): 96-104. Doi: 10.1016/j.biopsych.2013.07.036
- Young EJ, Blouin AM, Briggs SB, Sullivan SE, Lin L, Cameron MD, Rumbaugh G, Miller CA (2016). Nonmuscle myosin IIB as a therapeutic target for the prevention of relapse to metamphetamine use. **Molecular Psychiatry** 21(5): 615-623. Doi: 10.1038/mp.2015.103
- Young EJ, Briggs SB, Rumbaugh G, Miller CA (2017). Nonmuscle myosin II inhibition disrupts methamphetamine-associated memory in females and adolescents. **Neurobiology of Learning and Memory** 16: 30281-30287. Doi: 10.1016/j.nlm.2017.01.001

4. DISCUSSÃO GERAL

A descoberta de que a proteína miosina IIB não muscular está presente na densidade pós-sináptica ocorreu pouco mais de uma década atrás, assim como seu papel nas alterações morfológicas dos espinhos dendríticos, e conseqüentemente, na plasticidade sináptica que leva à formação de memórias. A partir destes estudos, a miosina IIB ganhou um papel de destaque, principalmente por sua abundância no encéfalo. Fato é que há síndromes e transtornos associados à má-formação ou má-funcionalidade desses espinhos, como Síndrome de Rett (Xu et al., 2014), Síndrome do X-frágil (Irwin et al., 2000), Esquizofrenia, Espectro do Autismo, Síndrome de Down e Doença de Alzheimer (Lee et al., 2015), cujos tratamentos atualmente ainda são paliativos e inespecíficos. Além destes, destacamos também o transtorno de estresse pós-traumático (TEPT), caracterizado por expressão de memórias aversivas exageradas e fora de contexto que causam prejuízos severos e incapacitantes à qualidade de vida (Yehuda et al., 2010). No âmbito da formação e expressão das memórias, os eventos plásticos estão constantemente remodelando esses espinhos, tornando-os um sítio essencial para o aprendizado e, portanto, podem ser um alvo interessante para amenizar memórias traumáticas.

Pensando nisso, o nosso projeto visou investigar o papel da miosina não muscular IIB na persistência de diferentes tipos de memórias, com intuito de desvendar mecanismos que possam contribuir com o desenvolvimento de intervenções farmacológicas que interferem, de forma mais duradoura, com a formação e/ou manutenção das memórias aversivas aberrantes. Para tanto, utilizamos um inibidor da função ATPase da miosina IIB, que impede a liberação do fosfato do complexo miosina IIB/ADP/fosfato, prevenindo assim a formação de uma interação forte de actomiosina (Rauscher et al., 2018).

Inicialmente replicamos dados bem estabelecidos na literatura sobre consolidação. Após a realização de uma curva dose resposta no CAC, vimos que de fato a dose de 90 ng/µl foi mais efetiva em inibir a memória de longa duração, quando infundida no hipocampo imediatamente após o treino, assim como já demonstrado por Rex e colaboradores (2010). Ainda em acordo com esse estudo, não encontramos interferência na memória de curta duração. Resultados similares foram encontrados quando o inibidor da função ATPase da miosina IIB foi infundido 30 min antes ou imediatamente depois do treino, tanto no hipocampo quanto na amígdala, onde a LTM foi afetada, mas não a STM (Mantzur et al., 2009; Gavin et al., 2012).

Quando infundimos o inibidor 20 min antes da evocação, a blebb foi capaz de reduzir a expressão de medo, mostrando que a miosina IIB também participa deste processo ativo. Opondo-se a estes resultados, outros achados da literatura não encontraram efeito sobre a evocação da memória (Mantzur et al., 2009; Gavin et al., 2012). Devemos salientar que a estrutura alvo deste nosso experimento foi o hipocampo e os outros dois trabalhos se ativeram à amígdala, o que pode caracterizar um efeito específico da estrutura envolvida no aprendizado. Além disso, neste período há um aumento no *turnover* de grupamentos de actina, gerando uma força que resulta na formação de pequenas estruturas, que então despolimerizam passivamente. Este processo renova o *pool* de monômeros livres de G-actina usados para polimerizar F-actina na ponta do cone, aumentando o tamanho relativo de F-actina na cabeça dos espinhos (Koskinen et al., 2014). Corroborando nosso resultado, Young e colaboradores (2014) encontraram efeito da blebb (infundida na amígdala basolateral) na evocação de condicionamento de preferência de lugar associado à metanfetamina. Briggs e colaboradores (2017) viram o mesmo efeito com anfetamina na região do núcleo accumbens. Adicionalmente, o efeito da blebb é muito rápido, visto que já foi encontrado alterações em espinhos dendríticos tão célere quanto 6 min (Ryu et al., 2006), sendo assim, 20 min seriam mais do que suficientes para causar uma desestabilização desta memória no momento da evocação.

Decidimos então testar o efeito da inibição da miosina IIB na reconsolidação da memória, uma vez que já havíamos demonstrado a sua atuação em outros processos da memória. Encontramos que, mesmo sem reativação, o grupo blebb manteve seus níveis de congelamento reduzidos se comparados ao controle, e a partir disso nos deparamos com a importância da miosina IIB para a manutenção da memória e começamos a investigar mais a fundo essa função, em outros protocolos comportamentais. Estudos já haviam relacionado o efeito da miosina IIB na persistência de memórias associadas a drogas de abuso, onde o bloqueio desta pela blebb causou um prejuízo na manutenção dessa associação (Young et al., 2014; Young et al., 2017; Briggs et al., 2017). Em nosso trabalho encontramos efeitos similares, onde o inibidor foi capaz de interferir com uma memória aversiva, mesmo quando não houve uma sessão de reativação. Este é um dado inédito pois os resultados prévios sobre persistência relacionados à MIIB presentes na literatura focaram apenas em memórias associadas a drogas de abuso como METH, AMP e COC.

