

ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GERONTOLOGIA BIOMÉDICA
MESTRADO EM GERONTOLOGIA BIOMÉDICA

LUCAS ASCHIDAMINI MARCONDES

**ESTUDO DOS MECANISMOS MOLECULARES DA PERSISTÊNCIA DA MEMÓRIA DE
MEDO: PAPEL DA PKMzeta E DOS RECEPTORES AMPA CONTENDO A
SUBUNIDADE GluA2**

Porto Alegre
2021

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GERONTOLOGIA BIOMÉDICA

LUCAS ASCHIDAMINI MARCONDES

**ESTUDO DOS MECANISMOS MOLECULARES DA PERSISTÊNCIA DA
MEMÓRIA DE MEDO: PAPEL DA PKMzeta E DOS RECEPTORES AMPA
CONTENDO A SUBUNIDADE GluA2**

Porto Alegre

2021

LUCAS ASCHIDAMINI MARCONDES

**ESTUDO DOS MECANISMOS MOLECULARES DA PERSISTÊNCIA DA
MEMÓRIA DE MEDO: PAPEL DA PKMzeta E DOS RECEPTORES AMPA
CONTENDO A SUBUNIDADE GluA2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica da Escola de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Gerontologia Biomédica.

Linha de Pesquisa: Aspectos biológicos no envelhecimento

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Regina Guerino Furini

Porto Alegre

2021

Ficha Catalográfica

M321e Marcondes, Lucas Aschidamini

Estudo dos mecanismos moleculares da persistência da memória de medo :
Papel da PKMzeta e dos receptores AMPA contendo a subunidade GluA2 / Lucas
Aschidamini Marcondes. – 2021.

84.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Gerontologia
Biomédica, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Regina Guerino Furini.

1. Memória. 2. Medo condicionado ao contexto. 3. Manutenção. 4. PKMzeta. 5.
Córtex pré-frontal. I. Furini, Cristiane Regina Guerino. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Bibliotecária responsável: Clarissa Jesinska Selbach CRB-10/2051

LUCAS ASCHIDAMINI MARCONDES

**ESTUDO DOS MECANISMOS MOLECULARES DA PERSISTÊNCIA DA
MEMÓRIA DE MEDO: PAPEL DA PKMzeta E DOS RECEPTORES AMPA
CONTENDO A SUBUNIDADE GluA2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica da Escola de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Gerontologia Biomédica.

Linha de Pesquisa: Aspectos biológicos no envelhecimento

Aprovada em 31 de agosto de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Cristiane R. G. Furini – PUCRS (Orientadora)

Prof. Dr. Daniel Marinowic – PUCRS

Prof^a. Dr^a. Nadja Schröder – UFRGS

Porto Alegre

2021

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, José Enio e Eloide, por estarem sempre ao meu lado, mesmo quando longe, pelo apoio incondicional, por sempre acreditarem em mim e, principalmente, pelo amor sem medidas. Vocês são a razão das minhas conquistas e de eu ser quem eu sou. Vocês me ensinam o que há de mais importante na vida e são meus maiores exemplos. Tenho muito orgulho de, ao olhar para meu interior, enxergar vocês em mim. Muito obrigado, mãe, e muito obrigado, pai, por tudo. Amo muito vocês!

Ao eterno Mestre, Ivan Izquierdo, por ter aberto as portas do Centro de Memória para mim e, assim, também, as portas da Ciência. A sua inteligência e sua humildade são exemplos que sempre carregarei, e sua obra é fonte inesgotável de inspiração. Persistirá para sempre em minha memória. Muito obrigado!

À minha querida orientadora Cristiane Furini, pela incansável dedicação, pelo comprometimento, pela paciência, por estar sempre disposta a ensinar, pelo apoio e pela confiança. Nossa parceria remonta a vários anos atrás e espero que siga por muito tempo ainda. Obrigado!

À professora Jociane Myskiw, por ter me recebido de volta no Centro de Memória e pela participação fundamental em minha jornada, obrigado!

Aos colegas e amigos do Centro de Memória com quem tive o prazer de conviver ao longo dos anos e que tornam este lugar ainda mais especial, obrigado!

Ao meu namorado e melhor amigo, Lucas, por estar sempre ao meu lado, pelo companheirismo de tantos anos, pelo apoio constante, por me fazer acreditar em mim, por ser meu porto seguro. Obrigado por partilhar das belezas e angústias da vida comigo, te amo!

Ao Dobby e à Pandora, que me trazem alegria todos os dias!

Aos professores que contribuíram de forma positiva para meu crescimento profissional e pessoal, obrigado!

Aos professores que compõem a banca examinadora, pela disposição em contribuir com seu tempo e conhecimento, obrigado!

À PUCRS e ao Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica por me proporcionarem excelente infraestrutura para o desenvolvimento deste trabalho.

À CAPES (código do financiamento 001) pelo financiamento da minha bolsa.

A todos que, de alguma forma, me ajudaram a chegar até aqui, obrigado!

Resumo

O envelhecimento se caracteriza pelo declínio das funções orgânicas e cognitivas, e, dentre elas, da memória. Algumas memórias são efêmeras e duram poucos instantes, enquanto outras permanecem enraizadas por toda a vida. Enquanto os mecanismos envolvidos na consolidação da memória já foram mais bem explorados, os processos moleculares responsáveis por sua persistência permanecem incertos. A proteína cinase M ζ (PKM ζ) é uma enzima persistentemente ativa, cuja atividade autônoma é responsável pela manutenção da potenciação de longa duração (LTP), um modelo celular de aprendizagem e memória, e também pela persistência de diferentes memórias, através da inibição da endocitose de receptores de glutamato do tipo α -amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropionato (AMPA) contendo a subunidade GluA2. A memória de medo condicionado ao contexto (MCC) possui grande importância adaptativa para a sobrevivência e, por este motivo, caracteriza-se por seu armazenamento duradouro. Esta forma de aprendizagem recruta diversos circuitos neuronais, dentre eles, o córtex pré-límbico (PrL). No intuito de caracterizar os mecanismos moleculares envolvidos na persistência da memória de MCC, este estudo se propõe a investigar o envolvimento, neste processo, da PKM ζ e dos receptores AMPA contendo a subunidade GluA2, bem como sua interação, no PrL, utilizando-se de um modelo experimental de roedores. Para isso, treinamos ratos em um paradigma de MCC e administramos no PrL um inibidor da enzima PKM ζ , ZIP (10 nmol/lado), um inibidor da endocitose de receptores AMPA que contém a subunidade GluA2, GluA2_{3Y} (100 pmol/lado) ou o peptídeo inativo GluA2_{3Y(s)} (100 pmol/lado), dois ou vinte dias após o condicionamento, e avaliamos a retenção de memória de longa duração vinte e quatro horas depois. Assim, verificamos que as infusões de GluA2_{3Y} ou de GluA2_{3Y(s)} não afetaram a manutenção das memórias recente ou remota de MCC. Além disso, a inibição da PKM ζ no PrL não prejudicou a manutenção da memória recente de MCC. Entretanto, a inibição da PKM ζ , vinte dias após o treino, prejudicou a retenção da memória de MCC no teste de memória remota. Este prejuízo foi bloqueado pela administração simultânea de GluA2_{3Y}, mas não de GluA2_{3Y(s)}. Os resultados obtidos sugerem que a PKM ζ não é requerida, no PrL, para a manutenção da memória recente de MCC, e que a inibição aguda da endocitose de receptores AMPA contendo a subunidade GluA2 não afeta

a manutenção da memória recente nem remota de MCC. Por outro lado, a PKM ζ é essencial para garantir a persistência da memória remota de MCC, e ela o faz através do bloqueio da internalização de receptores AMPA contendo a subunidade GluA2 no PrL. Este trabalho confirma o papel crucial do PrL nas memórias de medo e contribui para o entendimento dos mecanismos moleculares responsáveis pela persistência das memórias.

Palavras-chave: Memória, Medo Condicionado ao Contexto, Manutenção, Persistência, PKMzeta, GluA2, Córtex Pré-frontal.

Abstract

Ageing is characterized by the decline of organic and cognitive functions, and among them, of memory. While some memories are ephemeral and last only for few moments, others remain deeply rooted during a lifetime. The mechanisms underlying memory consolidation have been relatively well explored. However, the molecular mechanisms underlying the persistence of long-term memory storage remain elusive. Protein kinase M ζ (PKM ζ) is a persistently active, and its autonomous activity underlies the maintenance of long-term potentiation (LTP), a cellular model of learning and memory, and also the storage of different types of memory. PKM ζ exerts its actions by inhibiting the endocytosis of GluA2-containing α -amino-3-hydroxy-methyl-5-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors. Contextual fear conditioning (CFC) memory is a form of learning with high adaptive value due to its importance for survival, and because of that, is characterized by prolonged retention. This memory recruits many neuronal circuits, among them the prelimbic cortex (PrL). In order to characterize the molecular mechanisms underlying CFC memory persistence, this study aims to investigate the involvement, in this process, of PKM ζ and GluA2-containing AMPA receptors, as well as their interaction, in the PrL, utilizing a rodent experimental model. For this purpose, we trained rats in a CFC paradigm and administered in the PrL infusions of ZIP (Zeta Inhibitory Peptide, 10 nmol per side), a PKM ζ inhibitor, GluA2_{3Y} (100 pmol per side), a GluA2-dependent AMPA receptor endocytosis inhibitor or GluA2_{3Y(s)}, a scrambled control peptide, two or twenty days after conditioning, and evaluated long-term memory retention twenty-four hours later. We verified that infusion of GluA2_{3Y} or GluA2_{3Y(s)} did not affect the maintenance of recent or remote CFC memory. Besides that, PKM ζ inhibition in the PrL did not impair the maintenance of recent CFC memory. However, PKM ζ inhibition twenty days after training impaired remote CFC memory retention. This impairment was prevented by the infusion of GluA2_{3Y}, but not of GluA2_{3Y(s)}. These results suggest that PKM ζ is not required in the PrL for the maintenance of recent CFC memory. Also, acute inhibition of GluA2-containing AMPA receptor endocytosis does not affect recent or remote CFC memory maintenance. However, PKM ζ is essential to ensure the maintenance of remote CFC memory, and it does so by preventing prelimbic GluA2-dependent AMPA receptor internalization. This work confirms a

crucial role for PrL in fear memory and also contributes for the understanding of the molecular mechanisms underlying memory persistence.

Keywords: Memory, Contextual Fear Conditioning, Maintenance, Persistence, PKMzeta, GluA2, Prefrontal Cortex.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da localização do córtex pré-límbico...	22
Figura 2 - Formação da PKMζ a partir de um promotor interno no gene PRKCZ..	28
Figura 3 - Resumo dos mecanismos de ação da PKMζ sobre a potenciação sináptica.....	30
Figura 4 - Esquema experimental para memória recente.....	39
Figura 5 - Esquema experimental para memória remota.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação dos fármacos utilizados nas infusões.....	38
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 ENVELHECIMENTO	17
2.2 MEMÓRIA	18
2.2.1 Memória de medo	20
2.2.2 Mecanismos de formação de memórias	23
2.2.3 Mecanismos de persistência da memória	27
3.1 OBJETIVO GERAL	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4 MÉTODO	37
4.1 DELINEAMENTO	37
4.2 ANIMAIS	37
4.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA	37
4.4 MANIPULAÇÃO DOS ANIMAIS	37
4.5 MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO	38
4.6 INTERVENÇÕES FARMACOLÓGICAS	38
4.7 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	39
4.7.1 Memória recente	39
4.7.2 Memória remota	39
4.8 AVALIAÇÃO DO POSICIONAMENTO DAS CÂNULAS	40
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
5 ARTIGO	41
6 CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
ANEXO A	81
ANEXO B	82
ANEXO C	83

1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento é acompanhado por um declínio nas funções do organismo (LÓPEZ-OTÍN *et al.*, 2013), dentre elas, a função cognitiva (BISHOP, LU & YANKNER., 2010). A memória, que se caracteriza pela aquisição e armazenamento de informações (IZQUIERDO, 2014; KANDEL *et al.*, 2014), é uma das habilidades cognitivas afetadas pelo envelhecimento. O declínio de memória, no entanto, não é característica homogênea entre os idosos, de modo que, enquanto parte deles apresenta prejuízos em relação aos adultos, outros permanecem com esta habilidade preservada (MORRISON & BAXTER, 2012).

Da mesma forma, enquanto algumas memórias são efêmeras e evanescem em alguns instantes, outras permanecem por toda vida. De fato, a característica mais emblemática da memória é, justamente, sua persistência (BEKINSCHTEIN *et al.*, 2007) e, no entanto, os mecanismos moleculares que controlam seu armazenamento permanecem incertos (ASOK *et al.*, 2019). Enquanto os eventos moleculares responsáveis pela aquisição e consolidação das memórias são relativamente bem descritos (IZQUIERDO & MEDINA, 1997; IZQUIERDO *et al.*, 2006), por se tratarem de cascatas bioquímicas transitórias, não explicam o armazenamento da memória (SACKTOR, 2011).

Sob essa óptica, uma das hipóteses postuladas para explicar o armazenamento da memória consiste na ativação de proteínas cinases persistentemente ativas (SACKTOR & FENTON, 2018). A PKM ζ é uma destas enzimas, que, por não possuir uma subunidade regulatória, uma vez ativada, ganha atividade autônoma e persistente (SACKTOR, 2011). A atividade desta enzima está envolvida na manutenção a longo prazo da plasticidade sináptica (LING *et al.*, 2002) e de diversas formas de memória (PASTALKOVA *et al.*, 2006; SERRANO *et al.*, 2008; SHEMA *et al.*, 2011; GAO *et al.*, 2018).

A memória de medo condicionado ao contexto (MCC) é uma forma de memória aversiva que, devido a sua relevância biológica e conteúdo emocional, é armazenada de forma extremamente duradoura (IZQUIERDO *et al.*, 2006; IZQUIERDO, FURINI & DE CARVALHO MYSKIW, 2016). Os circuitos responsáveis pela formação desta memória envolvem regiões como o hipocampo, a amígdala e o córtex pré-frontal (IZQUIERDO, FURINI & DE CARVALHO MYSKIW, 2016). O

córtex pré-límbico (PrL), uma subdivisão do córtex pré-frontal, é uma região crítica para o processamento das memórias de medo (GIUSTINO & MAREN, 2015; IZQUIERDO, FURINI & DE CARVALHO MYSKIW, 2016). Esta região está envolvida na aquisição, consolidação, armazenamento e expressão do medo condicionado (CORCORAN & QUIRK, 2007; GILMARTIN & HELMSTETTER, 2010; DO MONTE *et al.*, 2015; KITAMURA *et al.* 2017; DENARDO *et al.*, 2019).

Enquanto os mecanismos que regem a consolidação da memória de medo condicionado ao contexto foram intensamente estudados, as bases moleculares que subjazem sua persistência, em especial no PrL, permanecem incertas. Assim, este trabalho visa avaliar a participação da PKM ζ , dos receptores de glutamato do tipo AMPA que contêm a subunidade GluA2, e as interações entre ambos, na persistência da memória de MCC no PrL.

O entendimento dos mecanismos envolvidos na persistência da memória de medo é fundamental não apenas para aprofundar o conhecimento da fisiologia da memória, mas também para permitir a compreensão das bases biológicas de doenças neuropsiquiátricas que cursam com a expressão disfuncional de memórias aversivas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ENVELHECIMENTO

O envelhecimento pode ser definido, biologicamente, como o processo de declínio funcional através do tempo, que afeta a maioria dos organismos vivos e o qual envolve alterações moleculares, celulares e sistêmicas (LOPEZ-OTÍN *et al.*, 2013).

Do ponto de vista populacional, percebe-se que a estrutura demográfica está em um processo de reorganização, tanto no Brasil como no mundo, com redução na taxa de fecundidade, diminuição da mortalidade e consequente aumento da expectativa de vida (CLOSS & SCHWANKE, 2012). Projeções demográficas estimam uma população de mais de 30,1 milhões de pessoas acima dos 60 anos e mais de 4,4 milhões acima dos 80 anos no Brasil em 2020 (IBGE, 2018). Desta forma, os idosos compõe um contingente populacional expressivo (CLOSS & SCHWANKE, 2012), o que impõe a necessidade de se compreender os processos subjacentes ao envelhecimento.

Nesse contexto, o prejuízo cognitivo associado ao envelhecimento emerge como uma das grandes ameaças à saúde. A idade em si é o maior fator de risco para o declínio cognitivo e para demência (BISHOP, LU & YANKNER., 2010) e, mesmo na ausência de patologia, uma parcela dos idosos se caracteriza por perda cognitiva em relação a adultos (MORRISON & BAXTER, 2012).

Dentre os domínios cognitivos, a memória é particularmente afetada pelo envelhecimento, sendo que o maior declínio é percebido na memória episódica de longa duração e na memória de trabalho (NYBERG *et al.*, 2012). O processo de envelhecimento é caracterizado por mudanças estruturais e neurofisiológicas estereotípicas, como uma diminuição da integração funcional entre áreas responsáveis pelas funções cognitivas superiores, entre elas, áreas corticais, como o córtex pré-frontal medial (BISHOP, LU & YANKNER., 2010).

Os prejuízos funcionais relacionados ao envelhecimento são associados, majoritariamente, a alterações moleculares e estruturais sinápticas e celulares, sendo que a perda neuronal associada ao envelhecimento não se constitui uma característica preponderante (BURKE & BARNES, 2006; BISHOP, LU & YANKNER., 2010; MORRISON & BAXTER, 2012). Ainda que haja redução volumétrica

encefálica com o passar da idade na ausência de doença neurodegenerativa (SCAHILL *et al.*, 2003), a perda neuronal extensa - especialmente em regiões do lobo temporal medial - distingue o envelhecimento cognitivo normal do patológico, como visto na Doença de Alzheimer (WEST *et al.*, 1994; RODRIGUE & RAZ, 2004).

Além disso, as modificações morfológicas decorrentes do envelhecimento não ocorrem de forma homogênea em todo o encéfalo, mas localizadas e específicas para diferentes regiões (BURKE & BARNES, 2006). Por exemplo, a arborização dendrítica de algumas sub-regiões da formação hipocampal apresenta-se conservada, ou até mesmo aumentada, de forma compensatória, em humanos (BUELL & COLEMAN, 1979; FLOOD *et al.*, 1985) e em roedores (FLOOD, 1993). Por outro lado, neurônios do córtex pré-frontal apresentam maior vulnerabilidade aos efeitos do envelhecimento (BURKE & BARNES, 2006) e a arborização dendrítica de regiões do córtex pré-frontal diminui com a idade, tanto em roedores (MARKHAM & JURASKA, 2002), quanto em humanos (DE BRABANDER, KRAMERS & UYLINGS, 1998; UYLINGS & DE BRABANDER, 2002).

2.2 MEMÓRIA

A memória representa o armazenamento de informações adquiridas para posterior evocação (IZQUIERDO, 2014; KANDEL *et al.*, 2014). À aquisição de informações denomina-se aprendizagem, processo pelo qual as experiências são codificadas. Os processos de aprendizagem e memória são intimamente conectados, uma vez que apenas se podem armazenar informações sobre o que foi aprendido ou vivenciado (IZQUIERDO, 2014). As memórias são únicas para cada ser e, desta forma, constroem o cerne da identidade.

A memória pode ser classificada de diversas formas, dentre elas em relação à consciência de sua expressão e em relação ao curso temporal de armazenamento. No que tange à consciência de sua expressão, distinguem-se as memórias explícitas ou declarativas e as implícitas ou não-declarativas (SHACTER, 1992; SQUIRE *et al.*, 2004). A memória declarativa refere-se à capacidade de conscientemente recordar fatos e eventos, é flexível e permite a associação de múltiplos fragmentos de informação sob diferentes circunstâncias. Já as memórias não-declarativas manifestam-se geralmente de forma automática, com pouco processamento

consciente, expressam-se mais na forma de comportamento do que de recordação (SHACTER, 1992; SQUIRE *et al.*, 2004; IZQUIERDO, 2014; KANDEL *et al.*, 2014).

A memória declarativa, por sua vez, é subdividida em episódica e semântica. A memória episódica refere-se a eventos vivenciados pessoalmente, é autobiográfica, referenciada temporal e espacialmente e permite reviver mentalmente experiências passadas. A memória semântica, por outro lado, compreende os conhecimentos gerais sobre o mundo, engloba fatos e conceitos e não necessariamente possui referência no tempo e no espaço (TULVING, 1972; TULVING, 2002; KANDEL *et al.*, 2014).

As memórias não-declarativas, ou implícitas, referem-se aos comportamentos expressos com pouco processamento consciente. Dentre elas estão: a memória de procedimentos, que engloba habilidades motoras e os hábitos; o *priming*, que consiste na facilitação da detecção de um estímulo após exposição prévia ao mesmo; o aprendizado associativo, representado pelos condicionamentos clássico e operante; e o aprendizado não-associativo, como sensibilização (aumento da resposta a diversos estímulos posteriormente à exposição a um estímulo nocivo) e habituação (diminuição de resposta subseqüentemente à exposição repetida a um estímulo inócuo) (SCHACTER, 1987; KANDEL *et al.*, 2014; SQUIRE *et al.*, 2015).

