PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: NEUROCIÊNCIAS

CRISTIANE REGINA GUERINO FURINI

PARTICIPAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO NO/GMPc/PKG NA MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS

Porto Alegre

2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

CRISTIANE REGINA GUERINO FURINI

PARTICIPAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO NO/GMPc/PKG NA MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS

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

Orientador: Prof. Dr. Martín Cammarota

Porto Alegre

2009

CRISTIANE REGINA GUERINO FURINI

PARTICIPAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO NO/GMPc/PKG NA MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS

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

Aprovado em _____de _____de _____.

BANCA EXAMINADORA:

_____

Dra. Mirna Portuguez

_____

Dra. Lia R.M. Bevilaqua

_____

Dr. Jorge Medina

_____

Dra. Siomara Monteiro

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Sonia e Roberto**, por sempre me apoiar e incentivar a lutar por meus sonhos, por estarem sempre ao meu lado, obrigada por todo amor e carinho.

Ao meu orientador, mestre e amigo **Martín Cammarota**, que ao longo dos anos tem me mostrado o verdadeiro significado de fazer ciência, por contribuir e ajudar sempre no meu aprendizado. Por seu empenho e dedicação para a realização deste trabalho.

Ao mestre, **Iván Izquierdo,** por me proporcionar a oportunidade de fazer parte do Centro de Memória, obrigada pelo conhecimento científico e de mundo que nos proporciona em todos os dias de convivência e pelo exemplo de caráter científico e pessoal.

A minha irmã, **Eduarda**, por estar sempre ao meu lado, teu apoio é imprescindível.

A **Janine** grande amiga, colega e exemplo de pesquisadora que me ajudou em todas as etapas de realização deste trabalho.

Aos meus grandes amigos e colegas que fazem parte do Centro de Memória, e que me ajudaram muito na realização destes e outros experimentos: **Carolina, Lia, Jociane, Ramón, Julia, Clarice, Siomara, Natália, Lucas, Gabriela, Juliana, Weber, Fernando, Pâmela, Cristiano, Andressa, Izadora e Larissa.** Vocês com certeza são o melhor grupo de trabalho que alguém poderia fazer parte. È muito bom dividir meus dias com vocês.

Aos amigos que a vida me presenteou. Em especial: **Josiane, Sheila, Simone, Danilise, Greice, Dariane, Sheila K., Gabriela, Aline.**

A minha família, grande família, em especial minhas tias **Marilúcia** e **Dóris**, meu tio **Gabriel**, meus primos **Mariana**, **Rodrigo**, **Larissa** e **Liana**, pelas conversas de incentivo e apoio.

Ao meu namorado **Leandro**, pelo carinho, incentivo, pela paciência e força para continuar sempre.

A todos os demais que, de alguma forma, contribuíram para a elaboração desta dissertação ou em outros momentos da minha vida.

A CAPES, pelo financiamento da minha bolsa nestes últimos dois anos.

RESUMO

Evidências sugerem que a via de sinalização NO/GMPc/PKG tem papel chave no processamento da memória, entretanto a atuação desta cascata de sinalização no hipocampo durante a consolidação de memórias declarativas, tais como a de reconhecimento de objetos (RO), permanece desconhecida. Aqui será mostrado que a aquisição da memória associada ao treino na tarefa de reconhecimento de objetos aumenta a atividade da óxido nítrico sintase neuronal (NOSn) na região CA1 do hipocampo dorsal. Ainda mais, quando infundido nesta região do cérebro imediatamente, mas não 180 ou 360 min após o treino na tarefa de RO, o inibidor da NOSn, L-NN, prejudica a retenção da memória em questão, sem afetar a locomoção, o comportamento exploratório, nem o estado de ansiedade dos animais ou causar lesão ao hipocampo. O efeito amnésico do L-NN não se deve a indução de dependência de estado e é mimetizado pela infusão intra-hipocampal do inibidor da guanilil-ciclase solúvel (GCs), LY83583 ou do inibidor da proteína cinase G (PKG), KT5823. Ainda, a infusão pós-treino do análogo não-hidrolizável do GMPc, 8-Br-GMPc, reverte o efeito de L-NN e LY5823, mas não o de KT5823. A noradrenalina (NA) regula a ativação da via NO/GMPc/PKG em distintas preparações. Em concordância com este fato a amnésia induzida pela administração intra-hipocampal do antagonista ß-adrenérgico, timolol, imediatamente após o treino na tarefa de RO não é revertida pela co-infusão de 8-Br-GMPc e do doador de NO, SNAP. Quando administrada na região CA1 do hipocampo dorsal juntamente com LY-83583, KT-5823 ou L-NN a NA reverte o efeito amnésico destes agentes. Nossos dados indicam que a ativação da cascata de sinalização NO/GMPc/PKG na região CA1 do hipocampo dorsal é fundamental para a normal consolidação da memória de reconhecimento de objetos e sugerem que os receptores ß-adrenérgicos desempenham um papel fundamental na regulação destes eventos.