Para confirmar estes resultados sobre a manutenção, utilizamos então duas outras tarefas aversivas, o condicionamento aversivo ao tom (menos dependente do hipocampo

e mais da amígdala) e o condicionamento aversivo ao sabor (dependente do córtex insular). Naquele, a infusão da blebb foi realizada na amígdala basolateral 1 dia depois do treino e o observado foi que houve uma dissociação entre estímulo condicionado e não condicionado. Neste, a infusão da blebb se deu 1 dia após a fase de aquisição, resultando em um aumento no consumo de sacarina, visto que os animais do grupo blebb não lembravam do desconforto causado pelo LiCl. Estes dados corroboram o que temos encontrado a respeito do papel da miosina IIB na manutenção da memória em diferentes estruturas e tarefas comportamentais.

Por fim, para verificar se a miosina IIB também é necessária para manutenção de uma memória neutra, infundimos o inibidor no hipocampo 1 dia após a tarefa de localização de objetos. Os animais tratados com a blebb não apresentaram preferência pelo objeto deslocado, demonstrando que, de fato, a premissa de que a miosina IIB também atuaria neste tipo de memória também é verdadeira.

Um outro dado surpreendente, que ainda não tinha sido demonstrado, é que o efeito inibidor da blebb sobre a persistência não é específico para uma memória apenas. Ela é capaz de interferir no aprendizado de dois contextos diferentes. O fármaco foi infundido no hipocampo 48 h após um segundo aprendizado e os animais reduziram significativamente a porcentagem de *freezing* nos testes de ambos os contextos. De semelhante modo, em um protocolo de extinção, onde uma memória nova é formada se sobrepondo à memória original, a blebb atuou interferindo tanto na persistência da memória original quanto da memória da extinção, visto que não houve recuperação espontânea. Young e colaboradores (2017) encontraram o mesmo padrão de resultados quando aplicado blebb 1 dia depois da sessão de extinção de uma memória associativa de metanfetamina no condicionamento instrumental, onde as duas memórias foram prejudicadas.

Barry e colaboradores (2012) encontraram resultados interessantes utilizando o bloqueio de outra molécula envolvida na manutenção da memória, a PKM ζ . Infusão intra hipocampal de ZIP alterou profundamente o disparo específico das células de lugar em CA1, fornecendo uma explicação de por que injeções semelhantes apagam a memória espacial dependente do hipocampo. Eles argumentaram que tais perdas de memória ocorrem não porque o animal tenha esquecido a tarefa em si, mas devido a rupturas de representações semelhantes a mapas de ambientes familiares mantidos pelo hipocampo. Sendo assim, o rato não pode usar com precisão as características ambientais porque está perdido em um espaço efetivamente inexplorado.

Kelly e colaboradores (2007) mostrou que a polimerização da actina é um evento crítico para que haja síntese de PKM ζ , participando, ultimamente na indução da LTP. Embora a polimerização de actina seja usualmente vista como um mecanismo de mudança estrutural e, portanto, parte da expressão de LTP, os resultados indicaram que a polimerização de actina precede a cascata de sinalização que leva à manutenção da LTP. Além disso, a miosina IIB é essencial pois impulsiona o *turnover* de grandes feixes de F-actina, conferindo-lhes uma força de cisalhamento, resultando na formação de pequenas estruturas de actina que então despolimerizam passivamente. Este processo reabastece o conjunto de monômeros livres de G-actina usados para polimerizar a F-actina na ponta do cone de crescimento. Se a função da miosina II for perdida, o fluxo de actina é interrompido e o cone de crescimento entra em colapso. A miosina IIB transmite uma força mecânica semelhante que impulsiona a polimerização da F-actina do espinho. Isso reorganiza o citoesqueleto para suportar a expressão estável da LTP, bem como a memória dependente do hipocampo e da amígdala (Young et al., 2014). Ao todo, haverá um aumento na formação de espinhos, principalmente na forma de cogumelo, com alargamento da cabeça para uma forma mais estável.

Dito isso, nossa hipótese molecular do mecanismo da blebbistatina na persistência da memória é que a blebb bloqueando a atividade da miosina IIB, afetará principalmente o *turnover* de actina para renovar os monômeros de G-actina livres para polimerizar a F-actina. Os espinhos do tipo cogumelos então retraem a filopódios porque não há estabilização do filamento de actina através do aumento da taxa de mobilização do pool dinâmico de F-actina na superfície do espinho. Essa modificação dos espinhos induzida pela blebb já foi demonstrada por Ryu e colaboradores (2006), onde ela causou a depleção de espinhos do tipo cogumelo e à sua substituição por processos irregulares semelhantes a filopódios. A sua ação foi muito rápida, com estudos de lapso de tempo revelando profundas alterações na morfologia e motilidade dos espinhos ocorrendo dentro de dezenas de minutos de aplicação do fármaco. A inibição induzida pela blebb da miosina IIB também teve consequências funcionais, resultando em uma depressão de correntes excitatórias pós-sinápticas (EPSC) e uma diminuição na frequência e amplitude de correntes excitatórias pós-sinápticas nem miniatura -(mEPSC).

O desenrolamento de um cogumelo em filopódio pode ser uma consequência mais grave da perda de tensão superficial na cabeça do espinho, o que sugere que a atividade da miosina não está contribuindo diretamente para o alongamento do filamento

de actina, mas é importante para estabelecer um equilíbrio entre filamentos estáveis e instáveis dentro dos espinhos dendríticos.