A formação de memórias declarativas depende do lobo temporal medial (SQUIRE & ZOLA MORGAN, 1991), o qual consiste na formação hipocampal (hipocampo, complexo subicular e giro denteado) e os córtices entorrinal, perirrinal e para-hipocampal adjacentes (SQUIRE *et al.*, 2004) e de suas conexões com áreas associativas uni- e multimodais distribuídas em todo o córtex e áreas subcorticais, como a amígdala (SQUIRE & ZOLA MORGAN, 1991; LEDOUX, 2007).

Já a aquisição de memórias não declarativas, em geral, depende menos do lobo temporal medial e mais de outras estruturas, como o neocórtex para memórias procedimentais (PACKARD *et al.*, 1989), neocórtex para o *priming* (SCHACTER *et al.*, 1998), o cerebelo (MCCORMICK *et al.*, 1982) e a amígdala (LEDOUX, 2007) para algumas formas de condicionamento simples e vias reflexas para condicionamento não associativo (SQUIRE & ZOLA MORGAN, 1991).

A classificação da memória em diferentes sistemas é importante para seu estudo, haja vista que estes servem a propósitos diferentes e possuem substratos anatômicos distintos (SQUIRE & DEDE, 2015). Por outro lado, nem sempre é

possível encaixar rigidamente uma memória em tais classificações. Uma mesma experiência pode consistir em diversos aspectos, os quais podem ser armazenados como diferentes memórias, por exemplo, declarativas e não-declarativas (SQUIRE & DEDE, 2015).

Da mesma maneira, algumas formas de condicionamento não dependem de estruturas do lobo temporal medial (SQUIRE, KNOWLTON & MUSEN, 1993) e são mais facilmente rotuladas como implícitas, como a tarefa de piscar condicionado, cujo aprendizado requer participação do cerebelo e de circuitos do tronco encefálico (SQUIRE & DEDE, 2015). Já para outras memórias, como a de medo condicionado ao contexto, por exemplo, a classificação não é tão cristalina. Nesta tarefa, o animal utiliza de características individuais do ambiente para formar uma representação unitária, conjuntiva do contexto, a qual é fundamentalmente dependente do hipocampo (RUDY & O'REILLY, 1999). Sendo assim, ainda que a associação entre o contexto e o estímulo aversivo aconteça na amígdala (KIM & JUNG, 2006) e que componentes deste aprendizado possam ocorrer mesmo sem percepção consciente (KNIGHT, WATERS & BANDETTINI, 2009), esta tarefa possui características próprias da memória declarativa, como a dependência de estruturas do lobo temporal medial (ANAGNOSTARAS, GALE & FANSELOW, 2001; ROY *et al.*, 2017) e a referência espacial demonstrada como especificidade em relação ao contexto (KITAMURA *et al.*, 2017).

As memórias ainda podem ser classificadas com base na duração, como memória de curta duração e memória de longa duração (IZQUIERDO *et al.*, 1999) ou por sua função, como memória de trabalho (IZQUIERDO, 2018).

2.2.1 Memória de medo

O medo é fundamental para a sobrevivência, no sentido em que desencadeia respostas de defesa que potencialmente protegem o indivíduo de perigos e, por esta importância, é altamente conservado na evolução (KIM & JUNG, 2006). As memórias de medo permitem aos animais prever eventos aversivos e reagir apropriadamente a ameaças (IZQUIERDO, FURINI & DE CARVALHO MYSKIW, 2016). O aprendizado de medo produz memórias extremamente fortes, detalhadas e duradouras (IZQUIERDO *et al.*, 2006), principalmente pelo alto valor emocional destas experiências (MCGAUGH, 2004). O aprendizado de medo pode ser estudado

em animais por diferentes meios, dentre eles o condicionamento clássico (SCHAFE *et al.*, 2001; IZQUIERDO, FURINI & DE CARVALHO MYSKIW, 2016). No condicionamento clássico, primeiramente descrito por Ivan Pavlov (1927), um estímulo inicialmente neutro, denominado estímulo condicionado (EC), passa a desencadear uma resposta condicionada (RC) após ser associado a um estímulo biologicamente relevante, o estímulo incondicionado (EI). O EI pode ter valência positiva, o qual caracteriza, por exemplo, o condicionamento apetitivo (MARTIN-SOELCH, LINTHICUM & ERNST, 2007), ou negativa, que configura o condicionamento aversivo (SCHAFE *et al.*, 2001; IZQUIERDO, FURINI & DE CARVALHO MYSKIW, 2016).

A tarefa de medo condicionado ao contexto (MCC) é uma forma de condicionamento clássico aversivo que utiliza um contexto (i.e., câmara de condicionamento) como EC, associado a estímulos elétricos como EI, o que produz uma resposta condicionada de imobilidade (ou *freezing*, imobilidade generalizada causada por uma resposta muscular tônica da musculatura esquelética, exceto pela respiratória). O aprendizado é verificado quando, subsequentemente, a exposição ao contexto por si desencadeia a resposta condicionada (CURZON, RUSTAY & BROWMAN, 2009; IZQUIERDO, FURINI & DE CARVALHO MYSKIW, 2016).

A memória de MCC envolve uma circuitaria complexa que inclui diversas regiões com diferentes papéis. A aquisição e consolidação da memória de longa duração de MCC recruta, dentre outros, o hipocampo, o qual reúne informações sobre o contexto (RUDY & O'REILLY, 1999; IZQUIERDO, FURINI & DE CARVALHO MYSKIW, 2016), a amígdala, onde se associam informações sobre o EC e o EI (KIM & JUNG, 2006) e o córtex pré-frontal, o qual recebe aferências tanto do hipocampo quanto da amígdala (SOTRES-BAYON *et al.*, 2012).

2.2.1.1 Córtex pré-límbico e memória de medo

O córtex pré-frontal dos roedores é dividido em três regiões: o córtex cingulado anterior, o córtex pré-límbico e o córtex infralímbico. Dentre essas subdivisões, o córtex pré-límbico desempenha papel importante na expressão das memórias de medo (GIUSTINO & MAREN, 2015; IZQUIERDO, FURINI & DE CARVALHO MYSKIW, 2016). O PrL apresenta extensas conexões com outras regiões implicadas no processamento do medo (GABBOTT *et al.*, 2005), incluindo o

tálamo, a amígdala basolateral (BLA), o hipocampo e, também, o córtex pré-frontal medial contralateral (GIUSTINO & MAREN, 2015). Esta região cortical recebe aferências excitatórias do hipocampo dorsal e ventral, importantes para a integração de informações contextuais e espaciais (JAY *et al.*, 1989; HOOVER & VERTES, 2007, GIUSTINO & MAREN, 2015). Além disso, o PrL conecta-se bidirecionalmente com a amígdala, com fibras corticais atingindo principalmente a BLA e aferências da BLA inervando as camadas 2 e 5 (BACON *et al.*, 1996, VERTES, 2004).

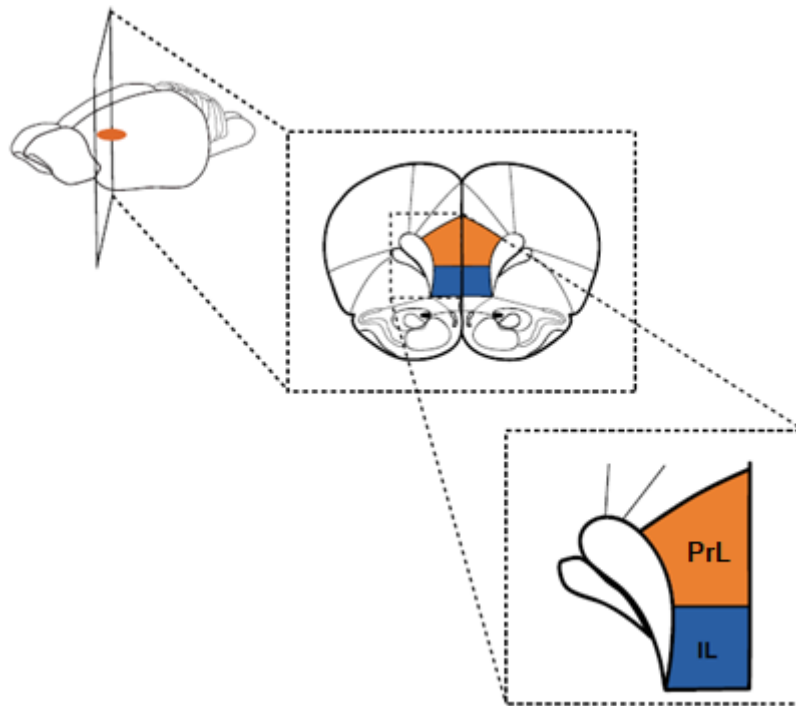


Figura 1 - Representação esquemática da localização do córtex pré-límbico. Fonte: adaptado de IZQUIERDO, FURINI & MYSKIW, 2016.

No que tange à memória de MCC, o PrL está envolvido desde os estágios iniciais de aquisição até a expressão da memória remota (DENARDO *et al.*, 2019). A memória de MCC está associada à síntese proteica (RIZZO *et al.*, 2017) e atividade de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA; GILMARTIN & HELMSTETTER, 2010) nesta região, os quais são necessários para evocação da memória recente. Ainda, o MCC induz o recrutamento de neurônios pré-límbicos durante o aprendizado, e estes neurônios já carregam o traço de memória desde um dia após a tarefa (KITAMURA *et al.*, 2017). No entanto, inicialmente, estes neurônios estão imaturos, e não são capazes de induzir evocação da memória recente. Ao longo do tempo, aferências hipocámpais induzem a maturação destes neurônios, os quais, juntamente a neurônios recrutados mais tardiamente para o circuito, se tornam

responsáveis pela evocação da memória de medo remota (KITAMURA *et al.*, 2017; DENARDO *et al.*, 2019). Além disso, a tarefa de MCC induz a proliferação de oligodendrócitos e a mielinização no PrL, processos que são essenciais para a persistência da memória remota de MCC (PAN *et al.*, 2020).

2.2.2 Mecanismos de formação de memórias

A ideia da sinapse como *locus* anatômico da memória foi teorizada inicialmente por Santiago Ramón y Cajal (1894) e revisitada posteriormente por Donald Hebb (1949) o qual levantou a hipótese de que a aprendizagem decorreria de alterações na força de conexão sináptica, ideia que se estabeleceu, ainda hoje, como o paradigma norteador do estudo da memória. Hebb postulou que a atividade coincidente de um neurônio pré-sináptico e um neurônio pós-sináptico determinaria o fortalecimento duradouro de suas conexões (HEBB, 1949).

A teoria proposta por Hebb encontrou amparo experimental na demonstração da potenciação de longa duração (LTP) – fenômeno no qual a estimulação em alta frequência do terminal pré-sináptico leva à elevação sustentada da força da sinapse estimulada (BLISS & LØMO, 1973; BLISS & COLLINGRIDGE, 1993). Sua contrapartida, a depressão de longa duração (LTD), ocorre em resposta à estimulação em baixa frequência, e resulta em uma diminuição prolongada da eficiência sináptica (DUDEK & BEAR, 1992; COLLINGRIDGE *et al.*, 2010). Juntos, estes dois processos representam duas das principais formas de plasticidade sináptica no sistema nervoso central (DIERING & HUGANIR, 2018).

A indução experimental de LTP foi inicialmente demonstrada, através da aplicação de estímulos elétricos de alta frequência, no hipocampo (BLISS & LØMO, 1973) e posteriormente em outras áreas encefálicas como na amígdala (CHAPMAN *et al.*, 1990) e no neocórtex (TSUMOTO, 1992). Da mesma forma, a indução experimental de LTD, com estimulação de baixa frequência, foi demonstrada em diferentes regiões, como no hipocampo (DUDEK & BEAR, 1992) e no cerebelo (ITO, 2001).

Posteriormente, foi demonstrado que, não apenas a indução experimental de LTP é possível, mas o aprendizado induz, *in vivo*, a potenciação de longa duração na amígdala (ROGAN *et al.*, 1997), neocórtex (RIOULT-PEDOTTI, 2000) e no hipocampo (WHITLOCK, 2006). Além disso, demonstrou-se a ativação ou

desativação – com LTP ou LTD, respectivamente – da expressão de uma memória de medo condicionado (NABAVI *et al.*, 2014), ratificando a associação entre estas formas de plasticidade sináptica e a memória. Dessa forma, acredita-se que a memória seja codificada em padrões de modificações bidirecionais da força sináptica distribuídas em circuitos neuronais (MCNAUGHTON AND MORRIS, 1987; TONEGAWA *et al.*, 2015; TAKEUCHI, DUSZKIEWICZ & MORRIS, 2014).

2.2.2.1 Mecanismos da memória de trabalho

A memória de trabalho se refere ao armazenamento temporário de informações, mantendo-as disponíveis para tarefas cognitivas complexas como o raciocínio, a compreensão e a leitura (BADDELEY, 1983; BADDELEY, 2010). A memória de trabalho não pode ser classificada em termos de duração de retenção, uma vez que seu funcionamento é limitado por sua capacidade de armazenamento e não por um intervalo específico de tempo (SQUIRE & DEDE, 2015). O modelo teórico mais amplamente aceito atualmente postula que o aumento no número de potenciais de ação em neurônios no córtex pré-frontal e em outras áreas corticais (SALMON *et al.*, 1996), e a reverberação em populações neuronais específicas, constituem o mecanismo celular responsável pela memória de trabalho, de forma que a informação persiste enquanto perdurar a atividade elétrica (GOLDMAN-RAKIC, 1995; IZQUIERDO, 1999).

A memória de trabalho opera de forma integrada aos outros sistemas mnemônicos, pois representa o início do fluxo da informação através sistemas que podem levar ao seu armazenamento permanente. Também, por outro lado, informações provenientes da memória de curta ou longa duração podem ser evocadas e mantidas temporariamente na memória de trabalho (BADDELEY, 2010; COWAN, 2008).

2.2.2.2 Mecanismos da memória de curta duração

A memória de curta duração constitui-se no armazenamento de informações por períodos da ordem de minutos a algumas horas (IZQUIERDO *et al.*, 1999). Já a retenção por períodos mais longos representa a memória de longa duração. Apesar de se expressarem como um *continuum*, Izquierdo e colaboradores demonstraram que tratamentos aplicados em diferentes regiões encefálicas em roedores são

capazes de prejudicar a memória de curta duração sem afetar a memória de longa duração (IZQUIERDO *et al.*, 1998; IZQUIERDO *et al.*, 1999). Sendo assim, a memória de curta duração não é um passo indispensável para a memória de longa duração, e seus processamentos ocorrem de forma paralela e, até certo ponto, independentes (MCGAUGH, 2000).

As duas fases temporais da memória diferem quanto a seus requisitos bioquímicos: a memória de curta duração é independente da síntese de RNA e de proteínas, enquanto a consolidação da memória de longa duração requer transcrição gênica e síntese proteica (MCGAUGH, 2000; ALONSO *et al.*, 2002). Da mesma forma, a LTP também é dividida em duas etapas: a LTP precoce e a LTP tardia. Em um paralelo à memória, a primeira independe, enquanto a segunda depende de síntese de RNA e proteínas (SCHAFE *et al.*, 2001).

A memória de curta duração envolve principalmente modificações pós-traducionais em proteínas preexistentes (IZQUIERDO *et al.*, 2002; SCHAFE *et al.*, 2001). O processo bioquímico se inicia com a ativação de receptores na membrana neuronal, em especial receptores de glutamato alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA), metabotrópicos e NMDA (IZQUIERDO *et al.*, 1999; IZQUIERDO *et al.*, 2002), mas também é modulado por outros neurotransmissores, como dopamina, serotonina, noradrenalina (IZQUIERDO *et al.*, 1998; IZQUIERDO *et al.*, 1999). A ativação de receptores de membrana desencadeia o recrutamento de segundos mensageiros que iniciam cascatas de sinalização intracelulares (KANDEL, 2001). Estas vias de sinalização culminam em alterações transitórias da eficácia da transmissão sináptica. A maquinaria celular e molecular envolvida na plasticidade sináptica e memória de curta duração são altamente conservadas entre espécies, no entanto, ainda assim, podem exibir diferenças de acordo com o organismo, a estrutura e a tarefa estudada (IZQUIERDO *et al.*, 1999, KANDEL 2001). No córtex entorrinal de ratos, por exemplo, a atividade da proteína cinase C (PKC) é necessária imediatamente após a aprendizagem de uma tarefa de esQUIVA inibitória para a memória de curta duração. Para a mesma tarefa, no entanto, esta enzima não é necessária na região CA1 do hipocampo para a memória de curta duração (IZQUIERDO *et al.*, 1999). Os mecanismos pelos quais esta transmissão é aumentada, no entanto, também diferem. Na sensibilização de curta duração em *Aplysia*, por exemplo, o produto final das cascatas de sinalização é o aumento da

liberação de neurotransmissores do terminal pré-sináptico (KANDEL, 2001). Já na esquiva inibitória, em ratos, a eficácia sináptica é transitoriamente aumentada através da fosforilação de receptores AMPA pelas enzimas proteína cinase A (PKA), PKC e proteína cinase dependente de cálcio/calmodulina II (CaMKII), o que aumenta a sensibilidade destes canais (IZQUIERDO, 2002).

A fase precoce da LTP também se caracteriza por modificações pós-traducionais em proteínas pré-existentes (SODERLING & DERKACH, 2000). A ativação do receptor NMDA, por exemplo, conduz a uma elevação intracelular de íons cálcio, o que ativa enzimas como a PKC e a CaMKII (MALINOW *et al.*, 1998). Estas enzimas fosforilam diversas outras proteínas, dentre elas os receptores AMPA, levando a um aumento na corrente excitatória para dentro do neurônio pós-sináptico (SODERLING & DERKACH, 2000).

2.2.2.3 Mecanismos da memória de longa duração

A consolidação é um processo inerente à formação da memória de longa duração, o qual envolve a transformação da memória de um estado inicialmente lábil para uma configuração mais estável (IZQUIERDO *et al.*, 2006). A sequência de eventos moleculares que ocorrem na LTP tem grande similaridade aos processos que ocorrem durante a consolidação da memória (IZQUIERDO *et al.*, 2006). Um requisito fundamental tanto para a consolidação da memória quanto para a fase tardia da LTP é a transcrição gênica e síntese de proteínas (SCHAFE *et al.*, 2001; ASOK *et al.*, 2019).

Apesar de poderem ser dissecadas farmacologicamente, as memórias de curta e de longa duração compartilham de diversos passos moleculares e possivelmente das mesmas células e sinapses (IZQUIERDO *et al.*, 2002). Sendo assim, a aquisição de memórias de longa duração também se inicia com a ativação de receptores de glutamato AMPA, NMDA e também metabotrópicos (IZQUIERDO *et al.*, 2016). O recrutamento de segundos mensageiros ativa proteínas cinases específicas: o cálcio ativa enzimas como a PKC e o AMP cíclico ativa a PKA (SCHAFE *et al.*, 2001; IZQUIERDO & MEDINA, 1997). Durante a consolidação da memória de esquiva inibitória, por exemplo, a PKA é ativada no hipocampo em dois momentos: imediatamente após a aquisição e novamente 3-6 h depois da tarefa (IZQUIERDO & MEDINA, 1997). Da mesma forma, esta via é ativada durante a LTP

na amígdala em tempos semelhantes, inicialmente produzindo modificações covalentes e tardiamente levando à síntese proteica (HUANG *et al.*, 1994). A aprendizagem do medo condicionado é acompanhada da elevação de proteínas da família das ERKs (do inglês, *extracellular-signal regulated kinases*) na amígdala lateral e a inibição destas proteínas impede a consolidação desta memória (SCHAFE *et al.*, 2001). As atividades da PKA, PKC, CaMKII e ERK convergem na fosforilação de CREB (do inglês, *cAMP response element binding protein*). CREB é um fator de transcrição fundamental para a síntese de proteínas necessárias para a consolidação da memória de longa duração e também para a fase tardia da LTP, tanto no hipocampo quanto na amígdala (SCHAFE *et al.*, 2001; IZQUIERDO *et al.*, 2006; IZQUIERDO, FURINI & DE CARVALHO MYSKIW, 2016). Na consolidação da memória de MCC e também na LTP, a ativação de CREB é necessária para a síntese das subunidades do receptor AMPA e sua inserção na membrana (MIDDEI *et al.*, 2013). Em última análise, a consolidação da memória culmina em alterações funcionais e morfológicas duradouras que modificam a eficiência sináptica e a conectividade entre os neurônios de um determinado circuito (IZQUIERDO, 2006; ASOK *et al.*, 2019).