Palavras-chave: Consolidação, Óxido nítrico, hipocampo, reconhecimento de objetos.

ABSTRACT

Evidence suggests that the NO/cGMP/PKG pathway plays a key role in memory processing but the actual participation of this signaling cascade in the consolidation of declarative memory, such as object recognition (OR), remains unknown. Here we show that consolidation of long-term object recognition memory enhances the nitric oxide synthase neuronal activity (nNOS) in the CA1 region of the dorsal hippocampus. Indeed, when infused immediately after but not 180 and 360 min after training in the OR task, the nNOS inhibitor, L-NN, hindered long-term memory retention without affecting locomotion, exploratory behavior, anxiety state or hippocampal functionality. The amnesic effect of L-NN was not due to state-dependency and was equally produced by the hippocampal infusion of soluble guanylyl cyclase (sGC) inhibitor, LY83583, and by the protein kinase G (PKG) inhibitor, KT5823. Furthermore, post-training infusion of the non-hydrolysable analog of cGMP, 8Br-cGMP, reversed the L-NN and LY83583 effect but not that induced by KT5823. The noradrenaline (NA) regulate NO/sGC/PKG pathway activation in distinct preparations. In accordance with this fact, the amnesia induced by intra-hippocampal administration of antagonist ß-adrenergic receptor, timolol, immediately after training in the OR task is not reversed by co-infusion of 8-Br-cGMP or of NO donator, SNAP. When administrated in the CA1 region of the dorsal hippocampus together with LY-83583, KT-5823 or L-NN, NA reversed the amnesic effect of these compounds. Our results indicate that the activation of NO/cGMP/PKG pathway in the CA1 region of the dorsal hippocampus is essential for consolidation of OR memory and suggests that the ß-adrenergic receptors, has a fundamental participation on regulation of these events.

Key-words: Consolidation, Nitric oxide, hippocampus, object recognition

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Desenho esquemático do cérebro de rato mostrando o local de implantação das cânulas de infusão na região CA1 do hipocampo dorsal 24
Figura 2 Foto do animal sendo submetido à cirurgia estereotáxica para a implantação de cânulas de infusão na região CA1 do hipocampo dorsal. No detalhe, vista geral do equipamento estereotáxico. 25
Figura 3 Fotografia de um animal sendo treinado na tarefa de Reconhecimento de Objetos. 26
Figura 4 Fotografia de um rato explorando o Campo Aberto. Observe-se o comportamento de elevação sobre as patas traseiras (“rearing”). 27
Figura 5 Fotografia de um rato sendo submetido ao Labirinto em Cruz Elevado. ... 28
Figura 6 Fotografias da caixa de Esquiva Inibitória. Note-se o animal sobre a plataforma. 29
Figura 7 Infusão de fármacos através das cânulas-guia esterotaxicamente implantadas. A cânula de infusão, 1,0 mm maior em comprimento do que a cânula-guia é introduzida na luz desta, atingindo a região-alvo onde se deseja que o fármaco ou salina sejam infundidos. 30
Figura 8 A infusão do inibidor da NOSn, L-NN, imediatamente mas não 180 ou 360 min após o treino, impede a retenção da memória de longa duração da tarefa de reconhecimento de objetos; o treino no RO aumenta a atividade da NOS. 33
Figura 9 O efeito amnésico causado pela inibição da NOSn não ocorreu devido a dependência de estado. 35
Figura 10 A infusão do inibidor da GCs, LY83583 ou do inibidor da PKG, KT5823, imediatamente após o treino impedem a retenção da memória de longa duração de reconhecimento de objetos. 39
Figura 11 A infusão de timolol imediatamente após o treino impede a retenção da memória de longa duração de reconhecimento de objetos e 8-Br-GMPc e SNAP não são capazes de reverter seu efeito amnésico. 40
Figura 12 A amnésia causada pela infusão intra-CA1 de L-NN, LY83583 e KT5823 é revertida pela co-administração de NA.. 41
Figura 13 A) A infusão intra-CA1, do anticorpo anti-BDNF prejudica a retenção da memória do RO. B) A infusão de BDNF não reverte o efeito amnésico de L-NN ou timolol quando administrados imediatamente após o treino. C) O treino no RO induz