Como um controle, a fim de investigar se a blebb causava algum dano à estrutura, realizamos a infusão da mesma 24 h antes do treino no hipocampo. Vimos então que ambos os grupos foram capazes de aprender a tarefa, sendo assim, não houve lesão na região estudada.

Sabemos que o armazenamento da memória passa por dois processos, a consolidação sináptica e a consolidação sistêmica. Na primeira, a memória ainda é mais dependente de hipocampo e posteriormente ela passa a ser mais dependente de regiões corticais. Geralmente as memórias que adentraram o processo de consolidação sistêmica são chamadas de memórias remotas e o córtex cingulado anterior é uma estrutura bastante relacionada com o processamento destas memórias (Frankland et al., 2004). Entretanto, Lesburguères e Bontempi (2011) verificaram que ainda durante o aprendizado o córtex começa um processo de marcação em estruturas responsáveis pela futura recuperação daquela memória, isto é, aquelas que serão necessárias após a consolidação sistêmica. Tendo isso em mente, quisemos investigar se o bloqueio de miosina IIB no hipocampo 39 dias após o treino ainda seria capaz de causar interferência em uma memória remota. Novamente, a blebb não foi capaz de alterar uma memória já consolidada sistemicamente, que agora dependia mais de regiões corticais do que hipocampo.

Unindo todos os achados, podemos afirmar que a miosina IIB é uma proteína fundamental nos processos relacionados à memória, principalmente sobre a sua manutenção. A sua inibição é capaz de prejudicar tanto a consolidação como a evocação da memória, não interferindo na memória de curta duração. O mais surpreendente, porém, é a atuação da miosina IIB mesmo após o fechamento da janela de consolidação, sendo capaz de modular diferentes tipos de memória sem a necessidade de sua labilização através de uma sessão de reativação. Estes resultados são de suma importância para esclarecer mecanismos envolvidos na manutenção de memórias de longa duração a fim de desenvolver fármacos com potencial terapêutico para patologias relacionadas à déficits em mecanismos de memórias.

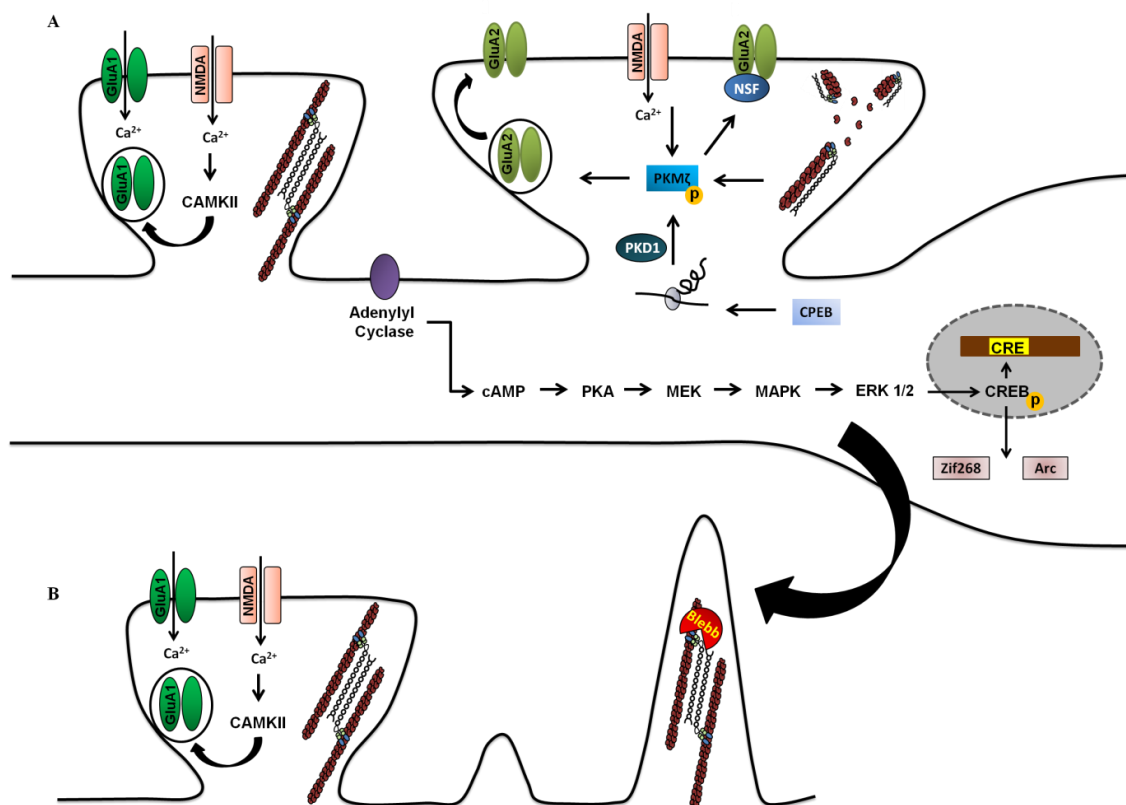


Figura 10. Hipótese molecular do mecanismo da miosina II na manutenção da memória.