2.2.3 Mecanismos de persistência da memória

As teorias correntes mais amplamente aceitas postulam que a memória de longa duração seria armazenada sob a combinação de alterações sinápticas persistentes (TAKEUCHI, DUSZKIEWICZ & MORRIS, 2014; ABRAHAM, JONES & GLANZMAN, 2019; SMOLEN, BAXTER & BYRNE, 2019) e alterações globais da excitabilidade celular (LISMAN *et al.*, 2018). Outra visão influente sobre o assunto é a proposição de que a conectividade funcional em um circuito de neurônios formaria a base do armazenamento da memória de longa duração (TONEGAWA *et al.*, 2015), sendo que, neste caso, a plasticidade sináptica teria o papel de possibilitar o acesso à informação codificada, ou seja, permitir sua evocação (RYAN *et al.*, 2015).

De qualquer forma, as teorias de aprendizagem e memória, em geral, convergem para a visão de que alterações moleculares, celulares e/ou sinápticas sustentadas formam o substrato físico da memória (ABRAHAM, JONES & GLANZMAN, 2019; SMOLEN, BAXTER & BYRNE, 2019).

Sob a óptica molecular, as cascatas de sinalização que levam à consolidação da memória têm duração limitada, persistindo de minutos a algumas horas (SACKTOR, 2011), e as proteínas sintetizadas neste processo estão sujeitas à degradação (SMOLEN, BAXTER & BYRNE, 2019). As memórias, no entanto, podem durar meses, anos ou até mesmo uma vida toda.

Ainda que a identidade definitiva do engrama permaneça elusiva, alguns mecanismos para a manutenção das memórias foram propostos. Uma das hipóteses para explicar o armazenamento da memória consiste na ativação de proteínas cinases persistentemente ativas, dentre elas, a PKM ζ (SACKTOR & FENTON, 2018).

2.2.3.1 PKM ζ

A PKM ζ é uma isoforma atípica da proteína cinase C, a qual, diferentemente de outras isoformas, não possui um pseudosubstrato autoinibitório no domínio regulatório, o que a torna persistentemente ativa (SACKTOR *et al.*, 1993; HERNANDEZ *et al.*, 2003). A proteína é codificada a partir de um promotor interno no gene PRKCZ, que codifica a proteína PKC ζ (Figura 1), o qual gera um transcrito contendo a região catalítica, carecendo da regulatória (HERNANDEZ *et al.*, 2003).

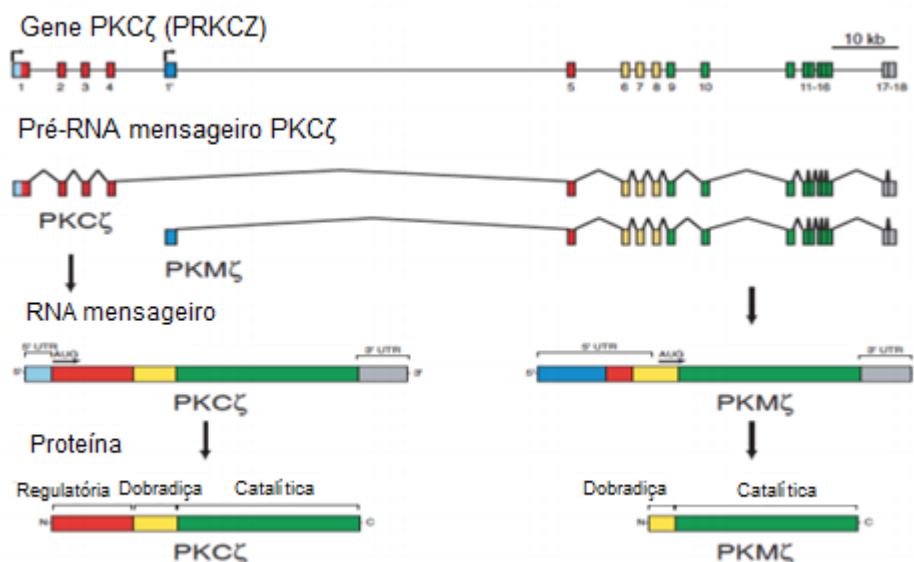


Figura 2 - Formação da PKM ζ a partir de um promotor interno no gene PRKCZ. Fonte: Adaptado de HERNANDEZ *et al.*, 2003.

O RNA mensageiro (RNAm) da PKM ζ é constitutivamente transportado aos dendritos (MUSLIMOV *et al.*, 2004), no entanto está sob um estado de repressão traducional mediado pela proteína PIN1 (do inglês, *protein interacting with NIMA 1*) (HERNANDEZ *et al.*, 2003, WESTMARK *et al.*, 2007). A sinalização glutamatérgica diminui a atividade de PIN1 e estimula diversas enzimas como CaMKII, ERK, PKA e mTOR (proteína alvo da rapamicina em mamíferos) que convergem para permitir a tradução da PKM ζ (KELLY *et al.*, 2007). Após sua síntese, para atingir atividade catalítica máxima, a enzima deve ser fosforilada pela enzima PDK1 (cinase dependente de fosfoinosítideo 1) (KELLY *et al.*, 2007). A PKM ζ , então, fosforila PIN1 inibindo sua atividade, o que resulta em um mecanismo de retroalimentação positiva, que permite a perpetuação de sua síntese e atividade, o que fornece um mecanismo teórico pelo qual poderia sobreviver ao *turnover* proteico e manter por tempo indeterminado seus níveis elevados na sinapse (SACKTOR, 2011).

A PKM ζ é sintetizada na fase tardia da LTP (SACKTOR *et al.*, 1993), é necessária e suficiente para a manutenção desta fase e seu bloqueio reverte a LTP estabelecida (LING, 2002). A PKM ζ mantém a fase tardia da LTP através da inibição da endocitose de receptores AMPA (SACKTOR, 2011). A proteína NSF (do inglês, *N-ethylmaleimide sensitive factor*) interage com a subunidade GluA2 do receptor AMPA e mantém seus níveis basais na membrana sináptica. Este processo se dá através da interferência com a proteína PICK1 (do inglês, *protein interacting with C-kinase 1*), a qual participa da endocitose de receptores AMPA (YAO *et al.*, 2008). Bloqueando a interação de GluA2 com PICK1, NSF direciona os receptores para inserção na membrana sináptica (YAO *et al.*, 2008). A PKM ζ , por sua vez, em um mecanismo dependente da interação NSF-GluA2, reconfigura a dinâmica do tráfego sináptico de receptores AMPA em favor de sua manutenção na membrana sináptica, aumentando persistentemente seu número e, desta forma mantendo a potenciação sináptica (LING *et al.*, 2006; YAO *et al.*, 2008; SACKTOR, 2011). Além desse mecanismo, a PKM ζ também mantém a potenciação sináptica impedindo a difusão lateral dos receptores AMPA, de forma a imobilizá-los na sinapse (YU *et al.*, 2017). A figura 3 apresenta um resumo dos mecanismos de ação da PKM ζ na potenciação sináptica.

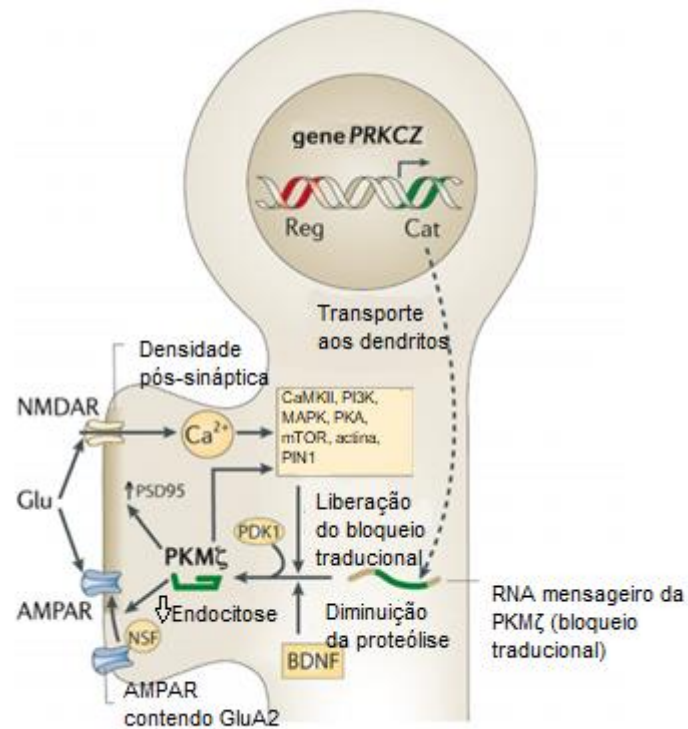


Figura 3 - Resumo dos mecanismos de ação da PKMζ sobre a potenciação sináptica. Fonte: Adaptado de SACKTOR, 2012.

A PKMζ não apenas mantém a fase tardia da LTP, como também o armazenamento de diversas memórias de longa duração (SACKTOR & HELL, 2017). Múltiplas formas de inibição da PKMζ são capazes de apagar memórias já consolidadas (KWAPIS & HELMSTETTER, 2014). A aplicação de ZIP, um peptídeo inibidor de PKCs atípicas como a PKMζ, em diferentes regiões encefálicas, prejudicou a retenção de diversas formas de memória, como espaciais (PASTALKOVA *et al.*, 2006; SERRANO *et al.*, 2008), instrumentais (SERRANO *et al.*, 2008), de condicionamento clássico (SHEMA, SACKTOR & DUDAI, 2007; SERRANO *et al.*, 2008; KWAPIS *et al.*, 2009) e de procedimento (VON KRAUS, SACKTOR & FRANCIS, 2010). A PKMζ também é inibida pela queleritrina, um inibidor não seletivo das PKCs, e sua aplicação também prejudica a persistência de memórias consolidadas (SERRANO *et al.*, 2008). Além disso, a expressão de uma forma dominante-negativa da PKMζ também é capaz de prejudicar a persistência de memórias já consolidadas (SHEMA *et al.*, 2007). Mais, a aplicação de oligodeoxinucleotídeos (ODN) antissentido, que inibem a síntese de PKMζ, bloqueia

a manutenção da fase tardia da LTP e também a persistência de memórias espaciais (HSIEH *et al.*, 2016) e motora (GAO *et al.*, 2018).

A ação da enzima se dá especificamente sobre a manutenção de memórias estáveis, após a fase de consolidação, uma vez que sua inativação é inefetiva em produzir déficits de memória enquanto esta encontra-se em um estado lábil (SHEMA *et al.*, 2009; LEVITAN *et al.*, 2016). Especificamente, demonstrou-se que a aplicação de ZIP imediatamente antes ou durante o treino de aversão condicionada ao sabor não produz déficit de memória, enquanto que aplicações 72 h ou até 3 meses após o treino são amnésicas (SHEMA *et al.*, 2009). Da mesma forma, a evocação da memória de aversão condicionada ao sabor, que induz a labilização do traço mnemônico (NADER, SCHAFE & LEDOUX, 2000), torna esta memória insensível à infusão de ZIP no córtex gustatório, por um período de aproximadamente 45 h, após o qual o agente volta a ter ação amnésica (LEVITAN *et al.*, 2016).

Ainda, o aprendizado induz a expressão persistente de PKM ζ , verificado por até 30 dias no hipocampo em tarefas espaciais (HSIEH *et al.*, 2016) e por mais de 40 dias no córtex sensoriomotor em uma tarefa motora (GAO *et al.*, 2018).

Outros estudos, no entanto, lançaram dúvida sobre o papel da PKM ζ na manutenção da LTP e armazenamento da memória. Camundongos submetidos a um nocaute constitutivo (LEE *et al.*, 2013) ou induzível (VOLK *et al.*, 2013) do gene que codifica a PKM ζ expressam LTP e memória aparentemente normais. Entretanto, a infusão de ZIP, é capaz de reverter a fase tardia da LTP mesmo nesses animais (VOLK *et al.*, 2013) o que indicaria que os efeitos de ZIP são independentes da PKM ζ . No entanto, esta controvérsia foi conciliada com a demonstração de que outra PKC atípica, a PKC ι/λ (o gene ι humano é homólogo ao λ em roedores), é recrutada como um sistema compensatório nos animais constitutivamente incapazes de expressar PKM ζ (TSOKAS *et al.*, 2016). A PKC ι/λ , que em animais normais é apenas transitoriamente recrutada durante a fase inicial da LTP e da memória, mantém estas mesmo sob a depleção de PKM ζ (WANG *et al.*, 2016). PKC ι/λ também é inibida por ZIP, o que explica os efeitos deletérios da infusão deste sobre os animais geneticamente modificados. Por outro lado, enquanto os nocautes induzíveis de PKM ζ (VOLK *et al.*, 2013) não apresentaram déficits na plasticidade sináptica e memória, outra abordagem (WANG *et al.*, 2016), na qual o silenciamento

gênico da PKM ζ foi realizado após o aprendizado, foi capaz de eliminar memórias previamente estabelecidas.

A aplicação de ODNs antissentido bloqueia a síntese *de novo* especificamente de PKM ζ , e não de outras proteínas, como a PKC α/λ . Este tratamento, diferentemente de ZIP, foi capaz de impedir a fase tardia da LTP e prejudicar a memória apenas em animais normais, e não nos nocautes constitutivos para PKM ζ , ratificando o papel desta enzima na plasticidade sináptica e no armazenamento da memória (TSOKAS *et al.*, 2016). Por outro lado, enquanto os nocautes induzíveis de PKM ζ (VOLK *et al.*, 2013) não apresentaram déficits na plasticidade sináptica e na memória, outra abordagem (WANG *et al.*, 2016) na qual o silenciamento gênico da PKM ζ foi realizado após o aprendizado, foi capaz de eliminar memórias previamente estabelecidas.

Recentemente, foram descritos mecanismos adicionais pelos quais ZIP poderia interferir na manutenção das memórias. Demonstrou-se que ZIP ativa a glicogênio sintase cinase 3 beta (GSK-3 β) e, através deste mecanismo, pode levar à perda de potenciação sináptica e prejuízo da memória (SONG *et al.*, 2020). Outro estudo descreveu que ZIP pode interferir na plasticidade sináptica e memória através da infrarregulação de receptores AMPA que contém a subunidade GluA1, em um mecanismo dependente de óxido nítrico (BINGOR *et al.*, 2020).

2.2.3.1.1 Receptores do tipo AMPA

Os receptores do tipo AMPA são receptores ionotrópicos transmembrana de glutamato que medeiam a maior parte da transmissão excitatória rápida no sistema nervoso central (DIERING & HUGANIR, 2018). Os receptores AMPA são tetrâmeros compostos por diferentes combinações de quatro subunidades: GluA1, GluA2, GluA3 e GluA4, cujas regiões de ligação ao glutamato são relativamente preservadas, mas que diferem principalmente em suas caudas carbóxi-terminais citoplasmáticas (SHEPHERD & HUGANIR, 2007). As diferentes combinações de subunidades conferem aos receptores AMPA características biofísicas únicas e comportamentos de tráfego intracelular distintos, através de interações com outras proteínas e de diversas modificações pós-traducionais (HUGANIR & NICOLL, 2013; DIERING & HUGANIR, 2018). No que tange às regras que governam o tráfego intracelular dos receptores, por exemplo, as subunidades GluA1 e GluA4 são

recrutadas para as sinapses em um mecanismo dependente de atividade, enquanto as subunidades GluA2 e GluA3 são inseridas e internalizadas de forma constitutiva (SHI *et al.*, 2001; DIERING & HUGANIR, 2018).

Uma importante distinção se dá quanto à presença ou ausência da subunidade GluA2 na composição do receptor. A maior parte do RNA mensageiro que codifica a subunidade GluA2 passa por um processo de edição, na qual o resíduo de glutamina 806, localizado na porção que forma o poro do canal, é substituído por um resíduo de arginina. Esta troca determina a impermeabilidade ao íon cálcio, de forma que os receptores que contêm a subunidade GluA2 são impermeáveis ao cálcio, enquanto os que não contêm GluA2 são permeáveis a este íon (SHEPHERD & HUGANIR, 2007; DIERING & HUGANIR, 2018). Os receptores que não contêm GluA2 (p. ex., homômeros de GluA1) estão envolvidos na plasticidade sináptica aguda, sendo rapidamente inseridos nas sinapses na indução da LTP e na plasticidade sináptica dependente de experiências (CLEM & BARTH, 2006; PLANT *et al.*, 2006; CHOQUET, 2010). Estes receptores, são menos estáveis e têm expressão apenas transitória nas sinapses, sendo substituídos em sequência por receptores AMPA contendo a subunidade GluA2 (SHI *et al.*, 2001; MALINOW & MALENKA, 2002; MAN, 2011; MORITA *et al.* 2014).

A subunidade GluA2 interage com outras proteínas sinápticas que auxiliam na estabilização dos receptores AMPA na membrana (SONG *et al.*, 1998; SHI *et al.*, 2001; YAO *et al.*, 2008; MIGUES *et al.*, 2010) e, também, com moléculas extracelulares, o que contribui para a manutenção de espinhos dendríticos (SAGLIETTI, 2007). Desta forma, a permeabilidade ao cálcio confere aos receptores que não contêm a subunidade GluA2 permissividade aos eventos plásticos, de modo que estes são recrutados precocemente durante o aprendizado, ou após a evocação da memória (HONG *et al.*, 2013) – momentos em que o traço de memória se encontra lábil. Por outro lado, os receptores AMPA contendo a subunidade GluA2 substituem os anteriores durante a estabilização do traço mnemônico – i.e. na consolidação e reconsolidação (HONG *et al.*, 2013; RAO-RUIZ *et al.*, 2011) – promovendo a manutenção da memória.

2.2.3.1.2 PKM ζ , GluA2 e memória de medo

A PKM ζ está envolvida na manutenção da memória de MCC na BLA, uma vez que a infusão de ZIP nesta estrutura é capaz de prejudicar a retenção da memória de medo 24 h (KWAPIS *et al.*, 2009) e até 7 dias após sua aquisição (KWAPIS *et al.*, 2012). Já no que tange à memória de medo condicionado ao tom, a inibição da enzima com ZIP na BLA prejudicou o armazenamento desta memória 1 dia e 10 dias após sua aquisição, efeito que é revertido com a inibição da endocitose de receptores AMPA contendo a subunidade GluA2 (MIGUES *et al.*, 2010). Ainda, a inibição da PKM ζ levou a uma diminuição dos níveis pós-sinápticos de GluA2 em animais condicionados e a quantidade dos receptores se correlacionou proporcionalmente à resposta comportamental de medo (MIGUES *et al.*, 2010).

No hipocampo, a superexpressão da PKM ζ facilita a formação da memória de MCC e aumenta a potenciação sináptica (SCHUETTE *et al.*, 2016). Por outro lado, a inibição da PKM ζ , por meio de silenciamento gênico não prejudica o aprendizado de MCC, mas inibe a aquisição de outra memória de medo, o condicionamento de traço, no qual choques elétricos são aplicados após um certo período de tempo (traço) da apresentação de um tom sonoro. Ainda, o silenciamento gênico da PKM ζ degradou a memória consolidada de condicionamento de traço, mas não de MCC (WANG *et al.*, 2016). Em conjunto, estes resultados sugerem que outros mecanismos moleculares mantenham a memória de MCC no hipocampo (SERRANO *et al.*, 2008; KWAPIS *et al.*, 2009).

No PrL, a tarefa de MCC induz, em ratos jovens, aumento da expressão de PKM ζ no citosol e aumento da expressão de GluA2 na membrana plasmática. Os animais idosos, por outro lado, apresentam prejuízo na memória de MCC, associado a uma diminuição dos níveis da PKM ζ e de GluA2 e, a superexpressão da PKM ζ no PrL reverte os prejuízos de memória encontrados nos animais idosos (CHEN *et al.*, 2016). Além disso, nos animais idosos, a transcrição da PKM ζ está epigeneticamente reprimida, o que se evidencia por um aumento da metilação do DNA que codifica a PKM ζ no PrL. O processo de aprendizagem leva a uma desmetilação deste DNA em animais jovens, o que não ocorre nos animais idosos (CHEN *et al.*, 2016). Ademais, o enriquecimento ambiental por 16 semanas foi capaz de reverter tanto as alterações epigenéticas quanto o prejuízo de memória dos ratos idosos (CHEN *et al.*, 2016). Ainda, em ratos jovens, a superexpressão da PKM ζ no

PrL, mas não no córtex infralímbico, facilitou a formação da memória de medo condicionado ao tom e aumentou a expressão de GluA2 (XUE *et al.*, 2015).