A. A breve estimulação de alta frequência da via perfurante resulta na ativação de receptores glutamatergicos na célula pós-sináptica com consequente influxo de cálcio, que ativa a CAMKII. Esta cinase liga-se à subunidade GluN2B do NMDAR e fosforila as proteínas alvo na densidade pós-sináptica, incluindo o GluA1, aumentando o tráfego de AMPAR para a membrana. Há também uma síntese rápida de filamentos de actina em resposta à ativação sináptica de NMDAR. Se essa ativação persistir, outros mecanismos ocorrem para manter a ativação celular e a LTP tardia. Entre eles, a ativação da MAPK, que fosforila o CREB e induz a expressão de genes imediatos que acabam causando uma segunda onda de expressão gênica e síntese proteica. Há um aumento no tamanho relativo do pool estável de F-actina durante o aumento dendrítico das cabeças da coluna que dependem da miosina IIB. A polimerização da actina é crítica para a síntese da PKMζ, que é constitutivamente ativa quando fosforilada pela PKD1 e atua na translocação e estabilização do GluA2 para a membrana. O CPEB é uma proteína semelhante ao príon envolvida na marcação sináptica e essencial para a persistência da LTP na memória, sustentando a síntese proteica e a tradução de PKMζ. Ao todo, haverá um aumento na formação do espinho, com o aumento da cabeça em uma forma mais estável (cogumelo).

B. A blebbistatina bloqueia a atividade da ATPase da miosina IIB, não permitindo que o

fosfato seja liberado, o que afetará principalmente o *turnover* de actina para renovar os monômeros de G-actina livres para polimerizar a F-actina. Espinhos tipo cogumelo encolhem em espinhos tipo filopódio porque o bloqueio da atividade da miosina IIB não estabiliza o filamento de actina através do aumento da taxa de *treadmilling* do pool dinâmica de actina-F na superfície do espinho.

5. CONCLUSÕES

A miosina IIB é capaz de promover força e tração nos espinhos dendríticos e assim, remodela-los. Já vimos que eles são fortes candidatos para serem substratos da memória e aprendizado e por isso várias síndromes e transtornos onde o acometido apresenta algum retardo ou déficit cognitivo estão associadas à má-formação ou desenvolvimento dos espinhos. Por isso o foco do nosso projeto foi estudar mais a fundo o papel da miosina IIB em diversas fases da memória nos atendo principalmente ao período pós-janela de consolidação, onde eventos para que a memória de longa-duração persista estão acontecendo. Ressaltamos então, que:

- A miosina IIB é necessária para a formação da memória de longa duração, porém sua inibição não afeta a memória de curta duração;
- A miosina IIB também é importante para a expressão da memória de medo pois sua inibição antes da reativação causou prejuízos evocação;
- O bloqueio de miosina IIB no hipocampo foi capaz de prejudicar a persistência da memória mesmo após a janela de consolidação e este efeito foi independente de uma sessão de reativação.
- A infusão de blebb no hipocampo 1 dia antes do treino não prejudicou o aprendizado do condicionamento aversivo ao contexto, comprovando assim que este fármaco não lesionou a região estudada;
- A miosina IIB não é mais necessária no hipocampo quando a memória já foi consolidada sistemicamente;
- O efeito do bloqueio da miosina IIB sobre a persistência da memória não foi específico ao último aprendizado, prejudicando também um treino em um contexto diferente feito previamente;

- O inibidor também prejudicou uma memória aversiva quando procedida por uma sessão de extinção, sem apresentar recuperação espontânea;
- Os resultados também foram replicados por diferentes tipos de memórias, onde a miosina IIB parece ser crucial na manutenção da memória independentemente da estrutura encefálica responsável e aversividade da tarefa;
- Paralelamente, tais resultados embasarão o estabelecimento de estratégias experimentais mais apropriadas do que as atualmente disponíveis para tratar aspectos-chave de transtornos relacionados à memória, possibilitando subsídios para o desenvolvimento de uma nova estratégia terapêutica, principalmente por seu efeito persistente e manipulável mesmo fora da janela de consolidação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberini, C. M. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? **Trends of Neuroscience**, v. 28, n. 1, p. 51-6, 2005.
- Alvarez, P.; Squire, L.R; Memory consolidation and the medial temporal lobe: a simple network model. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 15, p. 7041-7045, 1994.
- Amaral, D. G.; Witter, M. P. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. **Neuroscience**, v. 31, n. 3, p. 571-91, 1989.
- Bekinschtein, P.; Cammarota, M.; Igaz, L.M.; Bevilaqua, L.R.; Izquierdo, I.; Medina, J.H.; Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. **Neuron**, v. 53, n. 2, p. 261-77, 2007.
- Bekinschtein, P., Katche, C., Slipczuk, L., Gonzalez, C., Dorman, G., Cammarota, M., Izquierdo, I., Medina, J.H. Persistence of Long-Term Memory Storage: New Insights into its Molecular Signatures in the Hippocampus and Related Structures. **Neurotoxicity Research.**, v. 18, p. 377-85, 2010.
- Bliss, T. V.; Lomo, T. Plasticity in a monosynaptic cortical pathway. **Journal of Physiology**, v. 207, n. 2, p. 61, 1970.
- Bliss, T. V.; Lomo, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. **Journal of Physiology**, v. 232, n. 2, p. 331-56, 1973.
- Briggs, S.B., Blouin, A.M., Young, E.J., Rumbaugh, G., Miller, C.A. Memory disrupting effects of nonmuscle myosin II inhibition depend on the class of abused drug and brain region. **Learning & Memory**, v. 24, p. 70-75, 2017.
- Barry, J.M., Rivard, B., Fox, S.E., Fenton, A.A., Sacktor, T.C., Muller, R.U. Inhibition of protein kinase M ζ disrupts the stable spatial discharge of hippocampal place cells in a familiar environment. **The Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 40, p. 13753-13762, 2012.
- Cammarota, M.; Bevilaqua, L.; Barros, D.M.; Vianna, M.R.; Izquierdo, L.A.; Medina, J.H., Izquierdo, I. Retrieval and the extinction of memory. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 25, n. 3-4, p. 465-74, 2005.

- Dudai, Y. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? **Annual Reviews of Psychology**, v. 55, p. 51-86, 2004.
- Debiec, J.; LeDoux, J. E.; Nader, K. Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. **Neuron**, v. 36, n. 3, p. 527-38, 2002.
- Duvarci, S.; Nader, K. Characterization of fear memory reconsolidation. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 42, p. 9269-75, 2004.
- Frankland, P.W., Bontempi, B., Talton, L.E., Kaczmarek, L., Silva, A.J. The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. **Science**, v. 304, n. 5672, p. 881-883, 2004.
- Gavin, C.F., Rubio, M.D., Young, E., Miller, C., Rumbaugh, G. Myosin II motor activity in the lateral amygdala is required for fear memory consolidation. **Learning & Memory**, v. 19, p. 9-14, 2012.
- Hardt, O., Migues, P.V., Hastings, M., Wong, J., Nader, K. PKMzeta maintains 1-day- and 6-day-old long-term object location but not object identity memory in dorsal hippocampus. **Hippocampus**, v. 20, n. 6, p. 691-695, 2010
- Hardt, O., Nadel, L. Systems consolidation revisited, but not revised: the promise and limits of optogenetics in the study of memory. **Neuroscience Letters**, v. 680, p. 54-59, 2018.
- Hyman, C.; Hofer, M.; Barde, Y.; Juhasz, M.; Yancopoulos, G. D.; Squinto, S. P.; Lindsay, R. M. BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. **Nature**, v. 350, p. 230-232, 1991.
- Haubrich, J., Nader, K. Memory reconsolidation. **Behavioral Neuroscience of Learning and Memory**, p. 151-176, 2016.
- Hebb, D. O. **The organization of behavior**. New York: Wiley, 1949.
- Hlushchenko, I., Koskinen, M., Hotulainen, P. Dendritic spine actin dynamics in neuronal maturation and synaptic plasticity. **Cytoskeleton**, v. 73, p. 435-441, 2016.
- Hering, H., Sheng, M. Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, p. 880-888, 2001.
- Inda, M. C.; Muravieva, E. V.; Alberini, C. M. Memory retrieval and the passage of time: from reconsolidation and strengthening to extinction. **The Journal of the Neuroscience**, v. 31, n. 5, p. 1635-43, 2011.
- Irwin, S.A., Galvez, R., Greenough, W.T. Dendritic spine structural anomalies in fragile-x mental retardation syndrome. **Cerebral Cortex**, v. 10, n. 10, p. 1038-1044, 2000.

- Kandel, E. R., Dudai, Y., & Mayford, M. R.. The molecular and systems biology of memory. **Cell**, v. 157, n. 1, p. 163-186, 2014.
- Kandel, E. R. The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2 and CPEB. **Molecular Brain**, p. 5-14, 2012.
- Kasai, H.; Matsuzaki, M.; Noguchi, J.; Yasumatsu, N.; Nakahara, H. Structure-stability-function relationships of dendritic spines. **Trends Neuroscience**. 26(7):360-8. 2003.
- Kelly, M.T., Yao, Y., Sondhi, R., Sacktor, T.C. Actin polymerization regulates the synthesis of PKM ζ in LTP. **Neuropharmacology**, v. 52, p. 41-45, 2007.
- Kitamura, T., Ogawa, S.K., Roy, D.S., Okuyama, T., Morrissey, M.D., Smith, L.M., Redondo, R.L., Tonegawa, S. Engrams and circuits crucial for systems consolidation of a memory. **Science**, v. 356, n. 6333, p. 73-78, 2017.
- Kragel, J.E.; Ezzyat, Y.; Sperling, M.R.; Gorniak, R.; Worrell, G.A.; Berry, B.M.; Inman, C.; Lin, J.J.; Davis, K.A.; Das, S.R.; Stein, J.M.; Jobst, B.C.; Zaghoul, K.A.; Sheth, S.A., Rizzuto D.S.; Kahana, M.J. Similar patterns of neural activity predict memory function during encoding and retrieval. **Neuroimage**. 15;155:60-71. 2017.
- Kneussel M, Wagner W. Myosin motors at neural synapses: drivers of membrane transport and actin dynamics. **Nature Reviews: Neuroscience**, v. 14, p. 233-247, 2013.
- Kóvacs, M., Tóth, J., Hetényi, C., Málnási-Csizmadia, A., Seller, J.R. Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 34, p. 35557-35563, 2004.
- Koskinen M, Bertling E, Hotulainen R, Tanhuanpää K, Hotulainen P. Myosin IIb controls actin dynamics underlying the dendritic spine maturation. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 61, p. 56-64, 2014.
- Lee, J. L.; Everitt, B. J.; Thomas, K. L. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. **Science**, v. 304, n. 5672, p. 839-43, 2004.
- Leuner, B.; Gould, E. Structural plasticity and hippocampal function. **Annual Review of Psychology**, v. 61, p. 111-40, C1-3, 2010.
- Lynch, M. A. Long-term potentiation and memory. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 1, p. 87-136, 2004.