Além disso, também foi demonstrado que a persistência da memória de MCC após a reativação requer a participação da PKM ζ no PrL (DA SILVA *et al.*, 2019). O mesmo estudo não encontrou prejuízo de memória remota quando ZIP foi administrado no PrL sem reativação prévia da memória. No entanto, esta infusão ocorreu apenas um dia após o treino, período no qual os neurônios pré-límbicos podem ainda não requerer ação da PKM ζ , já que há estudos que mostram que eles poderiam ser dispensáveis neste momento para a evocação da memória (KITAMURA *et al.*, 2017). Ainda, os mecanismos de manutenção da memória parecem não ser sensíveis à aplicação de ZIP durante ou imediatamente após a aquisição da memória, apenas cerca de dois dias após, o que pode ter contribuído para este resultado (SHEMA *et al.*, 2009; LEVITAN *et al.*, 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a participação da PKM ζ e da subunidade GluA2 do receptor AMPA no córtex pré-límbico na manutenção das memórias recente e remota de medo condicionado ao contexto.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o papel da enzima PKM ζ no córtex pré-límbico na manutenção da memória recente de medo condicionado ao contexto.

- Verificar o papel da enzima PKM ζ no córtex pré-límbico na manutenção da memória remota de medo condicionado ao contexto.

- Verificar a participação da endocitose dos receptores AMPA contendo a subunidade GluA2 no córtex pré-límbico na manutenção da memória recente de medo condicionado ao contexto.

- Verificar a participação da endocitose dos receptores AMPA contendo a subunidade GluA2 no córtex pré-límbico na manutenção da memória remota de medo condicionado ao contexto.

- Verificar a interação entre a enzima PKM ζ e os receptores AMPA contendo a subunidade GluA2 na manutenção da memória remota de medo condicionado ao contexto.

4 MÉTODO

4.1 DELINEAMENTO

Trata-se de estudo experimental com utilização de roedores.

4.2 ANIMAIS

Os animais utilizados foram ratos *Wistar* machos adultos (CrlCembe:WI), com aproximadamente três meses de idade, pesando entre 300 e 330 gramas, oriundos do Centro de Modelos Biológicos Experimentais (CeMBE) da PUCRS. Os animais foram alojados no biotério do Centro de Memória e mantidos em grupos de quatro por caixa-moradia, com água e comida *ad libitum*, em um ciclo claro/escuro de 12h/12h (luzes ligadas às 7 horas e desligadas às 19 horas) e em uma temperatura ambiente constante de $22^{\circ}\text{C} \pm 1$. As caixas-moradia foram trocadas e higienizadas em uma frequência de três vezes por semana pela equipe técnica do CeMBE.

4.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Os animais foram submetidos a uma cirurgia estereotáxica para o implante bilateral de cânulas-guia (25 gauge), posicionadas 1,0 mm acima da região pré-límbica do córtex pré-frontal (PrL; anterior +3.2 mm; lateral, ± 0.8 mm; ventral, -2.0 mm, a partir do bregma) de acordo com as coordenadas do Atlas de Paxinos e Watson (2007). A cirurgia ocorre sob anestesia profunda, através da administração intraperitoneal de cetamina (75 mg/Kg) e xilazina (10 mg/kg). No período pós-operatório, os animais recebem o anti-inflamatório Meloxicam 0,2%, administrado imediatamente, 24 horas e 48 horas após a cirurgia, pela via subcutânea, na dose de 2 mg/Kg. Antes de qualquer manipulação, os animais terão 7 dias de recuperação pós-cirúrgica.

4.4 MANIPULAÇÃO DOS ANIMAIS

No intuito de reduzir interferências em relação à novidade, estresse e ansiedade decorrentes do manuseio, os animais foram manipulados previamente aos experimentos comportamentais. Durante 3 dias consecutivos, os animais foram deslocados da sala de alojamento até outra sala, onde foram manipulados

individualmente por 1 minuto. Os experimentos comportamentais ocorreram 24 h após a última sessão de manipulação.

4.5 MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO

O aparato utilizado para estudar o medo condicionado ao contexto consiste em uma caixa de condicionamento (35 x 35 x 35 cm) de alumínio, com a frente em acrílico transparente e assoalho constituído por barras metálicas condutoras de eletricidade (Panlab®, Espanha). Esta caixa situa-se dentro de compartimento à prova de som, revestido por espuma. O tempo total de imobilidade do animal (*freezing* ou imobilidade, resposta condicionada) foi medido em todos os experimentos por um avaliador treinado e experiente, com o auxílio de um cronômetro digital. O avaliador não tem ciência da condição experimental do animal (tratamento *versus* controle).

4.6 INTERVENÇÕES FARMACOLÓGICAS

As infusões farmacológicas foram realizadas utilizando-se uma microsseringa Hamilton® acoplada a um tubo de polietileno com uma agulha de infusão (0,05 mm de diâmetro). Todas as infusões tiveram volume total de 1,0 µL/lado. Ao término das micro infusões as agulhas foram mantidas no interior das cânulas guia por 60 segundos, a fim de evitar refluxo de líquido.

Tabela 1 - Relação dos fármacos utilizados nas infusões

Composto	Mecanismo de Ação	Dose
Farmacológico		
Solução salina (NaCl)	Veículo (Veh)	0,9%
ZIP	Inibidor da PKMζ	10 nmol/lado
GluA2 _{3Y}	Inibidor da endocitose de GluA2	100 pmol/lado
GluA2 _{3Y(s)}	Peptídeo controle inativo	100 pmol/lado

4.7 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

4.7.1 Memória recente

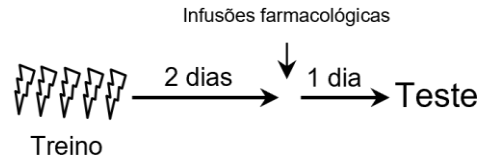


Figura 4 - Esquema experimental para memória recente. Fonte: elaborado pelo autor.

No dia 1 (treino), os animais foram colocados individualmente na caixa de condicionamento e, após um período de 120 segundos, foram apresentados 5 estímulos elétricos (0,7 mA, 2 s) em intervalos de 30 segundos. Após 30 s do último estímulo elétrico, os animais foram recolocados em suas caixas-moradia. Transcorridas 48 h (LEVITAN *et al*, 2016), os animais receberam infusões farmacológicas (Veh, ZIP, GluA2_{3Y} ou GluA2_{3Y(s)}) no PrL. Após 24 h, os animais foram recolocados individualmente na caixa de condicionamento para uma sessão de teste (memória recente) com duração de 180 segundos, sem estímulo elétrico.

4.7.2 Memória remota

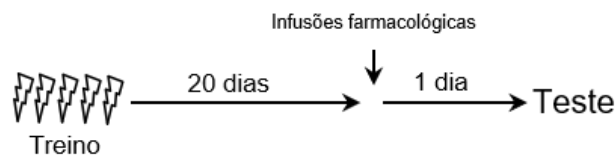


Figura 5 - Esquema experimental para memória remota. Fonte: elaborado pelo autor.

No dia 1 (treino), os animais foram colocados individualmente na caixa de condicionamento e, após um período de 120 segundos, foram apresentados 5 estímulos elétricos (0,7 mA, 2 s) em intervalos de 30 segundos. Após 30 s do último estímulo elétrico, os animais foram recolocados em suas caixas-moradia. Transcorridos 20 dias após o treino, os animais receberam infusões farmacológicas (Veh, ZIP, GluA2_{3Y}, GluA2_{3Y(s)}, ZIP + GluA2_{3Y(s)} ou ZIP + GluA2_{3Y}) no PrL. Após 24 h, os animais foram recolocados individualmente na caixa de condicionamento para uma sessão de teste (memória remota) com duração de 180 segundos, sem estímulo elétrico.

4.8 AVALIAÇÃO DO POSICIONAMENTO DAS CÂNULAS

Para assegurar a infusão dos fármacos no sítio anatômico correto, o posicionamento das cânulas-guia implantadas nos animais foi avaliada. Após o término dos experimentos comportamentais, os animais receberam, através das cânulas-guia, infusão de azul de metileno (4%); quinze minutos após, foram eutanasiados com sobredosagem anestésica (tiopental sódico 100 mg/Kg; i. p.) e posteriormente decapitados com uma guilhotina. Os encéfalos foram removidos e acondicionados em uma solução de formol (4%) durante 4 dias. Após este período, os encéfalos foram cortados na altura das regiões de interesse com auxílio de uma lâmina de bisturi e se procedeu-se a avaliação visual com uma lupa. Apenas os animais cuja infusão de azul de metileno apresentou dissipação dentro de 1,0 mm³ do local-alvo foram incluídos nas análises estatísticas.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados foram transcritos para uma planilha do software Microsoft Office Excel[®], onde o tempo de imobilidade em segundos foi convertido em porcentagem do tempo total. A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prisma[®]. Os dados foram analisados utilizando-se o teste de ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido do teste de Bonferroni, para determinar as diferenças na porcentagem de tempo de imobilidade nas sessões do MCC. A normalidade dos dados referentes às sessões de teste foi confirmada com o teste de Shapiro-Wilk, com $p > 0,05$. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Para todos os dados os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos estatisticamente.

5 ARTIGO

Artigo submetido para o periódico Neuroscience.

PKM ζ maintains remote contextual fear memory by inhibiting GluA2-dependent AMPA receptor endocytosis in the prelimbic cortex

Lucas A. Marcondes^{1,2}, Jociane de C. Myskiw², Eduarda G. Nachtigall^{1,2}, Rodrigo F. Narvaes^{1,2}, Ivan Izquierdo^{2†}, Cristiane R. G. Furini^{1,2*}

¹Laboratory of Cognition and Memory Neurobiology, Brain Institute, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga, 6690 – 3rd floor, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Memory Center, Brain Institute, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga, 6690 – 2nd floor - HSL, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

†*In Memoriam*

*Corresponding author:

Cristiane R. G. Furini

Address: Av. Ipiranga, 6690 – Bldg. 63, 3rd floor, Brain Institute - Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), 90610-000, Porto Alegre - RS, Brazil.

Phone number: +(55) 51 3320-5982.

E-mail address: cristianefurini@hotmail.com

Highlights

- PKM ζ is required for the maintenance of remote contextual fear memory in the PrL cortex.
- Recent contextual fear memory is not maintained by PKM ζ in the PrL cortex.
- Inhibition of GluA2-containing AMPAR endocytosis does not affect memory maintenance.
- PKM ζ maintains remote contextual fear memory in the PrL by inhibiting the internalization of GluA2-containing AMPARs.

Abstract

Fear memories allow animals to recognize and adequately respond to dangerous situations. The prelimbic cortex (PrL) is a crucial node in the circuitry that encodes contextual fear memory, and its activity is central for fear memory expression over time. However, while PrL has been implicated in contextual fear memory storage, the molecular mechanisms underlying its maintenance remain unclear. Protein kinase M zeta (PKM ζ) is a persistently active enzyme which has been shown to maintain many forms of memories by inhibiting the endocytosis of GluA2-containing AMPA receptors. Therefore, we hypothesized that PKM ζ action upon GluA2-containing AMPARs could be a mechanism for contextual fear memory maintenance in the PrL. To test this hypothesis, we trained rats in a contextual fear conditioning (CFC) paradigm and administered intra-PrL infusions of the PKM ζ inhibitor ZIP, the GluA2-dependent endocytosis inhibitor GluA2_{3Y} or the inactive peptide GluA2_{3Y(s)}, either two or twenty days after conditioning, and assessed long-term memory retention twenty-four hours later. We found that acute inhibition of GluA2-dependent AMPAR endocytosis in the PrL does not affect recent or remote contextual fear memory maintenance. Also, PKM ζ inhibition in the PrL does not impair the maintenance of recent contextual fear memory. However, we found that inhibition of prelimbic PKM ζ at a remote time point disrupted contextual fear memory maintenance, and that blocking GluA2-dependent removal of AMPARs prevents this impairment. Our results confirm the central role of PrL in fear memory and identify PKM ζ -induced inhibition of GluA2-containing AMPAR endocytosis as a key mechanism governing remote contextual fear memory maintenance.

Keywords: Memory; Contextual Fear Conditioning; Persistence; PKMzeta; GluA2; Prelimbic Cortex.

Introduction

Fear memories are indispensable for survival, inasmuch as they permit animals to recognize dangerous situations and display adequate defensive responses (Izquierdo et al., 2016; Maren, 2001). Learning that arises from fearful experiences generates some of the strongest and most enduring memories of an organism, which may persist for a lifetime (Izquierdo et al., 2016). In contextual fear conditioning (CFC), a form of Pavlovian conditioning, animals learn to associate an initially neutral environment with an aversive stimulus, and subsequently exhibit defensive responses to the context that predicts threat (Izquierdo et al., 2016; Maren, 2001; Maren et al., 2013). Memories are believed to be encoded through enduring physical and chemical alterations in distributed neuronal circuits throughout the brain (Josselyn and Tonegawa, 2020; Takeuchi et al., 2014; Tonegawa et al., 2015). For CFC memory, these circuits include the hippocampus, the amygdala and the medial prefrontal cortex (mPFC) (Izquierdo et al., 2016; Maren et al., 2013; Rao-Ruiz et al., 2021).

Within the mPFC, the prelimbic cortex (PrL) is a crucial hub in the fear circuitry (Giustino and Maren, 2015; Izquierdo et al., 2016). The PrL is extensively connected with both cortical and subcortical brain regions involved in fear memory processing (Gabbott et al., 2005; Vertes, 2004). It receives direct excitatory inputs from the ventral hippocampus (Hoover and Vertes, 2007; Jay et al., 1989), which transmit contextual information to this region (Twining et al., 2020). Moreover, the PrL is bidirectionally connected with the amygdala, with cortical axons innervating the basolateral amygdala (BLA), and inputs from the BLA terminating predominantly in PrL layer 2 and 5 (Bacon et al., 1996; McDonald et al., 1996; Vertes, 2004).

The PrL is critical for the acquisition, consolidation and expression of conditioned fear (Corcoran and Quirk, 2007; DeNardo et al., 2019; Do-Monte et al., 2015; Gilmartin and Helmstetter, 2010; Kitamura et al., 2017). CFC requires protein synthesis (Rizzo et al., 2017) and N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor activity (Gilmartin and Helmstetter, 2010) in the PrL, which are required for recent memory retrieval. Furthermore, activity in the PrL during fear conditioning is essential to permit the organization of the ensembles that will support memory retrieval at remote time points (DeNardo et al., 2019; Kitamura et al., 2017). Fear conditioning recruits neurons in the PrL that already hold the memory trace one day after learning, but are

unable to support memory retrieval at this point. As these cells mature over time, they become crucial for remote memory expression (Kitamura et al., 2017), along with neurons recruited into the ensemble later in time (DeNardo et al., 2019). So, even though the role of PrL neurons in supporting fear memory across time has been firmly established, the molecular mechanisms underlying the maintenance of the memory trace in the PrL during recent and remote time points remain largely elusive. One of the mechanisms suggested to be responsible for maintaining memories in the brain is the autonomously active enzyme protein kinase M zeta (PKM ζ). PKM ζ is an atypical protein kinase C isoform, which lacks the pseudosubstrate autoinhibitory domain (Hernandez et al., 2003; Sacktor et al., 1993). This unique characteristic renders the enzyme persistent action upon activation (Hernandez et al., 2003; Sacktor, 2011). PKM ζ has been shown to be both necessary and sufficient for the maintenance of long-term potentiation (LTP; Ling et al., 2002), a putative cellular model of learning and memory (Lynch, 2004; Malenka and Bear, 2004; Takeuchi et al., 2014). Also, PKM ζ has been shown to maintain many forms of memories (Migues et al., 2010; Pastalkova et al., 2006; Serrano et al., 2008; Shema et al., 2009), including contextual fear memory in the amygdala for up to a week (Kwapis et al., 2009, 2012). One of the mechanisms involved on the role of PKM ζ in the maintenance of synaptic potentiation and of memories is its regulation of the trafficking of GluA2-containing α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors (AMPA receptors; Yao et al., 2008; Migues et al., 2010). PKM ζ inhibits the endocytosis of GluA2-containing AMPARs (Migues et al., 2010) and limits their lateral diffusion (Yu et al., 2017), which results in an augmented concentration of these receptors in the postsynaptic membrane.

Therefore, in this study, we used a pharmacological approach to investigate whether PKM ζ underlies the maintenance of contextual fear memory at recent (3 days) and remote (21 days) long-term memory intervals in the PrL, and whether it does so by inhibiting the endocytosis of GluA2-containing AMPARs.

Experimental Procedures

Animals

Male *Wistar* rats (CrI/Cembe:WI, 3-month-old, 300-330 g) were obtained from the Centro de Modelos Biológicos Experimentais (CeMBE) of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS). Rats were housed four to a cage, maintained under a 12:12-hour light/dark cycle (lights on at 7 a.m.) and allowed access food and water *ad libitum*. All procedures were approved by the Animal Committee on Ethics for the Care and Use of Laboratory Animals of PUCRS, in compliance with National Institutes of Health guidelines for the care and use of laboratory animals.

Surgery

Animals were anesthetized with intraperitoneal (i.p.) injections of ketamine (75 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and submitted to stereotaxic surgery in order to implant bilateral stainless steel 22-gauge guide cannulae aimed 1.0 mm above the prelimbic cortex (PrL; anterior +3.2 mm, lateral \pm 0.8 mm, ventral -3.0 mm, relative to bregma, according to Paxinos & Watson, 2007). The guide cannulae were fixed to the skull with dental acrylic cement. All animals were allowed seven days for recovery from surgery before behavioral procedures. Animals were handled once daily for 3 consecutive days before behavioral experiments.

Contextual Fear Conditioning

Contextual fear conditioning was performed in a conditioning chamber placed inside a larger, sound-attenuating box (Panlab[®], Barcelona-Spain). The conditioning chamber consisted of three aluminum walls (35 x 35 x 35 cm) and a transparent acrylic front door. The chamber's floor was made up of parallel 3 mm-caliber stainless steel bars spaced 1 cm apart, connected to an energy source for footshock delivery. Before each phase of the experiment, animals were transported in their home cages from the vivarium to the experimental room, and allowed 20 min for acclimation. The conditioning chamber was cleaned with 70% (v/v) ethanol prior to each experiment.

On day 1 (training day; Tr), rats were placed inside the conditioning chamber and, after 120 s, received five scrambled footshocks (2-s duration, 0.7 mA, 30-s interval). Thirty seconds after the last footshock, animals were returned to their home cages. After 3 days (recent memory) or 21 days (remote memory), animals were placed

again in the conditioning chamber for a 180-s retention test, without electric shock. The time the animals spent freezing (as defined by complete immobility except for respiratory movements) was measured by an experienced researcher unaware of the animal's experimental condition, during the first 120 s min of Tr session and during the 180 s of the retention test and converted into a percentage of the total time.

Drugs and Infusions

ZIP (Myr-SIYRRGARRWRKL-OH, AnaSpec[®]), a PKM ζ inhibitor peptide; Tat-GluA2_{3Y} (YGRKKRRQRRRYKEGYNVYG-OH, AnaSpec[®]), a GluA2-containing AMPAR endocytosis inhibitor peptide; and Tat-GluA2_{3Y(s)} (scrambled, YGRKKRRQRRRVYKYGGYNE-OH, AnaSpec[®]), the inactive control peptide; were dissolved to the appropriate concentrations in sterile saline (NaCl, 0.9%), which also served as the Vehicle. The doses used in all experiments were: ZIP, 10 nmol per side; Tat-GluA2_{3Y}, 100 pmol per side; Tat-GluA2_{3Y(s)}, 100 pmol per side (Dong et al., 2015; Miguez et al., 2010; Pastalkova et al., 2006). All infusions were bilateral and a total volume of 1.0 μ l per side was infused into the PrL. The infusion procedure was performed using a Hamilton microsyringe tightly connected via polyethylene tubing to a 30-gauge infusion needle, which was introduced into the guide cannulae and protruded 1.0 mm beyond its ends. Infusion was carried out at a 1.0- μ l/min rate and the needle was left in place for additional 1.0 min to ensure proper drug diffusion and prevent backflow. At the end of the infusion, needle was carefully withdrawn, and the procedure was repeated on the other side.

Cannulae Placements

Correct cannulae placements were verified 2 days after the end of the last behavioral procedure. Animals were infused with 1.0 μ l of 4% methylene blue, as described above, anesthetized and killed by decapitation 15 min later. Cannula placement was considered correct when the spread was 1.0 mm³ from the intended infusion site. Fig. 1 depicts a schematic drawing of the infusion sites.