- Lynch, G. S., Dunwiddie, T., and Gribkoff, V. Heterosynaptic depression: a postsynaptic correlate of long-term potentiation. **Nature**, v. 266, p. 737–739, 1977.
- Lee, S., Zhang, H., Webb, D.J. Dendritic spine morphology and dynamics in health and disease. **Cell Health and Cytoskeleton**, v. 7, p. 121-131, 2015.
- Lesburguères, E.; Bontempi, B. Making our memories last: the necessity of an early neocortical tagging process. **Medicine Sciences**. 27(12):1048-50. 2011.
- Medina, J. H., Bekinschtein, P., Cammarota, M. and Izquierdo, I. Do memories consolidate to persist or do they persist to consolidate?. **Behavioural Brain Research**, v. 192, p. 61–69, 2008.
- Marr, D. Simple memory: a theory for archicortex, *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B Biol. Science*, v. 262, p. 23 – 81, 1971.
- Mei, F., Nagappan, G., Ke, Y., Saktor, T., Lu, B. BDNF facilitates L-LTP maintenance in the absence of protein synthesis through PKM ζ . **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. 1-7, 2011.
- Migues, P.V.; Hardt, O.; Wu, D.C.; Gamache, K.; Sacktor, T.C.; Wang, Y.T.; Nader, K. PKMzeta maintains memories by regulating GluR2-dependent AMPA receptor trafficking. **Nature Neuroscience**, v. 13, n. 5, p. 630-634, 2010.
- Migues, P.V.; Hardt, O.; Finnie, P.; Wang, Y.W.; Nader, K. The maintenance of long-term memory in the hippocampus depends on the interaction between N-ethylmaleimide-sensitive factor and GluA2. **Hippocampus**, v. 24, n. 9, p. 1112-1119, 2014.
- Milekic, M. H.; Alberini, C. M. Temporally graded requirement for protein synthesis following memory reactivation. **Neuron**, v. 36, n. 3, p. 521-5, 2002.
- Markram, H.; Gerstner, w.; Sjöström, P. J. A history of spike-timing dependent plasticity. **Frontiers in Neuroscience**, v. 3, n. 4, p. 11-34, 2011.
- McNaughton, B. L.; Barnes, C.A.; Meltzer, J.; Sutherland, R. J. Hippocampal granule cells are necessary for normal spatial learning but not for spatially-selective pyramidal cell discharge. **Experimental Brain Research**, v. 76, p. 485-496, 1989.
- Mantzur, L., Joels, G., Lamprecht, R. Actin polymerization in lateral amygdala is essential for fear memory formation. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 91, p. 85-88, 2009.
- Nadel, L.; Samsonovich, A.; Ryan, L.; Moscovitch, M. Multiple trace theory of human

- memory: computational, neuroimaging, and neuropsychological results. **Hippocampus**, v. 10, p. 352 – 368, 2000.
- Nader, K.; Hardt, O.; Wang, S. H. Response to Alberini: right answer, wrong question. **Trends of Neuroscience**, v. 28, n. 7, p. 346-7, 2005.
- Nader, K.; Hardt, O. A single standard for memory: the case for reconsolidation. **Nature Reviews: Neuroscience**, v. 10, n. 3, p. 224-34, 2009.
- Nader, K.; Einarsson, E. O. Memory reconsolidation: an update. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1191, p. 27-41, 2010.
- Nader, K. Reconsolidation and the Dynamic Nature of Memory. **Cold Spring Harbor Perspective Biology**. v. 7, n. 10, 2015.
- Pascual-Leone, A., Amedi, A., Fregni, F. and Merabet, L.B.. et al. The plastic human brain cortex. **Annual Review Neuroscience**, v. 28, p. 377-401, 2005.
- Pastalkova E.; Serrano, P.; Pinkhasova, D.; Wallace, E.; Fenton, A.A.; Sacktor, T.C. Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. **Science**. v. 25, n. 313, i. 5790, p. 1141-1144, 2006.
- Rossato, J.I., Bevilaqua, L.R.M., Izquierdo, I., Medina, J.H. and Cammarota, M. Dopamine Controls Persistence of Long-Term Memory Storage. **Science**, v. 325, p. 1017-1020, 2009.
- Rossato, J.I.; Bevilaqua, L.R.; Izquierdo, I.; Medina, J.H.; Cammarota, M. Retrieval induces reconsolidation of fear extinction memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 107, n. 50, p. 21801-5, 2010.
- Rex CS, Gavin CF, Rubio MD, Kramar EA, Chen LY, Jia Y, Huganir RL, Muzyczka N, Gall CM, Miller CA, Lynch G, Rumbaugh G. Myosin IIB regulates actin dynamics during synaptic plasticity and memory formation. **Neuron**, v. 67, n. 4, p. 603–617, 2010.
- Rubio MD, Johnson R, Miller CA, Huganir RL, Rumbaugh G. Regulation of synapse structure and function by distinct myosin II motors. **The Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 4, p. 1448-1460, 2011.
- Ryu, J; Liu, L; Wong, TP; Wu, DC; Burette, A; Weinberg, R; Wang, YT; Sheng, M. A critical role for Myosin IIB in dendritic spine morphology and synaptic function. **Neuron**, v. 49, p. 175-182, 2006.
- Rauscher, A.A., Gyimesi, M., Kovács, M., Málnási-Csizmadia, A. Targeting myosin by