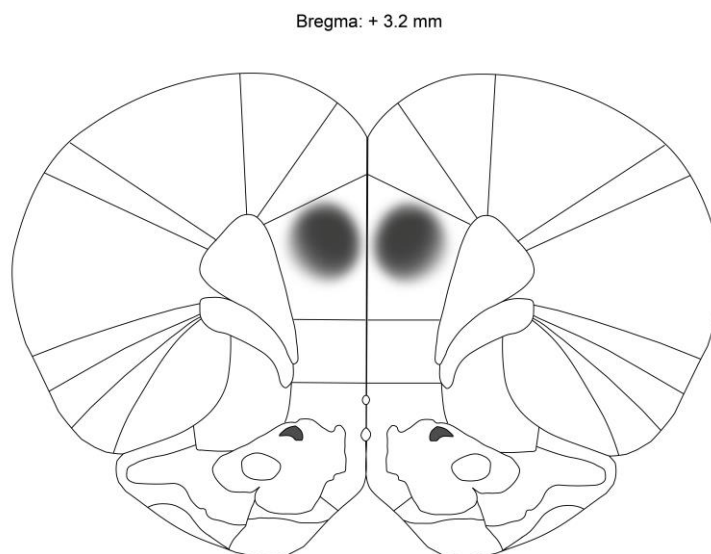


Figure 1 – Schematic representation of the infusion sites in the prelimbic cortex. Schematic drawing representing the diffusion of the drugs (shaded gray area) infused in the prelimbic cortex. Adapted from Paxinos and Watson, 2007.

Statistical Analyses

Data are expressed as mean and standard error of the mean (S.E.M). The percentage of time spent freezing was analyzed using two-way ANOVA with treatment and session as factors, followed by Bonferroni's *post hoc* test. Data from the test session were confirmed for normality using the Shapiro-Wilk test, with $p > 0.05$. All data were analyzed using GraphPad Prism® software. A p -value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Effect of ZIP infusion into the PrL on the maintenance of recent contextual fear memory

First, we investigated whether PKM ζ is required for the maintenance of recent contextual fear memory in the PrL. Animals were submitted to CFC and, two days later, different groups of animals received bilateral intra-PrL infusions of either ZIP (10 nmol) or vehicle (Veh; NaCl 0.9%). Twenty-four hours after the infusions, long-term memory was evaluated in the retention test (Fig. 2). Two-way repeated-measures ANOVA demonstrated effects of session ($F_{(1,15)} = 129.7$, $p < 0.0001$), but no effect of treatment ($F_{(1,15)} = 0.2876$, $p = 0.5996$) or session x treatment interaction

($F_{(1,15)} = 0.2670$, $p = 0.6129$). Bonferroni's *post hoc* test detected no differences in time spent freezing between groups during training session ($p > 0.05$) or during the retention test ($p > 0.05$; n Veh = 9, n ZIP = 8). This result suggests that PKM ζ is not required in the PrL for the maintenance of recent CFC memory.

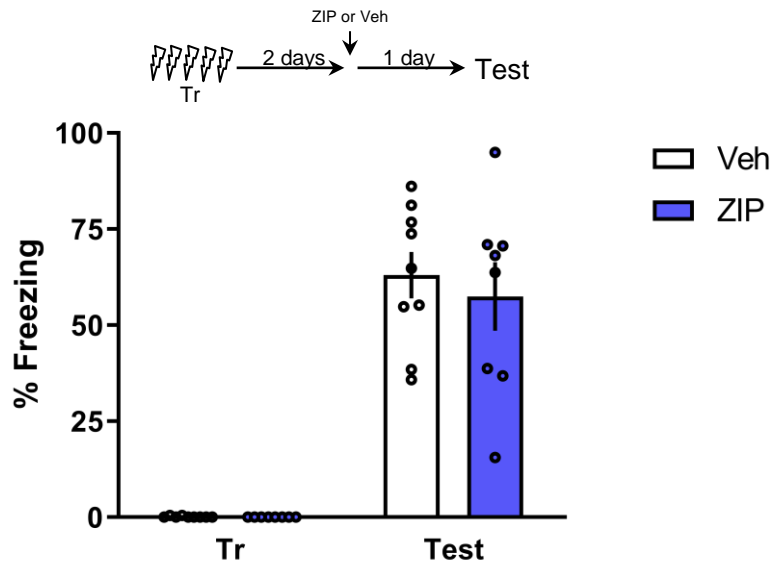


Figure 2 – Intra-PrL infusion of ZIP does not affect recent CFC memory. Animals were subjected to CFC training session (Tr) and two days later received bilateral intra-PrL infusions of vehicle (Veh; NaCl 0.9%) or of the PKM ζ inhibitor, ZIP (10 nmol). Twenty-four hours later, long-term memory was evaluated in a 3 min-retention test. Animals treated with Veh or ZIP did not differ in the amount of time spent freezing (n Veh = 9, n ZIP = 8). Percentages of time spent freezing on the first 2 min of Tr and on the 3-min retention test were analyzed by two-way repeated measures ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test. Data expressed as mean \pm S.E.M. (Upper) Schematic representation of the behavioral protocols.

Effect of GluA2_{3Y} and GluA2_{3Y(s)} infusions into the PrL on the maintenance of recent contextual fear memory

We investigated whether inhibition of GluA2-containing AMPA receptor endocytosis in the PrL interferes with the maintenance of recent CFC memory. To address this issue, animals were trained in the CFC paradigm and, 2 days later, received bilateral intra-PrL infusions of GluA2_{3Y} (100 pmol), GluA2_{3Y(s)} (100 pmol) or vehicle (Veh; NaCl 0.9%). Twenty-four hours after the infusion, animals underwent a recent CFC memory test (Fig. 3). Two-way repeated-measures ANOVA showed an effect of

session ($F_{(1,20)} = 108.7$, $p < 0.0001$), but no effect of treatment ($F_{(2,20)} = 0.5229$, $p = 0.6007$) or session x treatment interaction ($F_{(2,20)} = 0.5182$, $p = 0.6034$). Bonferroni's posttest revealed no differences between groups during training session ($p > 0.05$) and no differences during the retention test ($p > 0.05$; n Veh = 7, n GluA2_{3Y} = 8, n GluA2_{3Y(s)}} = 8), when animals from all groups froze during similar percentages of time. This result suggests that inhibition of GluA2-containing AMPAR endocytosis does not affect the maintenance of recent CFC memory.

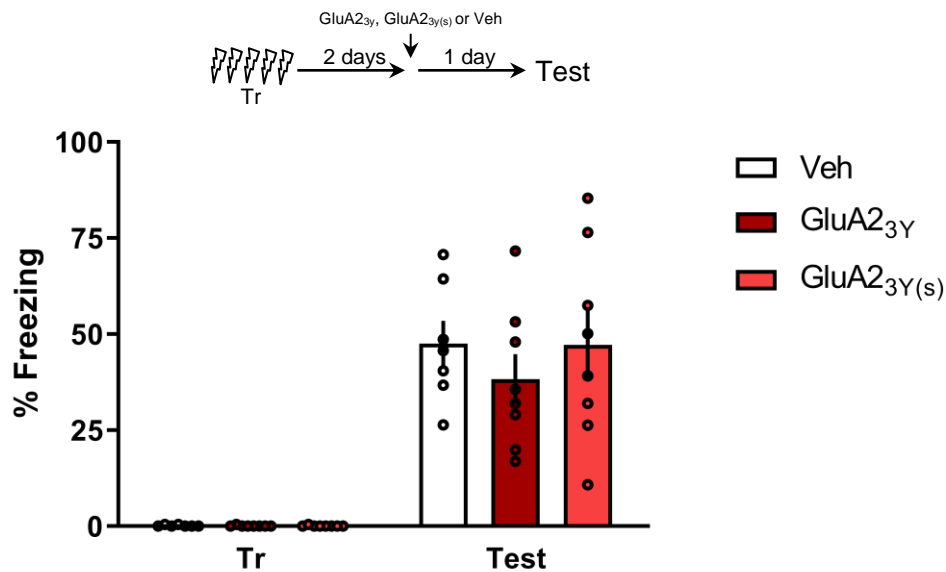


Figure 3 – Intra-PrL infusions of GluA2_{3Y} or GluA2_{3Y(s)}} do not affect recent CFC memory. Animals were subjected to CFC training session (Tr) and two days later received bilateral intra-PrL infusions of vehicle (Veh; NaCl 0.9%), the GluA2-containing AMPAR endocytosis inhibitor peptide, GluA2_{3Y} (100 pmol), or the scrambled control peptide, GluA2_{3Y(s)}} (100 pmol). Twenty-four hours later, long-term memory was evaluated in a 3 min-retention test. Animals treated with Veh, GluA2_{3Y} or GluA2_{3Y(s)}} did not differ in the amount of time spent freezing (n Veh = 7, n GluA2_{3Y} = 8; n GluA2_{3Y(s)}} = 8). Percentages of time spent freezing on the first 2 min of Tr and on the 3-min retention test were analyzed by two-way repeated measures ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test. Data expressed as mean \pm S.E.M. (Upper) Schematic representation of the behavioral protocols.

Effect of ZIP infusion into the PrL on the maintenance of remote contextual fear memory

In order to verify whether PKM ζ is necessary in the PrL for the maintenance of remote CFC memory, different groups of animals received bilateral intra-PrL infusions of ZIP (10 nmol) or vehicle (Veh; NaCl 0.9%) twenty days after CFC training session and were tested 24 h later (Fig. 4). Two-way repeated-measures ANOVA showed effects of session ($F_{(1,19)} = 92.99$, $p < 0.0001$), treatment ($F_{(1,19)} = 21.83$, $p = 0.0002$) and interaction between factors ($F_{(1,19)} = 22.09$, $p < 0.0002$). Bonferroni's posttest revealed that while there were no differences between groups during training session ($p > 0.05$), animals that were treated with ZIP displayed significantly less freezing behavior during the retention test than the Veh-treated ones ($p < 0.0001$; n Veh = 11, n ZIP = 10). This result suggests that ZIP impaired the maintenance of remote CFC memory and, therefore, PKM ζ activity in the PrL is required for the persistence of remote CFC memory.

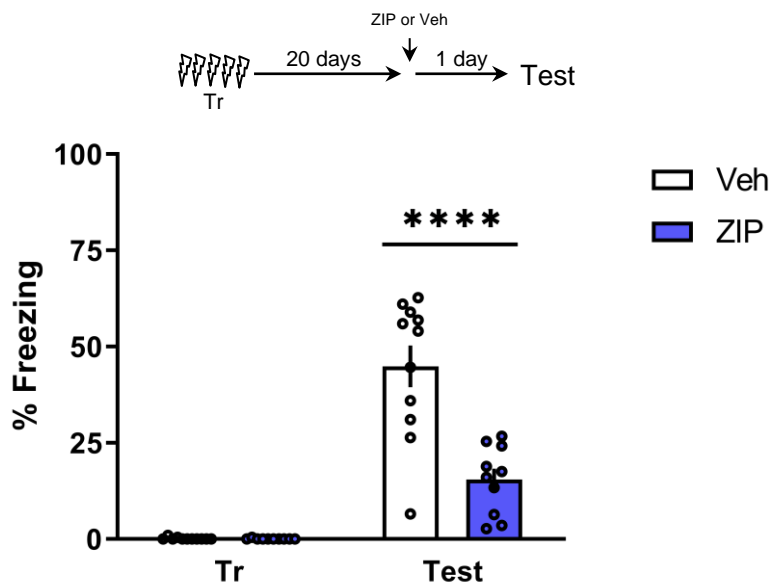


Figure 4 – Intra-PrL infusion of ZIP impairs remote CFC memory. Animals were subjected to CFC training session (Tr) and twenty days later received bilateral intra-PrL infusions of vehicle (Veh; NaCl 0.9%) or of the PKM ζ inhibitor, ZIP (10 nmol). Twenty-four hours later, long-term memory was evaluated in a 3 min-retention test. Animals treated with ZIP spent significantly less time in freezing than animals treated with Veh (n Veh = 11, n ZIP = 10). Percentages of time spent freezing on the first 2 min of Tr and on the 3-min retention test were analyzed by two-way repeated measures ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test. Data expressed as mean \pm S.E.M. **** $p < 0.0001$ Veh vs. ZIP. (Upper) Schematic representation of the behavioral protocols.

Effect of GluA2_{3Y} and GluA2_{3Y(s)} infusions into the PrL on the maintenance of remote contextual fear memory

In order to investigate whether the inhibition of GluA2-dependent AMPAR endocytosis alters the maintenance of remote CFC memory, different groups of animals received bilateral intra-PrL infusions of GluA2_{3Y} (100 pmol), GluA2_{3Y(s)} (100 pmol) or vehicle (Veh; NaCl 0.9%) twenty days after CFC training session and were tested 24 h later (Fig. 5). Two-way repeated-measures ANOVA showed an effect of session ($F_{(1,29)} = 95.24$, $p < 0.0001$), but no effect of treatment ($F_{(2,29)} = 0.2178$, $p = 0.8056$) or session x treatment interaction ($F_{(2,29)} = 0.2198$, $p = 0.8040$). Bonferroni's posttest revealed neither difference between groups during training session ($p > 0.05$) nor during the retention test ($p > 0.05$; n Veh = 11, n GluA2_{3Y} = 11, n GluA2_{3Y(s)} = 10), when all groups spent similar amounts of time in freezing behavior. Therefore, blocking the endocytosis of GluA2-containing AMPAR *per se* does not affect remote CFC memory persistence.

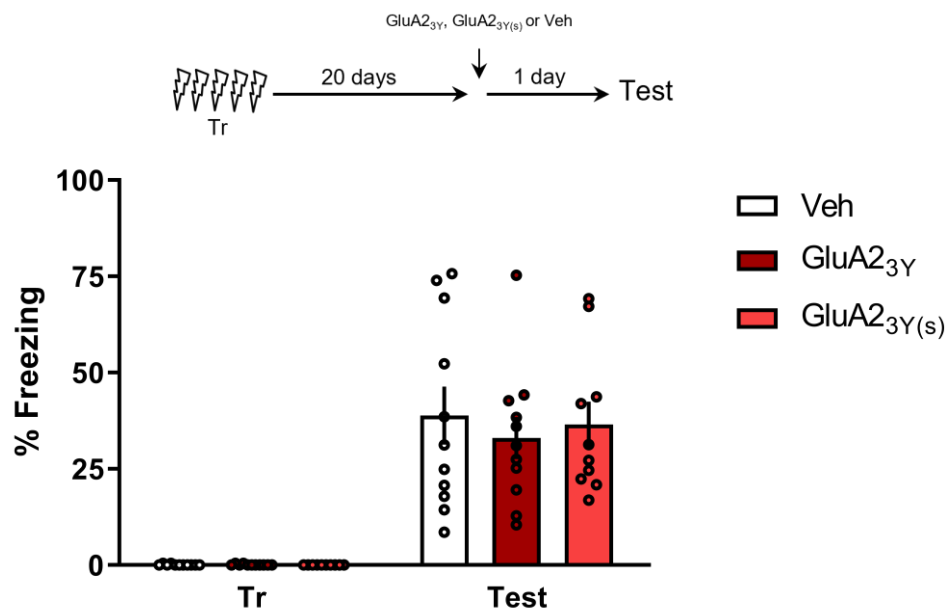


Figure 5 – Intra-PrL infusions of GluA2_{3Y} or GluA2_{3Y(s)} do not affect remote CFC memory. Animals were subjected to CFC training session (Tr) and twenty days later received bilateral intra-PrL infusions of vehicle (Veh; NaCl 0.9%), the GluA2-containing AMPAR endocytosis inhibitor peptide, GluA2_{3Y} (100 pmol), or the scrambled control peptide, GluA2_{3Y(s)} (100 pmol). Twenty-four hours later, long-term memory was evaluated in a 3 min-retention test. Animals treated with Veh, GluA2_{3Y}, GluA2_{3Y(s)} did not differ in the amount of time spent freezing (n Veh = 11, n GluA2_{3Y} =

11; n GluA2_{3Y(s)} = 10). Percentages of time spent freezing on the first 2 min of Tr and on the 3-min retention test were analyzed by two-way repeated measures ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test. Data expressed as mean \pm S.E.M. (Upper) Schematic representation of the behavioral protocols.

Effect of GluA2_{3Y} and GluA2_{3Y(s)} infusions into the PrL on the impairment induced by ZIP on the maintenance of remote contextual fear memory

Since PKM ζ has been shown to maintain memories in the amygdala and in the hippocampus by inhibiting GluA2-containing AMPAR endocytosis (Migues et al., 2010), we sought to investigate whether PKM ζ acts via the same mechanism to maintain remote CFC memory in the prelimbic cortex. For this purpose, animals received bilateral intra-PrL infusions of ZIP (10 nmol), ZIP (10 nmol) plus GluA2_{3Y} (100 pmol), ZIP (10 nmol) plus GluA2_{3Y(s)} (100 pmol) or vehicle (Veh; NaCl 0.9%) twenty days after CFC training session and were tested 24 h later (Fig. 6). Two-way repeated-measures ANOVA showed effects of session ($F_{(1,33)} = 145.6$, $p < 0.0001$), treatment ($F_{(3,33)} = 10.28$, $p < 0.0001$) and session x treatment interaction ($F_{(3,33)} = 10.37$, $p < 0.0001$). Bonferroni's posttest detected no differences among groups during training ($p > 0.05$), but revealed that animals that received infusions of ZIP ($n = 10$) or ZIP + GluA2_{3Y(s)} ($n = 10$) spent significantly less time freezing when compared with those who received Veh ($p < 0.0001$; n Veh = 10) or ZIP + GluA2_{3Y} ($p < 0.0001$; n ZIP + GluA2_{3Y} = 7). Also, the group that received ZIP + GluA2_{3Y} did not differ from the group that received Veh ($p > 0.05$), neither did the group that received ZIP + GluA2_{3Y(s)} differ from ZIP ($p > 0.05$). This set of results suggests that inhibition of GluA2-dependent AMPARs internalization with GluA2_{3Y} prevents ZIP's amnesic effect, while the inactive GluA2_{3Y(s)} fails to impede the memory deficit. Therefore, the results indicate that PKM ζ maintains remote CFC memory in the prelimbic cortex by preventing the removal of GluA2-containing AMPARs from the synapses.

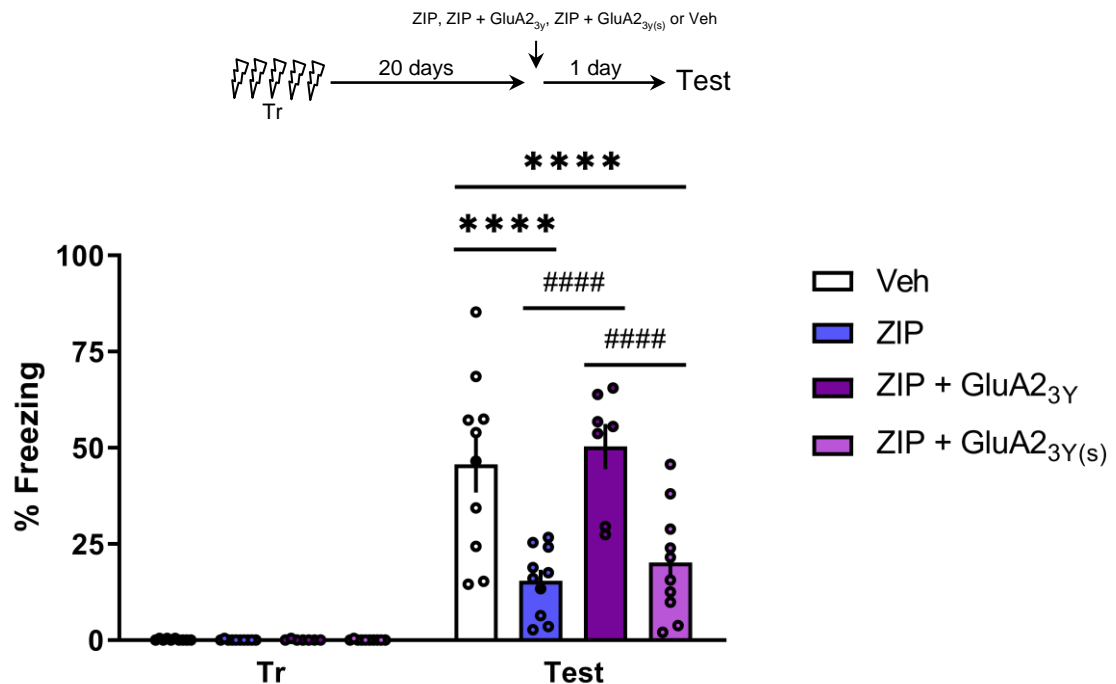


Figure 6 – Intra-PrL infusion of GluA2_{3Y} prevents the impairment induced by ZIP on remote CFC memory. Animals were subjected to CFC training session (Tr) and twenty days later received bilateral intra-PrL infusions of vehicle (Veh; NaCl 0.9%), the PKM ζ inhibitor ZIP (10 nmol), ZIP (10 nmol) + GluA2_{3Y} (100 pmol) or ZIP (10 nmol) + GluA2_{3Y(s)} (100 pmol). Twenty-four hours later, long-term memory was evaluated in a 3 min-retention test. Animals treated with ZIP or with ZIP + GluA2_{3Y(s)} spent significantly less time in freezing than animals treated with Veh or with ZIP + GluA2_{3Y} (n Veh = 10, n ZIP = 10, n ZIP + GluA2_{3Y} = 7, n ZIP + GluA2_{3Y(s)} = 10). Percentages of time spent freezing on the first 2 min of Tr and on the 3-min retention test were analyzed by two-way repeated measures ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test. Data expressed as mean \pm S.E.M. **** $p < 0.0001$ vs. Veh; #### $p < 0.0001$ vs. ZIP + GluA2_{3Y}. (Upper) Schematic representation of the behavioral protocols.

Discussion

In the present study we investigated the role of PKM ζ and GluA2-containing AMPARs in the PrL on the maintenance of recent and remote contextual fear memories. We found that inhibition of PKM ζ in the PrL does not affect the maintenance of contextual fear memory at a recent time point. We also show that acute inhibition of GluA2-containing AMPAR endocytosis in the PrL *per se* does not alter the maintenance of

neither recent nor remote contextual fear memories. However, we demonstrated that PKM ζ activity in the PrL supports the persistence of remote contextual fear memory. Moreover, we showed that PKM ζ maintains remote contextual fear memory in the PrL by inhibiting the internalization of GluA2-containing AMPARs.

The theory of systems consolidation posits that as memories get older their dependence shifts from the hippocampus to neocortical areas (Frankland et al., 2004; Frankland and Bontempi, 2005; Kitamura et al., 2017; Squire, 1992). In this regard, it has been demonstrated that contextual fear conditioning forms engram neurons in the prelimbic region early during conditioning, but these cells are immature and cannot drive natural memory retrieval at this stage. Over time, with inputs from the hippocampus, these cells mature and become central in promoting remote contextual fear memory retrieval (Kitamura et al., 2017). Another study found that, in cued fear conditioning, although neurons in the PrL recruited at the time of conditioning make smaller contributions to remote memory retrieval than cells recruited later in time, early PrL activity is required for the reorganization of the ensemble (DeNardo et al., 2019). Also, recent studies found perseverant changes in the PrL following CFC (Chaaya et al., 2021; Pan et al., 2020). It has been described that CFC induces oligodendrogenesis and myelin formation in the PrL, which are essential for the preservation of remote, but not recent, contextual fear memory (Pan et al., 2020). CFC has also been shown to produce immunohistochemical alterations in the PrL that are detectable two weeks after conditioning, such as an increase in the number of phospho-mitogen activated protein kinase-expressing neurons and brain-derived neurotrophic factor-expressing cells (Chaaya et al., 2021). In our study, we found that PKM ζ underlies the maintenance of remote, but not recent, contextual fear memory in the PrL by inhibiting the internalization of GluA2-containing AMPARs. Our findings corroborate the notion that PrL serves as a fundamental site for memory storage, especially during remote time points, and provide a molecular mechanism for the maintenance of the prelimbic memory trace.

Moreover, our results are in line with previous studies that have pointed to a role for prelimbic PKM ζ in fear memory processing. CFC increases the expression of PKM ζ and GluA2 in the PrL of young and adult rats, but not in aged rats with cognitive impairment, however, PKM ζ overexpression is able to block the memory deficits in the latter (Chen et al., 2016). Furthermore, overexpression of PKM ζ in the PrL, but

not in the infralimbic cortex, enhances memory formation for tone fear conditioning and increases membrane levels of the GluA2 subunit (Xue et al., 2015).

Persistence of contextual fear memory following reactivation has also shown to be dependent on prelimbic PKM ζ (da Silva et al., 2020). This study found no impairment in remote memory expression when ZIP was infused in the PrL without memory reactivation. However, their infusion took place one day after conditioning, a time point when prelimbic engram neurons might not yet require PKM ζ , since they are still not able to support memory retrieval (Kitamura et al., 2017). Moreover, reports have shown that memory maintenance mechanisms are insensitive to ZIP during or immediately after memory encoding, and ZIP's ability to induce amnesia might be reengaged roughly two days after acquisition or retrieval (Levitan et al., 2016; Shema et al., 2009).

Amnesia in experiments that involve inhibition of PKM ζ during the memory maintenance phase has traditionally been interpreted as a result of memory erasure (Sacktor, 2011; Sacktor and Fenton, 2018). However, the distinction between retrieval and storage failure explanations for retrograde amnesia has been a long-standing debate in neuroscience (Gold and King, 1974; Hardt et al., 2009). It has been recently proposed that synaptic plasticity may not be required for the actual storage of learned information, but rather to permit access to it, i.e., to enable memory retrieval (Roy et al., 2017; Ryan et al., 2015). Taking this into account, amnesia that results from experiments that interfere with synaptic plasticity mechanisms, including ours, could possibly reflect that the memory is inaccessible albeit still inscribed in the brain. Nevertheless, since memory utility for organisms depends intrinsically on its ability to be retrieved, PKM ζ and other synaptic plasticity mechanisms remains key for the physiology of memory.

It is important to mention that we chose to compare ZIP with vehicle and not with its scrambled version (Scr-ZIP) to avoid potential confounding factors in our results, since reports indicate that Scr-ZIP retains the ability to inhibit PKM ζ , even though with considerably lower affinity (Lee et al., 2013). ZIP also seems to be less specific than originally thought (Lee et al., 2013; Song et al., 2020; Volk et al., 2013). Besides PKM ζ , ZIP also inhibits PKC ι/λ , a related atypical enzyme from the PKC family (Tsokas et al., 2016; Wang et al., 2016). However, while PKM ζ acts on the maintenance of long-term potentiation (Ling et al., 2002; Sacktor et al., 1993; Yao et

al., 2008) and the persistence of long-term memories (Kwapis et al., 2012; Pastalkova et al., 2006; Serrano et al., 2008; Shema et al., 2007), PKC ι/λ is involved on the induction of long-term potentiation and early memory consolidation (Wang et al., 2016), and it only supports memory maintenance in PKM ζ -knockout animals (Tsokas et al., 2016). Besides that, PKC ι/λ exerts its actions via interactions with the GluA1 subunit (Ren et al., 2013), while PKM ζ interacts specifically with the GluA2 subunit (Migues et al., 2010; Xue et al., 2015; Yao et al., 2008).

Recently, additional mechanisms were described by which ZIP interferes with the maintenance of memories. ZIP was found to activate glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3 β) *in vitro*, and GSK-3 β blockade attenuated both ZIP-induced depotentiation of lateral amygdala synapses potentiated by fear and ZIP-induced disruption of learned fear (Song et al., 2020). Another work found that ZIP might act as an arginine donor, and that its effects on synaptic plasticity and memory would depend on a nitric-oxide-dependent downregulation of AMPARs that contain the GluA1 subunit (Bingor et al., 2020). Although we cannot completely rule out the influence of such mechanisms on the results we observed, the fact that administration of the selective GluA2-containing AMPAR endocytosis inhibitor peptide, GluA2_{3Y}, but not of its scrambled inactive version, GluA2_{3Y(s)}, completely reversed the memory deficits induced by ZIP, strongly supports our hypothesis that PKM ζ inhibition in the PrL degrades the remote memory trace by promoting GluA2-AMPA internalization.

AMPA receptors are composed of four subunits, GluA1-GluA4, which assemble into a tetrameric structure. Different subunit combinations endow the receptor with distinct functional properties (Shepherd and Huganir, 2007). While AMPARs lacking GluA2 subunit allow the passage of calcium ions, GluA2-containing AMPARs are calcium-impermeable (Diering and Huganir, 2018). GluA2-lacking AMPA receptors (e.g. GluA1 homomers) are involved in acute synaptic plasticity, being rapidly delivered to synapses following LTP induction and experience-dependent synaptic plasticity (Clem and Barth, 2006; Plant et al., 2006; Choquet, 2010). These receptors, however, are less stable at the synapse, and are only transiently expressed, being subsequently replaced by GluA2-containing AMPARs (Shi et al., 2001; Malinow and Malenka, 2002; Man, 2011; Morita et al., 2014). GluA2 interacts with synaptic proteins to stabilize AMPARs at the synapse (Song et al., 1998; Shi et al., 2001; Yao

et al., 2008; Miguez et al., 2010) and also with extracellular molecules to maintain dendritic spines (Saglietti et al., 2007). Importantly, the amount of GluA2 in the synaptic membrane correlates both with the duration and the strength of long-term memories (Yao et al., 2008; Miguez et al., 2010; Tsokas et al., 2016; Gao et al., 2018). Hence, given that permeability to calcium influx renders GluA2-lacking AMPARs permissive to plastic events, these receptors are recruited early during learning, when the memory trace is still labile. On the other hand, during consolidation, GluA2-containing AMPARs replace those that lack the GluA2 subunit in order to stabilize the memory trace and support its maintenance.

Several studies have demonstrated that manipulation of GluA2-dependent AMPAR endocytosis during different epochs alters memory processes (Awasthi et al., 2019; Dong et al., 2015; Ferrara et al., 2019; Hong et al., 2013; Lopez et al., 2015; Miguez et al., 2016; Rao-Ruiz et al., 2011). Fear memory retrieval has been shown to depend on GluA2-containing AMPAR trafficking to synapses in the amygdala (Lopez et al., 2015). Also, fear memory retrieval induces GluA2-containing AMPAR endocytosis in both the hippocampus and the amygdala, which are critical for memory destabilization and subsequent reconsolidation, when they are reinserted into the membrane (Ferrara et al., 2019; Hong et al., 2013; Rao-Ruiz et al., 2011). Blockade of GluA2-dependent AMPAR endocytosis inhibits the decay of long-term potentiation (Awasthi et al., 2019; Dong et al., 2015) and promotes the conversion of a short-term inhibitory avoidance memory into a long-term one, when the blockade is performed immediately after training (Dong et al., 2015). On the other hand, forgetting requires the removal of GluA2-containing AMPARs from synapses (Awasthi et al., 2019), and chronic blockade of GluA2-dependent AMPAR endocytosis prolongs the retention of associative memories (Miguez et al., 2016). Our results corroborate and expand these findings by showing that acute inhibition of GluA2-dependent AMPAR endocytosis in the PrL during the maintenance phase does not affect recent or remote contextual fear memory persistence, and that prelimbic PKM ζ is in charge of maintaining these receptors at the membrane to preserve the remote contextual fear memory trace.

In summary, our study confirms the PrL as a cardinal site for remote fear memory storage and identifies PKM ζ -driven inhibition of GluA2-containing AMPAR endocytosis as a molecular mechanism underlying the persistence of the remote

contextual fear memory trace in this region. These findings may help to understand the differential contribution of the prelimbic cortex to fear memories over time and also to elucidate the molecular underpinnings of memory persistence.

Declaration of interest

None.

Acknowledgements

We dedicate this work to Professor Ivan Izquierdo, who will live forever in our memories. This work was supported by research grants from the National Council of Research of Brazil (CNPq), Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES Brazil, Finance Code 001).

References

- Awasthi, A., Ramachandran, B., Ahmed, S., Benito, E., Shinoda, Y., Nitzan, N., Heukamp, A., Rannio, S., Martens, H., Barth, J., Burk, K., Wang, Y.T., Fischer, A., Dean, C., 2019. Synaptotagmin-3 drives AMPA receptor endocytosis, depression of synapse strength, and forgetting. *Science* 363. <https://doi.org/10.1126/science.aav1483>
- Bacon, S.J., Headlam, A.J.N., Gabbott, P.L.A., Smith, A.D., 1996. Amygdala input to medial prefrontal cortex (mPFC) in the rat: A light and electron microscope study. *Brain Research* 720, 211–219. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(96\)00155-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(96)00155-2)
- Bingor, A., Haham, T., Thornton, C., Stern-Bach, Y., Yaka, R., 2020. Zeta Inhibitory Peptide attenuates learning and memory by inducing NO-mediated downregulation of AMPA receptors. *Nat Commun* 11, 3688. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17484-y>
- Chaaya, N., Wang, J., Jacques, A., Beecher, K., Chaaya, M., Battle, A.R., Johnson, L.R., Chehrehasa, F., Belmer, A., Bartlett, S.E., 2021. Contextual Fear Memory Maintenance Changes Expression of pMAPK, BDNF and IBA-1 in the Pre-limbic Cortex in a Layer-Specific Manner. *Front. Neural Circuits* 0. <https://doi.org/10.3389/fncir.2021.660199>
- Chen, C., Meng, S.-Q., Xue, Y.-X., Han, Y., Sun, C.-Y., Deng, J.-H., Chen, N., Bao, Y.-P., Zhang, F.-L., Cao, L.-L., Zhu, W.-G., Shi, J., Song, W.-H., Lu, L., 2016.

- Epigenetic modification of PKM ζ rescues aging-related cognitive impairment. *Sci Rep* 6, 22096. <https://doi.org/10.1038/srep22096>
- Choquet, D., 2010. Fast AMPAR trafficking for a high-frequency synaptic transmission. *European Journal of Neuroscience* 32, 250–260. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07350.x>
- Clem, R.L., Barth, A., 2006. Pathway-Specific Trafficking of Native AMPARs by In Vivo Experience. *Neuron* 49, 663–670. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.01.019>
- Corcoran, K.A., Quirk, G.J., 2007. Activity in Prelimbic Cortex Is Necessary for the Expression of Learned, But Not Innate, Fears. *J. Neurosci.* 27, 840–844.
- da Silva, T.R., Raymundi, A.M., Bertoglio, L.J., Andreatini, R., Stern, C.A., 2020. Role of prelimbic cortex PKC and PKM ζ in fear memory reconsolidation and persistence following reactivation. *Sci Rep* 10, 4076. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60046-x>
- DeNardo, L.A., Liu, C.D., Allen, W.E., Adams, E.L., Friedmann, D., Fu, L., Guenther, C.J., Tessier-Lavigne, M., Luo, L., 2019. Temporal evolution of cortical ensembles promoting remote memory retrieval. *Nat Neurosci* 22, 460–469. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0318-7>
- Diering, G.H., Huganir, R.L., 2018. The AMPA Receptor Code of Synaptic Plasticity. *Neuron* 100, 314–329. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.10.018>
- Do-Monte, F.H., Quinones-Laracuenta, K., Quirk, G.J., 2015. A temporal shift in the circuits mediating retrieval of fear memory. *Nature* 519, 460–463. <https://doi.org/10.1038/nature14030>
- Dong, Z., Han, H., Li, H., Bai, Y., Wang, W., Tu, M., Peng, Y., Zhou, L., He, W., Wu, Xiaobin, Tan, T., Liu, M., Wu, Xiaoyan, Zhou, W., Jin, W., Zhang, S., Sacktor, T.C., Li, T., Song, W., Wang, Y.T., 2015. Long-term potentiation decay and memory loss are mediated by AMPAR endocytosis. *J Clin Invest* 125, 234–247. <https://doi.org/10.1172/JCI77888>
- Ferrara, N.C., Jarome, T.J., Cullen, P.K., Orsi, S.A., Kwapis, J.L., Trask, S., Pullins, S.E., Helmstetter, F.J., 2019. GluR2 endocytosis-dependent protein degradation in the amygdala mediates memory updating. *Sci Rep* 9, 5180. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41526-1>
- Frankland, P.W., Bontempi, B., 2005. The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci* 6, 119–130. <https://doi.org/10.1038/nrn1607>

- Frankland, P.W., Bontempi, B., Talton, L.E., Kaczmarek, L., Silva, A.J., 2004. The Involvement of the Anterior Cingulate Cortex in Remote Contextual Fear Memory. *Science* 304, 881–883. <https://doi.org/10.1126/science.1094804>
- Gabbott, P.L.A., Warner, T.A., Jays, P.R.L., Salway, P., Busby, S.J., 2005. Prefrontal cortex in the rat: Projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *Journal of Comparative Neurology* 492, 145–177. <https://doi.org/10.1002/cne.20738>
- Gao, P.P., Goodman, J.H., Sacktor, T.C., Francis, J.T., 2018. Persistent Increases of PKM ζ in Sensorimotor Cortex Maintain Procedural Long-Term Memory Storage. *iScience* 5, 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.07.002>
- Gilmartin, M.R., Helmstetter, F.J., 2010. Trace and contextual fear conditioning require neural activity and NMDA receptor-dependent transmission in the medial prefrontal cortex. *Learn. Mem.* 17, 289–296. <https://doi.org/10.1101/lm.1597410>
- Giustino, T.F., Maren, S., 2015. The Role of the Medial Prefrontal Cortex in the Conditioning and Extinction of Fear. *Front. Behav. Neurosci.* 9. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00298>
- Gold, P.E., King, R.A., 1974. Retrograde amnesia: Storage failure versus retrieval failure. *Psychological Review* 81, 465–469. <https://doi.org/10.1037/h0036949>
- Hardt, O., Wang, S.-H., Nader, K., 2009. Storage or retrieval deficit: The yin and yang of amnesia. *Learn. Mem.* 16, 224–230. <https://doi.org/10.1101/lm.1267409>
- Hernandez, A.I., Blace, N., Crary, J.F., Serrano, P.A., Leitges, M., Libien, J.M., Weinstein, G., Tcherapanov, A., Sacktor, T.C., 2003. Protein Kinase M ζ Synthesis from a Brain mRNA Encoding an Independent Protein Kinase C ζ Catalytic Domain: IMPLICATIONS FOR THE MOLECULAR MECHANISM OF MEMORY*. *Journal of Biological Chemistry* 278, 40305–40316. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307065200>
- Hong, I., Kim, Jeongyeon, Kim, Jihye, Lee, S., Ko, H.-G., Nader, K., Kaang, B.-K., Tsien, R.W., Choi, S., 2013. AMPA receptor exchange underlies transient memory destabilization on retrieval. *PNAS* 110, 8218–8223. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305235110>
- Hoover, W.B., Vertes, R.P., 2007. Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain Struct Funct* 212, 149–179. <https://doi.org/10.1007/s00429-007-0150-4>

- Izquierdo, I., Furini, C.R.G., Myskiw, J.C., 2016. Fear Memory. *Physiological Reviews* 96, 695–750. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2015>
- Jay, T.M., Glowinski, J., Thierry, A.-M., 1989. Selectivity of the hippocampal projection to the prelimbic area of the prefrontal cortex in the rat. *Brain Research* 505, 337–340. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)91464-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)91464-9)
- Jayachandran, M., Linley, S.B., Schlecht, M., Mahler, S.V., Vertes, R.P., Allen, T.A., 2019. Prefrontal Pathways Provide Top-Down Control of Memory for Sequences of Events. *Cell Reports* 28, 640-654.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.06.053>
- Josselyn, S.A., Tonegawa, S., 2020. Memory engrams: Recalling the past and imagining the future. *Science* 367. <https://doi.org/10.1126/science.aaw4325>
- Kitamura, T., Ogawa, S.K., Roy, D.S., Okuyama, T., Morrissey, M.D., Smith, L.M., Redondo, R.L., Tonegawa, S., 2017. Engrams and Circuits Crucial for Systems Consolidation of a Memory. *Science* 356, 73–78. <https://doi.org/10.1126/science.aam6808>
- Kwapis, J.L., Jarome, T.J., Gilmartin, M.R., Helmstetter, F.J., 2012. Intra-amygdala infusion of the protein kinase Mzeta inhibitor ZIP disrupts foreground context fear memory. *Neurobiol Learn Mem* 98, 148–153. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2012.05.003>
- Kwapis, J.L., Jarome, T.J., Lonergan, M.E., Helmstetter, F.J., 2009. Protein kinase Mzeta maintains fear memory in the amygdala but not in the hippocampus. *Behav Neurosci* 123, 844–850. <https://doi.org/10.1037/a0016343>
- Lee, A.M., Kanter, B.R., Wang, D., Lim, J.P., Zou, M.E., Qiu, C., McMahon, T., Dadgar, J., Fischbach-Weiss, S.C., Messing, R.O., 2013. Prkcz null mice show normal learning and memory. *Nature* 493, 416–419. <https://doi.org/10.1038/nature11803>
- Levitan, D., Fortis-Santiago, Y., Figueroa, J.A., Reid, E.E., Yoshida, T., Barry, N.C., Russo, A., Katz, D.B., 2016. Memory Retrieval Has a Dynamic Influence on the Maintenance Mechanisms That Are Sensitive to ζ -Inhibitory Peptide (ZIP). *J Neurosci* 36, 10654–10662. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1568-16.2016>
- Ling, D.S.F., Benardo, L.S., Serrano, P.A., Blace, N., Kelly, M.T., Crary, J.F., Sacktor, T.C., 2002. Protein kinase M ζ is necessary and sufficient for LTP maintenance. *Nat Neurosci* 5, 295–296. <https://doi.org/10.1038/nn829>