- blebbistatin derivatives: optimization and pharmacological potential. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 43, n. 9, p. 700-713, 2018.
- Saktor, T.C. PKM ζ , LTP maintenance, and the dynamic molecular biology of memory storage. **Essence of memory**, chapter 2, p. 27-40, 2008.
- Si, K., Kandel, E.R. The role of functional prion-like proteins in the persistence of memory. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, p. 1-18, 2016.
- Straight, A.F., Cheung, A., Limouze, J., Chen, I., Westwood, N.J., Sellers, J.R., Mitchison, T.J. Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II inhibitor. **Science**, v. 299, n. 5613, p. 1743-1747, 2003.
- Squire, L.R. Declarative and non-declarative memory: multiple brain systems supporting learning and memory. **Journal of Cognitive Neuroscience**, v. 4, n. 3, 1992.
- Squire, L.R. and Zola S.M. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 13515-13522, 1996.
- Squire, L. R.; Kandel, E. R. **Memory: From the mind to molecules**. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- Squire, L.R. The legacy of Patient H.M for Neuroscience. **Neuron**, v. 61, n. 1, p. 6-9, 2009.
- Scoville, W. B., & Milner, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. **Journal of Neurology and Neurosurgery Psychiatry**, v. 20, n. 1, p. 11-21, 1957.
- Stent, G. S. A physiological mechanism for Hebb's postulate of learning. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 70, p. 997-1001, 1973.
- Thompson, R. F. & Langford, G. M. Myosin superfamily evolutionary history. **The Anatomical Record**, v. 268, p. 276-289, 2002.
- Vicente-Manzanares, M., Ma, X.; Adelstein, R.S.; Horwitz, A.R. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**. v. 10, n. 11, p. 778-90, 2009.
- Witter, M.P.; Griffioen, A.W.; Jorritsma-Byham, B.; Krijnen, J.L.M. Entorhinal projections to the hippocampal CA1 region in the rat: an underestimated pathway. **Neuroscience Letters**, v. 85, p. 193-198, 1988.
- Xu, X., Miller, E.C., Pozzo-Miller, L. Dendritic spine dysgenesis in Rett syndrome. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 8, n. 97, 1-8, 2014.

- Yang, C.; Liu, J.F., Chai, B.S.; Fang, Q; Chai, N.; Zhao, L.Y.; Xue, Y.X.; Luo, Y.X.; Jian, M.; Han, Y.; Shi, H.S.; Lu, L.; Wu, P.; Wang, J.S. Stress within a restricted time window selectively affects the persistence of long-term memory. **PLoS One**. 2013.
- Young, E.J., Blouin, A.M., Briggs, S.B., Sullivan, S.E., Lin, L., Cameron, M.D., Rumbaugh, G., Miller, C.A. Nonmuscle myosin IIB as a therapeutic target for the prevention of relapse to metamphetamine use. **Molecular Psychiatry**, v. 21, n. 5, p. 615-623, 2016.
- Yehuda, R.; Joëls, M.; Morris, R.G. The memory paradox. **Nature Reviews: Neuroscience**. v. 11, n. 12, p. 837-9, 2010.
- Young, E.J., Aceti, M., Griggs, Fuchs, R.A., Zigmond, Z., Rumbaugh, G., Miller, C.A. Selective, retrieval-independent disruption of metamphetamine-associated memory by actin depolymerization. **Biological Psychiatry**, v. 75, n. 2, p. 96-104, 2014.
- Young, E.J., Briggs, S.B., Rumbaugh, G., Miller, C.A. Nonmuscle myosin II inhibition disrupts methamphetamine-associated memory in females and adolescents. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 16, p. 30281-30287, 2017.
- Zhao, F., Padrón, R., Craig, R. Blebbistatin stabilizes the helical order of myosin filaments by promoting the switch 2 closed state. **Biophysical Journal**, v. 95, p. 3322-3329.

APÊNDICE

Labirinto Aquático de Morris (*Morris Water Maze*):

Utilizamos uma piscina circular preenchida com água (19-21°C). Nas sessões de treino e aprendizado reverso havia uma plataforma (10 cm de diâmetro) submersa 0.5 cm da superfície da água, no centro de um dos quadrantes da piscina (N, S, L, O). Os animais tinham que encontrar a plataforma através de pistas visuais presentes nas paredes da sala experimental. Os ratos foram submetidos a uma sessão de treino por dia, durante 5 dias consecutivos com 8 tentativas em cada sessão (a plataforma permanecia no mesmo local). Cada tentativa iniciava-se quando colocávamos os animais na piscina, virados para a parede, a partir de um dos 8 pontos de referência possíveis. A ordem desses pontos de início variava aleatoriamente durante as sessões de treino. Cada tentativa chegava ao fim quando o animal achava a plataforma ou depois de 60 segundos (tempo total de cada tentativa). Se o animal falhasse em localizar a plataforma eles eram guiados gentilmente até ela e permaneciam ali durante 20 segundos. No sétimo dia (um dia depois da infusão da blebbistatina) os animais passaram por uma sessão de teste de 1 minuto onde não havia plataforma. A latência para encontrar a plataforma em cada tentativa foi quantificada e o aprendizado foi medido através da comparação entre o tempo médio para das sessões entre os dias. Na sessão de teste, a memória foi medida pelo tempo passado em cada quadrante (onde a plataforma estava localizada nas sessões de treino).

Aprendizado Reverso: Um dia depois da primeira sessão de teste, iniciamos o protocolo de aprendizado reverso. Os ratos foram então submetidos a 4 dias consecutivos de treino, cada sessão apresentando 4 tentativas. Nelas, a plataforma estava localizada numa posição oposta àquela das sessões de treino iniciais e não era movida. Finalmente, após os quatro dias, uma última sessão de teste de 1 minuto ocorreu (sem a presença da plataforma).