- Lopez, J., Gamache, K., Schneider, R., Nader, K., 2015. Memory Retrieval Requires Ongoing Protein Synthesis and NMDA Receptor Activity-Mediated AMPA Receptor Trafficking. *J. Neurosci.* 35, 2465–2475. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0735-14.2015>
- Lynch, M.A., 2004. Long-Term Potentiation and Memory. *Physiological Reviews* 84, 87–136. <https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2003>
- Malenka, R.C., Bear, M.F., 2004. LTP and LTD: An Embarrassment of Riches. *Neuron* 44, 5–21. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.09.012>
- Malinow, R., Malenka, R.C., 2002. AMPA Receptor Trafficking and Synaptic Plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* 25, 103–126. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.25.112701.142758>
- Man, H.-Y., 2011. GluA2-lacking, calcium-permeable AMPA receptors — inducers of plasticity? *Current Opinion in Neurobiology, Synaptic function and regulation* 21, 291–298. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.01.001>
- Maren, S., 2001. Neurobiology of Pavlovian Fear Conditioning. *Annual Review of Neuroscience* 24, 897–931. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.897>
- Maren, S., Phan, K.L., Liberzon, I., 2013. The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. *Nat Rev Neurosci* 14, 417–428. <https://doi.org/10.1038/nrn3492>
- McDonald, A.J., Mascagni, F., Guo, L., 1996. Projections of the medial and lateral prefrontal cortices to the amygdala: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat. *Neuroscience* 71, 55–75. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00417-3](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00417-3)
- Migues, P.V., Hardt, O., Wu, D.C., Gamache, K., Sacktor, T.C., Wang, Y.T., Nader, K., 2010. PKM ζ maintains memories by regulating GluR2-dependent AMPA receptor trafficking. *Nat Neurosci* 13, 630–634. <https://doi.org/10.1038/nn.2531>
- Migues, P.V., Liu, L., Archbold, G.E.B., Einarsson, E.Ö., Wong, J., Bonasia, K., Ko, S.H., Wang, Y.T., Hardt, O., 2016. Blocking Synaptic Removal of GluA2-Containing AMPA Receptors Prevents the Natural Forgetting of Long-Term Memories. *J. Neurosci.* 36, 3481–3494. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3333-15.2016>
- Morita, D., Rah, J.C., Isaac, J.T.R., 2014. Incorporation of inwardly rectifying AMPA receptors at silent synapses during hippocampal long-term potentiation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 369, 20130156. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0156>

- Pan, S., Mayoral, S.R., Choi, H.S., Chan, J.R., Kheirbek, M.A., 2020. Preservation of a remote fear memory requires new myelin formation. *Nat Neurosci* 23, 487–499. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0582-1>
- Pastalkova, E., Serrano, P., Pinkhasova, D., Wallace, E., Fenton, A.A., Sacktor, T.C., 2006. Storage of Spatial Information by the Maintenance Mechanism of LTP. *Science* 313, 1141–1144. <https://doi.org/10.1126/science.1128657>
- Plant, K., Pelkey, K.A., Bortolotto, Z.A., Morita, D., Terashima, A., McBain, C.J., Collingridge, G.L., Isaac, J.T.R., 2006. Transient incorporation of native GluR2-lacking AMPA receptors during hippocampal long-term potentiation. *Nat Neurosci* 9, 602–604. <https://doi.org/10.1038/nn1678>
- Rajasethupathy, P., Sankaran, S., Marshel, J.H., Kim, C.K., Ferenczi, E., Lee, S.Y., Berndt, A., Ramakrishnan, C., Jaffe, A., Lo, M., Liston, C., Deisseroth, K., 2015. Projections from neocortex mediate top-down control of memory retrieval. *Nature* 526, 653–659. <https://doi.org/10.1038/nature15389>
- Rao-Ruiz, P., Rotaru, D.C., van der Loo, R.J., Mansvelder, H.D., Stiedl, O., Smit, A.B., Spijker, S., 2011. Retrieval-specific endocytosis of GluA2-AMPA receptors underlies adaptive reconsolidation of contextual fear. *Nat Neurosci* 14, 1302–1308. <https://doi.org/10.1038/nn.2907>
- Rao-Ruiz, P., Visser, E., Mitrić, M., Smit, A.B., van den Oever, M.C., 2021. A Synaptic Framework for the Persistence of Memory Engrams. *Front. Synaptic Neurosci.* 0. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2021.661476>
- Ren, S.-Q., Yan, J.-Z., Zhang, X.-Y., Bu, Y.-F., Pan, W.-W., Yao, W., Tian, T., Lu, W., 2013. PKC λ is critical in AMPA receptor phosphorylation and synaptic incorporation during LTP. *EMBO J* 32, 1365–1380. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.60>
- Rizzo, V., Touzani, K., Raveendra, B.L., Swarnkar, S., Lora, J., Kadakkuzha, B.M., Liu, X.-A., Zhang, C., Betel, D., Stackman, R.W., Puthanveetil, S.V., 2017. Encoding of Contextual Fear Memory Requires De Novo Proteins in the Prelimbic Cortex. *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging* 2, 158–169. <https://doi.org/10.1016/j.bpsc.2016.10.002>
- Roy, D.S., Muralidhar, S., Smith, L.M., Tonegawa, S., 2017. Silent memory engrams as the basis for retrograde amnesia. *PNAS* 114, E9972–E9979. <https://doi.org/10.1073/pnas.1714248114>

- Ryan, T.J., Roy, D.S., Pignatelli, M., Arons, A., Tonegawa, S., 2015. Engram cells retain memory under retrograde amnesia. *Science* 348, 1007–1013. <https://doi.org/10.1126/science.aaa5542>
- Sacktor, T.C., 2011. How does PKM ζ maintain long-term memory? *Nature Reviews Neuroscience* 12, 9–15. <https://doi.org/10.1038/nrn2949>
- Sacktor, T.C., Fenton, A.A., 2018. What does LTP tell us about the roles of CaMKII and PKM ζ in memory? *Molecular Brain* 11, 77. <https://doi.org/10.1186/s13041-018-0420-5>
- Sacktor, T.C., Osten, P., Valsamis, H., Jiang, X., Naik, M.U., Sublette, E., 1993. Persistent activation of the zeta isoform of protein kinase C in the maintenance of long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8342–8346.
- Saglietti, L., Dequidt, C., Kamieniarz, K., Rousset, M.-C., Valnegri, P., Thoumine, O., Beretta, F., Fagni, L., Choquet, D., Sala, C., Sheng, M., Passafaro, M., 2007. Extracellular Interactions between GluR2 and N-Cadherin in Spine Regulation. *Neuron* 54, 461–477. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.04.012>
- Serrano, P., Friedman, E.L., Kenney, J., Taubenfeld, S.M., Zimmerman, J.M., Hanna, J., Alberini, C., Kelley, A.E., Maren, S., Rudy, J.W., Yin, J.C.P., Sacktor, T.C., Fenton, A.A., 2008. PKM ζ Maintains Spatial, Instrumental, and Classically Conditioned Long-Term Memories. *PLOS Biology* 6, e318. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060318>
- Shema, R., Hazvi, S., Sacktor, T.C., Dudai, Y., 2009. Boundary conditions for the maintenance of memory by PKM ζ in neocortex. *Learn. Mem.* 16, 122–128. <https://doi.org/10.1101/lm.1183309>
- Shema, R., Sacktor, T.C., Dudai, Y., 2007. Rapid Erasure of Long-Term Memory Associations in the Cortex by an Inhibitor of PKM ζ . *Science* 317, 951–953. <https://doi.org/10.1126/science.1144334>
- Shepherd, J.D., Huganir, R.L., 2007. The Cell Biology of Synaptic Plasticity: AMPA Receptor Trafficking. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23, 613–643. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123516>
- Shi, S.-H., Hayashi, Y., Esteban, J.A., Malinow, R., 2001. Subunit-Specific Rules Governing AMPA Receptor Trafficking to Synapses in Hippocampal Pyramidal Neurons. *Cell* 105, 331–343. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00321-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00321-X)

- Sierra-Mercado, D., Padilla-Coreano, N., Quirk, G.J., 2011. Dissociable Roles of Prelimbic and Infralimbic Cortices, Ventral Hippocampus, and Basolateral Amygdala in the Expression and Extinction of Conditioned Fear. *Neuropsychopharmacology* 36, 529–538. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.184>
- Song, I., Kamboj, S., Xia, J., Dong, H., Liao, D., Huganir, R.L., 1998. Interaction of the N-Ethylmaleimide–Sensitive Factor with AMPA Receptors. *Neuron* 21, 393–400. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80548-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80548-6)
- Song, S., Kim, Jihye, Park, K., Lee, J., Park, S., Lee, S., Kim, Jeongyeon, Hong, I., Song, B., Choi, S., 2020. GSK-3 β activation is required for ZIP-induced disruption of learned fear. *Sci Rep* 10, 18227. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75130-5>
- Squire, L.R., 1992. Memory and the hippocampus: A synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychological Review* 99, 195. <https://doi.org/10.1037/0033-295X.99.2.195>
- Takeuchi, T., Duzskiewicz, A.J., Morris, R.G.M., 2014. The synaptic plasticity and memory hypothesis: encoding, storage and persistence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 369, 20130288. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0288>
- Tonegawa, S., Liu, X., Ramirez, S., Redondo, R., 2015. Memory Engram Cells Have Come of Age. *Neuron* 87, 918–931. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.08.002>
- Tsokas, P., Hsieh, C., Yao, Y., Lesburguères, E., Wallace, E.J.C., Tcherepanov, A., Jothianandan, D., Hartley, B.R., Pan, L., Rivard, B., Farese, R.V., Sajan, M.P., Bergold, P.J., Hernández, A.I., Cottrell, J.E., Shouval, H.Z., Fenton, A.A., Sacktor, T.C., 2016. Compensation for PKM ζ in long-term potentiation and spatial long-term memory in mutant mice. *eLife* 5, e14846. <https://doi.org/10.7554/eLife.14846>
- Twining, R.C., Lepak, K., Kirry, A.J., Gilmartin, M.R., 2020. Ventral Hippocampal Input to the Prelimbic Cortex Dissociates the Context from the Cue Association in Trace Fear Memory. *J. Neurosci.* 40, 3217–3230.
- Vertes, R.P., 2004. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse* 51, 32–58. <https://doi.org/10.1002/syn.10279>
- Volk, L.J., Bachman, J.L., Johnson, R., Yu, Y., Huganir, R.L., 2013. PKM- ζ is not required for hippocampal synaptic plasticity, learning and memory. *Nature* 493, 420–423. <https://doi.org/10.1038/nature11802>

- Wang, S., Sheng, T., Ren, S., Tian, T., Lu, W., 2016. Distinct Roles of PKC ι/λ and PKM ζ in the Initiation and Maintenance of Hippocampal Long-Term Potentiation and Memory. *Cell Reports* 16, 1954–1961. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.030>
- Xue, Y.-X., Zhu, Z.-Z., Han, H.-B., Liu, J.-F., Meng, S.-Q., Chen, C., Yang, J.-L., Wu, P., Lu, L., 2015. Overexpression of Protein Kinase M ζ in the Prelimbic Cortex Enhances the Formation of Long-Term Fear Memory. *Neuropsychopharmacology* 40, 2146–2156. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.56>
- Yao, Y., Kelly, M.T., Sajikumar, S., Serrano, P., Tian, D., Bergold, P.J., Frey, J.U., Sacktor, T.C., 2008. PKM ζ Maintains Late Long-Term Potentiation by N-Ethylmaleimide-Sensitive Factor/GluR2-Dependent Trafficking of Postsynaptic AMPA Receptors. *J. Neurosci.* 28, 7820–7827.
- Yu, N.-K., Uhm, H., Shim, J., Choi, J.-H., Bae, S., Sacktor, T.C., Hohng, S., Kaang, B.-K., 2017. Increased PKM ζ activity impedes lateral movement of GluA2-containing AMPA receptors. *Mol Brain* 10, 56. <https://doi.org/10.1186/s13041-017-0334-7>

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesta dissertação de mestrado indicam que:

- A inibição aguda da endocitose de receptores AMPA contendo a subunidade GluA2, no córtex pré-límbico, não interfere com a memória recente ou com a memória remota de medo condicionado ao contexto.
- A enzima PKM ζ não é necessária, no córtex pré-límbico, para a manutenção da memória recente de medo condicionado ao contexto.
- A PKM ζ é necessária, no córtex pré-límbico, para a manutenção da memória remota de medo condicionado ao contexto.
- A PKM ζ mantém a memória remota de medo condicionado ao contexto através do bloqueio da endocitose de receptores AMPA contendo a subunidade GluA2, no córtex pré-límbico.

Estes resultados contribuem para o entendimento do papel diferencial do córtex pré-límbico ao longo do tempo para a memória de medo e também identificam um mecanismo molecular fundamental para sua manutenção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, W. C., JONES, O. D., GLANZMAN D. L. Is plasticity of synapses the mechanism of long-term memory storage? **NPJ Science of Learning**, v. 4, n. 9, 2019.

ALONSO, M. *et al.* Aversive Experiences Are Associated with a Rapid and Transient Activation of ERKs in the Rat Hippocampus. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 77, n. 1, p. 119-124, 2002.

ANAGNOSTARAS, S.G., GALE, G. D., FANSELOW, M.S. Hippocampus and Contextual Fear Conditioning: Recent Controversies and Advances. **Hippocampus**. Chichester, Inglaterra. v. 11, n. 1, p. 8-17, 2001.

ASOK, A. *et al.* Molecular mechanisms of the memory trace. **Trends in Neurosciences**, v. 42, n. 1, p. 14-22, 2019.

BACON *et al.* Amygdala input to medial prefrontal cortex (mPFC) in the rat: A light and electron microscope study. **Brain Research**, v. 720, v.1-2, p. 211-219, 1996.

BADDELEY, A. D. Working memory. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 302, n. 1110, p. 311–324, 1983.

BADDELEY, A. Working memory. **Current Biology**, v. 20, n. 4, p. 136–140, 2010.

BADDELEY, A. D., & WARRINGTON, E. K. Amnesia and the distinction between long- and short-term memory. **Journal of Verbal Learning and Verbal Behavior**, v. 9, n. 2, p. 176–189, 1970.

BEKINSCHTEIN, P. *et al.* Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. **Neuron**, v. 53, n.2, p. 261-277, 2007.

BINGOR, A. *et al.* Zeta Inhibitory Peptide attenuates learning and memory by inducing NO-mediated downregulation of AMPA receptors. **Nature Communications**. v. 11, n. 1, 2020.

BISHOP, N. A., LU, T., YANKNER, B. A. Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. **Nature**, v. 464, n. 7288, p. 529-535, 2010.

BLISS, T. V. P., & LØMO, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. **The Journal of Physiology**, v. 232, n. 2, p. 331–356, 1973.

BLISS, T. V. P. & COLLINGRIDGE, G. L. A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, v. 361, n. 6407, p. 31-39, 1993.

BUELL, S. J. & COLEMAN, P. D. Dendritic growth in the aged human brain and failure of growth in senile dementia. **Science**, v. 206, n. 4420 p. 854–856, 1979.

BURKE, N. S., BARNES, C. A. Neural plasticity in the ageing brain. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 1, p. 30-40, 2006.

CHAPMAN, P. F. *et al.* Long-term synaptic potentiation in the amygdala. **Synapse**, v. 6, n. 3, p. 271-278, 1990.

CHEN, C. *et al.* Epigenetic modification of PKM ζ rescues aging-related cognitive impairment. **Scientific Reports**, v. 6, n. 22096, 2016.

CLOSS, V. E.; SCHWANKE, C. H. A. A evolução do índice de envelhecimento no Brasil, nas suas regiões e unidades federativas no período de 1970 a 2010. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**. v.15, n.3, p. 443-458, 2012.

CLEM, R.L., BARTH, A. Pathway-Specific Trafficking of Native AMPARs by In Vivo Experience. **Neuron**, v. 49, n. 5, p. 663–670, 2006.

COLLINGRIDGE, G. L. *et al.* Long-term depression in the CNS. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, n. 7, p. 459-473, 2010.

CORCORAN, K.A. & QUIRK, G.J. Activity in prelimbic cortex is necessary for the expression of learned, but not innate, fears. **Journal of Neuroscience**. v. 27, n. 4, p. 840-844, 2010.

COWAN, N. What are the differences between long-term, short-term, and working memory? **Progress in Brain Research**, v. 169, p. 323-338, 2008.

CURZON P., RUSTAY, N. R., BROWMAN, K.E. Cued and Contextual Fear Conditioning for Rodents. *In*: BUCCAFUSCO, J. J. **Methods of Behavior Analysis in Neuroscience**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis, 2009. cap. 2, p. 1-17.

DA SILVA, T. R. *et al.* Role of prelimbic cortex PKC and PKM ζ in fear memory reconsolidation and persistence following reactivation. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2020.

DE BRABANDER, J. M., KRAMERS, R. J. & UYLINGS, H. B. Layer-specific dendritic regression of pyramidal cells with ageing in the human prefrontal cortex. **European Journal of Neuroscience**. v. 10, n. 4, p. 1261–1269 (1998).

DENARDO, L.A. *et al.* Temporal evolution of cortical ensembles promoting remote memory retrieval. **Nature Neuroscience**. v. 22, n. 3, p. 460-469, 2019.

DIERING, G. H. & HUGANIR, R. L. The AMPA receptor code of synaptic plasticity. **Neuron**, v. 100, n. 2, p. 314-329, 2018.

DO-MONTE, F.H., QUINONES-LARACUENTE, K. & QUIRK, G.J. A temporal shift in the circuits mediating retrieval of fear memory. **Nature**. v. 519, n. 7544, p. 460-463, 2015.

DRACHMAN, D. A. Memory and the Hippocampal Complex. **Archives of Neurology**, v. 15, n. 1, p. 52-61, 1966.

DUDEK, S. M. & BEAR, M. F. Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n.10, p. 4363–4367, 1992.

FLOOD, D. G., BUELL, S. J., DEFIORRE, C. H., HORWITZ, G. J. & COLEMAN, P. D. Age-related dendritic growth in dentate gyrus of human brain is followed by regression in the 'oldest old'. **Brain Research**. v. 345, n. 2, p. 366–368 ,1985.

FLOOD, D. G. Critical issues in the analysis of dendritic extent in aging humans, primates, and rodents. **Neurobiology of Aging**, v. 14, n. 6, p. 649–654 ,1993.

GABBOTT, P. L. A. *et al.* Prefrontal cortex in the rat: Projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. **Journal of Comparative Neurology**, v. 492, n. 2, p. 145-177, 2005.

GAO, P.P. *et al.* Persistent increases of PKM ζ in sensorimotor cortex maintain procedural long-term memory storage. **iScience**, v. 5, p. 90–98, 2018.

GILMARTIN, M.R. & HELMSTETTER, F.J. Trace and contextual fear conditioning require neural activity and NMDA receptor-dependent transmission in the medial prefrontal cortex. **Learning and Memory**. v. 17, n. 6, p. 289-296, 2010.

GIUSTINO, T. F. & MAREN, S. The role of the medial prefrontal cortex in the conditioning and extinction of fear. **Frontier in Behavioral Neuroscience**, v. 9, p. 1-20, 2015.

GOLDMAN-RAKIC, P. S. Cellular basis of working memory. **Neuron**, v. 14, n.3, p. 477–485, 1995.

HEBB, D.O. **The organization of behavior: a neuropsychological theory**. Nova lorque: Wiley, 1949.

HERNANDEZ, A. I. *et al.* Protein kinase M ζ synthesis from a brain mRNA encoding an independent protein kinase C ζ catalytic domain: Implications for the molecular mechanism of memory. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 40305–40316, 2003.

HOOVER, W.B., VERTES, R.P. Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. **Brain Structure and Function**, v.212, n.2, p. 149-179, 2007.

HSIEH C. *et al.* Persistent increased PKM ζ in long-term and remote spatial memory. **Neurobiology of Learning and Memory**. v. 138, p. 135-144, 2016.

HUANG, Y. Y. *et al.* cAMP contributes to mossy fiber LTP by initiating both a covalently mediated early phase and macromolecular synthesis-dependent late phase. **Cell**, v. 79, p. 69–79, 1994.

HUGANIR, R. L. & NICOLL, R. A. (2013). AMPARs and synaptic plasticity: the last 25 years. **Neuron**, v. 80, n. 3, p. 704–717, 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Diretoria de Pesquisas. Coordenação de População e Indicadores Sociais. Gerência de Estudos e Análises da Dinâmica Demográfica. Projeção da população por sexo e idade – indicadores implícitos na projeção – 2010/2060. Edição 2018. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/populacao/9109-projecao-da-populacao.html?=&t=resultados>. Acesso em: 10 mar. 2021.

ITO, M. Cerebellar Long-Term Depression: Characterization, Signal Transduction, and Functional Roles. **Physiological Reviews**, v. 81, n. 3, p. 1143–1195, 2001.

IZQUIERDO I. & MEDINA J.H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 68, p. 285–316, 1997.

IZQUIERDO, I. *et al.* Mechanisms for memory types differ. **Nature**, v. 393, n.6686, p. 635-636, 1998.

IZQUIERDO, I. *et al.* Separate mechanisms for short- and long-term memory. **Behavioural Brain Research**, v. 103, n. 1, p. 1–11, 1999.

IZQUIERDO, L. A., *et al.* Molecular pharmacological dissection of short- and long-term memory. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 22, p. 269 -287, 2002.