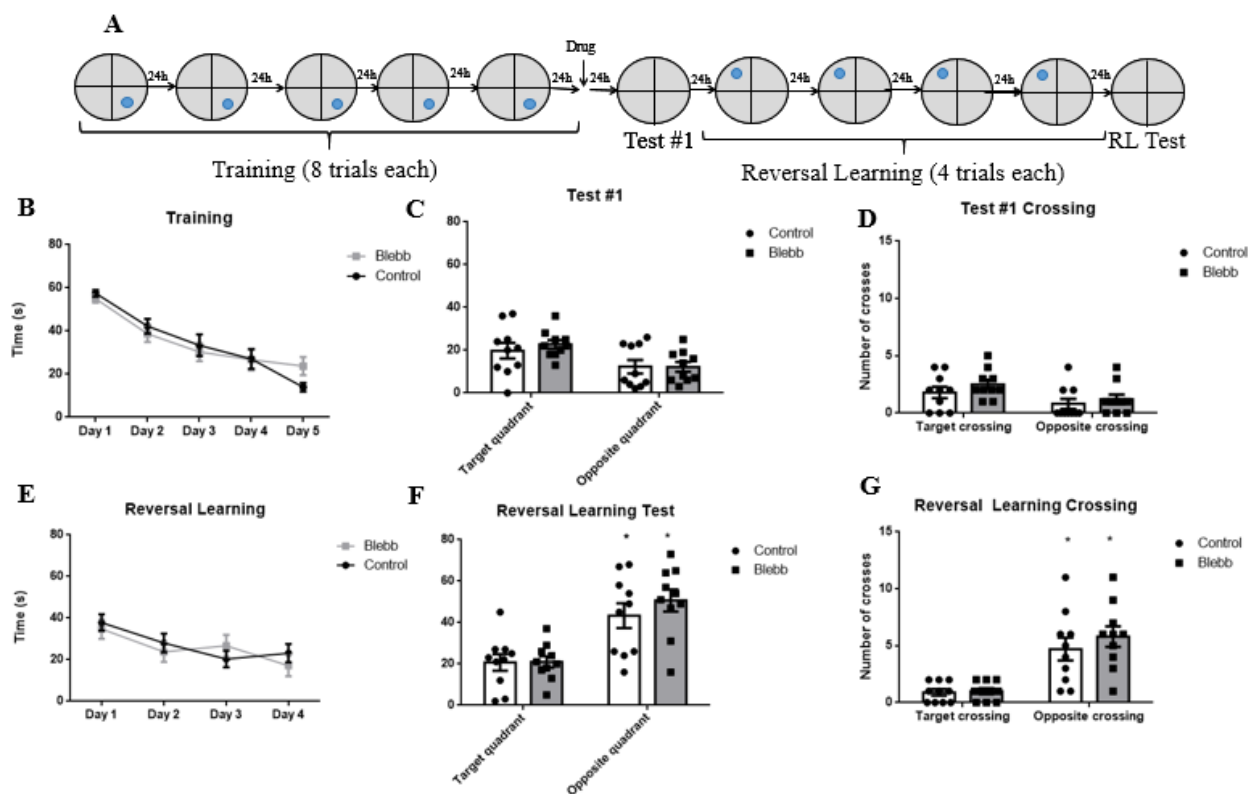


Figure 1. **A.** Desenho experimental do nosso experimento no labirinto aquático de Morris. Infundimos o inibidor da miosina IIB no hipocampo 1 dia depois da última sessão de treino. **B.** Curva de aprendizagem ao longo dos dias no labirinto aquático. ANOVA de duas vias de medidas repetidas (Interação $P=0.0791$; Dia $P<0.0001$; Tratamento $P=0.9891$) seguido de post hoc de Bonferroni. **C.** Média de tempo passado nas plataformas alvo e oposta na primeira sessão de teste no grupo controle e blebbistatina. ANOVA de duas vias (Interação $P=0.6007$; Quadrante $P<0.0031$; Tratamento $P=0.6251$) seguido de post hoc de Bonferroni. **D.** Número de vezes em que os animais cruzavam o local onde se encontrava a plataforma na primeira sessão de teste (Interação $P=0.7344$; Cruzamentos $P=0.0128$; Tratamento $P=0.2181$) seguido de post hoc de Bonferroni. **E.** Curva de aprendizagem entre as tentativas do treino de aprendizagem reversa. ANOVA de duas vias de medidas repetidas (Interação $P=0.1157$; Dia $P<0.0001$; Tratamento $P=0.7589$) seguido de post hoc de Bonferroni. **F.** Média de tempo passado nas plataformas alvo e oposta na sessão de teste do aprendizado reverso, nos grupos controle e blebbistatina. ANOVA de duas vias (Interação $P=0.4542$; Quadrante $P<0.0001$; Tratamento $P=0.4173$) seguido de post hoc de Bonferroni. **G.** Número de vezes em que os animais cruzavam o local onde se encontrava a plataforma na sessão de teste do aprendizado reverso (Interação

$P=0.4824$; Cruzamentos $P<0.0001$; Tratamento $P=0.3999$) seguido de post hoc de Bonferroni. Os resultados estão apresentados como média \pm EPM.



U F R G S
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 33025

Título: EFEITOS DA MODULAÇÃO DOS ESPINHOS DENDRÍTICOS SOBRE DIFERENTES FASES DE PROCESSAMENTO DA MEMÓRIA

Vigência: 01/06/2017 à 03/03/2019

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

LUCAS DE OLIVEIRA ALVARES - coordenador desde 01/06/2017

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 22/05/2017 - SALA 330 DO ANEXO I DO PRÉDIO DA REITORIA - CAMPUS CENTRO, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 1002 ratos wistar, machos, de 60 dias e pesando entre 250 e 300g, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL); de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 2 de Junho de 2017

MARCELO MELLER ALIEVI
Coordenador da comissão de ética