IZQUIERDO, I., *et al.* Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. **Trends in Neurosciences**, v. 29, p. 496–505, 2006.

IZQUIERDO, I. **Memória**. 2 ed. rev. e ampl. Porto Alegre: Artmed, 2014.

IZQUIERDO, I. **Memória**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2018.

IZQUIERDO, I.; FURINI, C.R.G., DE CARVALHO MYSKIW, J. Fear Memory. **Physiological Reviews**, v. 96, n.2, p. 695-750, 2016.

JAY, T.M., GLOWINSKI, J. & THIERRY, A.M. Selectivity of the hippocampal projection to the prelimbic area of the prefrontal cortex in the rat. **Brain Research**, v. 505, n. 2, p. 337-340, 1989.

KANDEL, E.R. *et al.* **Princípios de Neurociências**. 5a ed. Porto Alegre: AMGH, 2014

KANDEL, E. R. The Molecular Biology of Memory Storage: A Dialogue Between Genes and Synapses. **Science**, v. 294, n. 5544, p. 1030–1038, 2001.

KELLY, M.T.; CRARY, J.F. & SACKTOR, T.C. Regulation of protein kinase Mz synthesis by multiple kinases in long-term potentiation. **Journal of Neuroscience**, v. 27, p. 3439–3444, 2007.

KIM, J. J. & JUNG, M. W. Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: A critical review. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 30, n.2, p. 188–202, 2006.

KITAMURA T. *et al.* Engrams and circuits crucial for systems consolidation of a memory. **Science**, v. 356, n. 6333, p. 73–78, 2017.

KNIGHT, D. C.; WATER, N. S. & BANDETTINI, P. A. Neural substrates of explicit and implicit fear memory. **NeuroImage**, v. 4, n.1, p. 208–214, 2009.

KWAPIS, J.L. *et al.* Protein kinase M ζ maintains fear memory in the amygdala but not in the hippocampus. **Behavioral Neuroscience**, v. 123, n.4, p. 844–850, 2009.

KWAPIS, J. L. *et al.* Intra-amygdala infusion of the protein kinase M ζ inhibitor ZIP disrupts foreground context fear memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 98, p. 148–53, 2012.

KWAPIS, J.L. & HELMSTETTER, F.J. Does PKM (zeta) maintain memory? **Brain Research Bulletin**, v. 105, p. 36–45, 2014.

LEDOUX, J. (2007). The amygdala. **Current Biology**, v. 17, n.20, p. R868–R874, 2007.

LEE, A. M. *et al.* Prkcz null mice show normal learning and memory. **Nature**, v. 493, n.7432, p. 416–419, 2013.

LESBUERGUÈRES, E. *et al.* Early tagging of cortical networks is required for the formation of enduring associative memory. **Science**, v. 331, p. 924–928, 2011.

LEVITAN, D. *et al.* Memory Retrieval Has a Dynamic Influence on the Maintenance Mechanisms That Are Sensitive to ζ -Inhibitory Peptide (ZIP). **The Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 41, 2016.

LING, D.S.F. *et al.* Protein kinase M ζ is necessary and sufficient for LTP maintenance. **Nature Neuroscience**, v. 5, p. 295–296, 2002.

LING D.S., BENARDO L.S. & SACKTOR T.C. Protein kinase M ζ enhances excitatory synaptic transmission by increasing the number of active postsynaptic AMPA receptors. **Hippocampus**, v. 16, n.5, p. 443–452, 2006.

LISMAN, J., COOPER, K., SEHGAL, M. & SILVA, A. J. Memory formation depends on both synapse-specific modifications of synaptic strength and cell-specific increases in excitability. **Nature Neuroscience**, v. 21, n. 3, p. 309–314, 2018.

LÓPEZ-OTÍN, C. *et al.* The hallmarks of aging. **Cell**. v. 153, p.1194–1217, 2013.

MALINOW, R. *et al.* Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP. **Science**, v. 245, p. 862–866, 1989.

- MALINOW, R., MALENKA, R.C. AMPA Receptor Trafficking and Synaptic Plasticity. **Annual Review of Neuroscience**, v. 25, p. 103–126, 2002.
- MAN, H.-Y., 2011. GluA2-lacking, calcium-permeable AMPA receptors — inducers of plasticity? **Current Opinion in Neurobiology**, v. 21, n. 2, p. 291–298, 2011.
- MARKHAM, J. A. & JURASKA, J. M. Aging and sex influence the anatomy of the rat anterior cingulate cortex. **Neurobiology of Aging**, v. 23, n. 4, p. 579–588 (2002).
- MARTIN-SOELCH, C., LINTHICUM, J., & ERNST, M. Appetitive conditioning: Neural bases and implications for psychopathology. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 31, n. 3, p. 42-440, 2007.
- MCCORMICK *et al.* Initial localization of the memory trace for a basic form of learning. **Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America**, v. 79, p. 2731–2735, 1982.
- MCGAUGH, J. L. Time-Dependent Processes in Memory Storage. **Science**, v. 153, n.3742, p. 1351–1358, 1966.
- MCGAUGH, J. L. Memory - a Century of Consolidation. **Science**, v. 287, n. 5451, p. 248–251, 2000.
- MCGAUGH, J.L. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. **Annual Review of Neuroscience**, v. 27, p. 1–28, 2004.
- MCNAUGHTON, B.L. & MORRIS, R.G.M. Hippocampal synaptic enhancement and information storage within a distributed memory system. **Trends in Neurosciences**, v.10, n. 10, p. 408-415, 1987
- MIDDEI S. *et al.* CREB is necessary for synaptic maintenance and learning-induced changes of the AMPA receptor GluA1 subunit. **Hippocampus**, v. 23, p. 488–499, 2013.
- MIGUES, P. V. *et al.*, PKMzeta maintains memories by regulating GluR2-dependent AMPA receptor trafficking. **Nature Neuroscience**, v. 13, n. 30, p. 630-634, 2010.
- MORITA, D., RAH, J.C., ISAAC, J.T.R. Incorporation of inwardly rectifying AMPA receptors at silent synapses during hippocampal long-term potentiation. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 369, n. 1633, 20130156, 2014.
- MORRISON, J. H.; BAXTER, M. G. The Aging Cortical Synapse: Hallmarks and Implications for Cognitive Decline. **Nature Reviews Neuroscience**, v.4, n.13, p. 240–250, 2012.
- MUSLIMOV, I. A. *et al.* Dendritic transport and localization of protein kinase Mz mRNA: Implications for molecular memory consolidation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 52613–52622, 2004.

NABAVI S *et al.* Engineering a memory with LTD and LTP. **Nature**, v. 511, n.7509, p. 348–352, 2014.

NADER, K., SCHAFE, G. E., LEDOUX, J. E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. **Nature**, v. 406, n. 6797, 2000.

NYBERG, *et al.* Memory aging and brain maintenance. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 16, p. 292–305, 2012.

PACKARD, M., HIRSH, R., & WHITE, N. Differential effects of fornix and caudate nucleus lesions on two radial maze tasks: evidence for multiple memory systems. **The Journal of Neuroscience**, v. 9, n. 5, p. 1465-1472, 1989.

PAN, S. *et al.* Preservation of a remote fear memory requires new myelin formation. **Nature Neuroscience**, v. 23, n. 4, p. 487-499, 2020.

PAVLOV, I. **Conditioned reflexes: an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex**. Oxford: Oxford University Press, 1927.

PASTALKOVA, E. *et al.* Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. **Science**, v. 313, n. 5790, p. 1141-1144, 2006.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 2^o. ed. San Diego: Academic Press, 1986.

PEDRAZA, L. K. *et al.* Chronic fluoxetine prevents fear memory generalization and enhances subsequent extinction by remodeling hippocampal dendritic spines and slowing down systems consolidation. **Translational Psychiatry**, v., n.1, 2019

PLANT, K., PELKEY, K.A., BORTOLOTTI, Z.A., MORITA, D., TERASHIMA, A., MCBAIN, C.J., COLLINGRIDGE, G.L., ISAAC, J.T.R. Transient incorporation of native GluR2-lacking AMPA receptors during hippocampal long-term potentiation. **Nature Neuroscience**, v. 9, n. 5, p. 602–604, 2006.

RAMÓN Y CAJAL, S. The Croonian Lecture: La Fine Structure des Centres Nerveux. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 5, p. 444-468, 1894.

RAO-RUIZ, P., ROTARU, D.C., VAN DER LOO, R.J., MANSVELDER, H.D., STIEDL, O., SMIT, A.B., SPIJKER, S. Retrieval-specific endocytosis of GluA2-AMPA receptors underlies adaptive reconsolidation of contextual fear. **Nature Neuroscience**, v. 14, n. 10, p. 1302–1308, 2011.

RIOULT-PEDOTTI, M.-S. Learning-Induced LTP in Neocortex. **Science**, v. 290, n. 5491, p. 533–536, 2000.

RIZZO, V. *et al.* Encoding of Contextual Fear Memory Requires De Novo Proteins in the Prelimbic Cortex. **Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging**, v. 2, n. 2, p. 158-169, 2017.

RODRIGUE, K. M. & RAZ, N. Shrinkage of the entorhinal cortex over five years predicts memory performance in healthy adults. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 4, p. 956–963 (2004).

ROGAN M.T., STAUBLI U.V., LEDOUX, J.E. Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. **Nature**, v. 390, p. 604-607, 1997.

ROY, D. S. *et al.* Distinct neural circuits for the formation and retrieval of episodic memories. **Cell**, v. 170, n.5, p. 1000-1012, 2017.

RUDY, J. W. & O'REILLY, R. C. Contextual fear conditioning, conjunctive representations, pattern completion, and the hippocampus. **Behavioral Neuroscience**, v. 113, n.5, p.867–880 1999.

RYAN, T. *et al.* Engram Cells Retain Memory Under Retrograde Amnesia. **Science**, v. 348, n. 6238, p.1007-1013, 2015.

SACKTOR, T.C. *et al.* Persistent activation of the ζ isoform of protein kinase C in the maintenance of long-term potentiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p. 8342–8346, 1993.

SACKTOR, T.C. How does PKM ζ maintain long-term memory? **Nature Reviews Neuroscience**, v. 12, n. 1, p. 9-15, 2011.

SACKTOR, T.C. Memory maintenance by PKM ζ – an evolutionary perspective. **Molecular Brain**, v. 5, n. 31, 2012.

SACKTOR, T. C., HELL, J. W. The genetics of PKM Zand memory maintenance. **Science Signaling**, v. 10, n. 505, 2017.

SACKTOR, T.C., FENTON, A. A. What does LTP tell us about the roles of CaMKII and PKM ζ in memory? **Molecular Brain**, v. 11, n. 1, 2018.

SAGLIETTI, L. *et al.* Extracellular Interactions between GluR2 and N-Cadherin in Spine Regulation. **Neuron**, v. 54, n. 3, p. 461–477, 2007.

SALMON, E. *et al.* Regional brain activity during working memory tasks. **Brain**, v. 119, n. 5, p. 1617–1625, 1996.

SCAHILL *et al.* A longitudinal study of brain volume changes in normal aging using serial registered magnetic resonance imaging. **Archives of Neurology**, v. 60, n.7, p. 989–994, 2003.

SCHACTER, D. L. Implicit memory: History and current status. **Journal of Experimental Psychology: Learning, Memory, and Cognition**, v. 13, n.3, p. 501–518, 1987.

SCHACTER, D.L. Priming and multiple memory systems: Perceptual mechanisms of implicit memory. **Journal of Cognitive Neuroscience**, v. 4, n. 3, p. 244-256, 1992.

SCHACTER, D. L. *et al.* Priming and the Brain. **Neuron**, v. 20, n. 2, p. 185–195, 1998.

SCHAFE, G. E., *et al.* Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning: a cellular and molecular perspective. **Trends in Neurosciences**, v.24, p. 540–546, 2001.

SCHUETTE S.R. *et al.* Overexpression of protein Kinase M ζ in the hippocampus enhances long-term Potentiation and long-term contextual but not cued fear memory in rats. **The Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 15, p. 4313–4324, 2016.

SCHULTZ C., & ENGELHARDT, M. Anatomy of the Hippocampal Formation: The Hippocampus in Clinical Neuroscience, **Frontiers of Neurology and Neuroscience**, v. 34, p. 6–17, 2014.

SERRANO, P. *et al.* PKMzeta maintains spatial, instrumental, and classically conditioned long-term memories. **PLoS Biology**, v. 6, n. 12, p. 2698-2706, 2008.

SHEMA, R., SACKTOR, T. C., DUDAI, Y. Rapid erasure of long-term memory associations in the cortex by an inhibitor of PKM zeta. **Science**, v. 317, n. 5840, p. 951-953, 2007.

SHEMA, R. *et al.* Boundary conditions for the maintenance of memory by PKMzeta in neocortex. **Learning & Memory**, v. 16, n. 2, p. 122-128, 2009.

SHEMA, R. *et al.* Enhancement of consolidated long-term memory by overexpression of protein kinase M ζ in the neocortex. **Science**, v. 331, p. 1207–1210, 2011.

SHEPHERD, J. S., HUGANIR, R. L. The Cell Biology of Synaptic Plasticity: AMPA Receptor Trafficking. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 23, p. 613-643, 2007.

SHI, S. -H., HAYASHI, Y., ESTEBAN J.A., MALINOW, R., 2001. Subunit-Specific Rules Governing AMPA Receptor Trafficking to Synapses in Hippocampal Pyramidal Neurons. **Cell**, v. 105, n. 3, p. 331–343, 2001.

SMOLEN, P., BAXTER, D. A. & BYRNE, J. H. How can memories last for days, years, or a lifetime? Proposed mechanisms for maintaining synaptic potentiation and memory. **Learning and Memory**, v. 6, n. 26, p. 133-150, 2019.

SODERLING, T.R. & DERKACH, V.A. Postsynaptic protein phosphorylation and LTP. **Trends in Neurosciences**, v. 23, p. 75–80, 2000.

SONG, I., KAMBOJ, S., XIA, J., DONG, H., LIAO, D., HUGANIR, R.L. Interaction of the N-Ethylmaleimide–Sensitive Factor with AMPA Receptors. **Neuron**, v. 21, n. 2, p. 393–400, 1998.

SONG, S. *et al.* GSK-3 β activation is required for ZIP-induced disruption of learned fear. **Scientific Reports**. v. 10, n. 1, 2020.

SOTRES-BAYON, F. *et al.* Gating of fear in prelimbic cortex by hippocampal and amygdala inputs. **Neuron**, v. 76, p. 804–812, 2012.

SQUIRE, L. & ZOLA-MORGAN, S. The medial temporal lobe memory system. **Science**, v. 253, n. 5026, p. 1380–1386, 1991.

SQUIRE, L. R., KNOWLTON, B., & MUSEN, G. The Structure and Organization of Memory. **Annual Review of Psychology**, v. 44, n.1, p. 453–495, 1993.

SQUIRE, L. R., STARK, C. E. L., & CLARK, R. E. The Medial Temporal Lobe. **Annual Review of Neuroscience**, v. 27, n.1, p. 279–306, 2004.

SQUIRE, L. R., & DEDE, A. J. O. Conscious and Unconscious Memory Systems. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7 n. 3, a021667, 2015.

TAKEUCHI, T., DUSZKIEWICZ, A. J., MORRIS, R. G. The synaptic plasticity and memory hypothesis: encoding, storage and persistence. **Philosophical Transactions of the Royal Society B.**, v. 369, n. 1633, 2014.

TONEGAWA *et al.* Memory engram storage and retrieval. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 35, p. 101–109, 2015.

TSOKAS P *et al.* Compensation for PKM ζ in long-term potentiation and spatial long-term memory in mutant mice. **Elife**, v. 5, e14846, 2016.

TSUMOTO T. Long-term potentiation and long-term depression in the neocortex. **Progress in Neurobiology**, v. 39, p. 209–228, 1992.

TULVING, E. Episodic and semantic memory. *In*: TULVING, E. & DONALDSON, W. **Organization of Memory**. Nova Iorque: Academic Press, p. 382-402. 1972.

TULVING, E. Episodic memory: from mind to brain. **Annual Review of Psychology**, v. 53, p. 1-25, 2002.

VIANNA, M. R.M. *et al.* Short- and long-term memory: differential involvement of neurotransmitter systems and signal transduction cascades. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 72, n. 3, p. 353-364, Set. 2000.

VERTES, R.P. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. **Synapse**, v. 51, n. 1, p. 32-58, 2004.

UYLINGS, H. B. & DE BRABANDER, J. M. Neuronal changes in normal human aging and Alzheimer's disease. **Brain and Cognition**. v. 49, n. 3, p. 268–276 (2002).
VOLK, L. J., *et al.* PKM- ζ is not required for hippocampal synaptic plasticity, learning and memory. **Nature**, v. 493, n.7432, p. 420–423, 2013.

VON KRAUS L.M.; SACKTOR T.C. & FRANCIS J.T. Erasing sensorimotor memories via PKM ζ inhibition. **PLoS One**, v. 5, n. 6, p. e11125, 2010.

WANG, S. *et al.* Distinct Roles of PKC δ and PKM ζ in the Initiation and Maintenance of Hippocampal Long-Term Potentiation and Memory. **Cell Reports**, v. 16, n. 7, p. 1945-1961, 2016.

WEST *et al.* Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. **Lancet**. v. 344, n.8925, p. 769–772, 1994.

WESTMARK P.R. *et al.* Pin1 and PKM ζ sequentially control dendritic protein synthesis. **Science Signaling**, v. 3, n. 112, pp. ra18, 2010.

WHITLOCK, J. R. Learning Induces Long-Term Potentiation in the Hippocampus. **Science**, v. 313, n.5790, p. 1093–1097, 2006.

XUE Y.X. *et al.* Overexpression of protein kinase M in the prelimbic cortex enhances the formation of long-term fear memory. **Neuropsychopharmacology**, v. 40, p. 2146–2156, 2015.

YAO, Y. *et al.* PKM ζ maintains late long-term potentiation by N-ethylmaleimidesensitive factor/GluR2-dependent trafficking of postsynaptic AMPA receptors. **The Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 31, p. 7820–7827, 2008.

YU, N. K. *et al.* Increased PKM ζ activity impedes lateral movement of GluA2-containing AMPA receptors. **Molecular Brain**, v. 10, n. 1, 2017.

ANEXO A - Carta de aprovação da Comissão Científica da Escola de Medicina da PUCRS



SIPESQ
Sistema de Pesquisas da PUCRS

Código SIPESQ: 9421

Porto Alegre, 16 de julho de 2019.

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão Científica da ESCOLA DE MEDICINA da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "ESTUDO SOBRE O PAPEL DA PKMZETA NA CONSOLIDAÇÃO E NO ARMAZENAMENTO REMOTO DA MEMÓRIA DE MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO NA AMÍGDALA BASOLATERAL E NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL". Este projeto necessita da apreciação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA). Toda a documentação anexa deve ser idêntica à documentação enviada ao CEUA, juntamente com o Documento Unificado gerado pelo SIPESQ.

Atenciosamente,

Comissão Científica da ESCOLA DE MEDICINA

ANEXO B – Carta de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS.



SIPESQ
Sistema de Pesquisas da PUCRS

Código SIPESQ: 9421

Porto Alegre, 4 de setembro de 2019

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "ESTUDO SOBRE O PAPEL DA PKMZETA NA CONSOLIDAÇÃO E NO ARMAZENAMENTO REMOTO DA MEMÓRIA DE MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO NA AMÍGDALA BASOLATERAL E NO CÓRTEX PRÉ-FRONTAL" coordenado por JOCIANE DE CARVALHO MYSKIW.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está autorizada a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Duração do Projeto: 04/09/2019 - 04/06/2021

Nº de Animais	Espécie
552	Ratos
Total de Animais: 552	

Atenciosamente,

Comissão de Ética no Uso de Animais(CEUA)

ANEXO C – Comprovante de submissão do artigo.**NSC-21-1220: Your Neuroscience Submission**

Neuroscience, Editorial <em@editorialmanager.com>

Sex, 08/10/2021 08:12

Para: CRISTIANE REGINA GUERINO FURINI <cristianefurini@hotmail.com>

Ms. No.: NSC-21-1220

Title: PKM ζ maintains remote contextual fear memory by inhibiting GluA2-dependent AMPA receptor endocytosis in the prelimbic cortex

Section: Special Issue

Dear Dr. FURINI,

Your submission entitled "PKM ζ maintains remote contextual fear memory by inhibiting GluA2-dependent AMPA receptor endocytosis in the prelimbic cortex" has been assigned the following manuscript number: NSC-21-1220.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to EM for Neuroscience as an author.

The URL is <https://www.editorialmanager.com/nsc/>.

Your username is: cristianefurini@hotmail.com

%ELSEVIER_RESET_PASSWORD_INSTRUCTIONS%

Thank you for submitting your work to Neuroscience.

Kind regards,

Administrative Support Agent
Neuroscience
neuroscience@elsevier.com



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br