um aumento nos níveis de BDNF na região CA1 hipocampal. D) Quando administrados na região CA1 do hipocampo dorsal, imediatamente após o treino, L-NN e timolol (TIM) bloqueiam, enquanto SNAP e noradrenalina (NA) aumentam os níveis de BDNF na tarefa do RO.…..... 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Classificação das memórias de acordo com o tempo que perduram. 15
Tabela 2 Classificação das memórias de longa duração de acordo com o conteúdo 16
Tabela 3 A infusão de L-NN não afetou o desempenho dos animais na tarefa de campo aberto, labirinto em cruz elevado e esquiva inibitória. 36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDNF - fator neurotrófico derivado do cérebro. Do inglês *brain- derived neurotrophic factor*

8-Br-GMPc - 8-bromoguanosina-3',5'-monofosfato cíclico

cm - centímetros

DA - Doença de Alzheimer

DNA - Ácido desoxirribonucléico. Do inglês: *desoxirribonucleic acid*

EI - esquiva inibitória

g- gramas

GCs - guanilil ciclase solúvel

GMPc - GMPcíclico

hr - horas

Kg - quilogramas

LC - *locus ceruleus*

LMeArg ou L-NMMA - L-NO-monometilarginina

L-NAME - L-NC-nitroarginina metilester

L-NN - N_{ω}-Nitroarginina-2,4-L-diaminobutírico amido di(trifluoroacetato)

L-NoArg - L-nitroarginina

LTD - Depressão de longa duração. Do inglês *long term depression*

LTP - Potenciação de Longa Duração. Do inglês: *Long-term Potentiation*

LY-83583 - 6- Anilinoquinoline-5,8-quinona

mA – Mili-ampéres

MCD - Memória de curta duração

mg - miligramas

min - minutos

MLD - Memória de longa duração

mm - Milímetros

NA - noradrenalina

NMDA - N-metil-D-aspartado. Do inglês: *N-methyl-D-aspartate*

NO - Óxido Nítrico. Do inglês: nitric oxide

NOS - Óxido Nítrico Sintase. Do inglês: *Nitric oxide sintase*

NOSe - Óxido Nítrico Sintase endotelial

NOSi - Óxido Nítrico Sintase Induzível

NOSn - Óxido Nítrico Sintase Neuronal

PKG - proteína cinase G. Do inglês *protein kinase G*

RNAm - Ácido ribonucléico mensageiro. Do inglês: messenger *ribonucleic acid.*

RO - Reconhecimento de Objetos

Seg - segundos

SNAP - S-nitroso-acetilpenicilamina

Veh - veículo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 14
1.1 Definição e Classificação das Memórias 14
1.2 O hipocampo e seu envolvimento na formação de memórias 16
1.3 A tarefa de Reconhecimento de Objetos 17
1.4 A atividade do óxido nítrico 18
2 OBJETIVOS 22
2.1 Objetivo Geral 22
2.2 Objetivos Específicos 22
3 MATERIAIS E MÉTODOS 24
3.1 Animais Experimentais 24
3.2 Cirurgia Estereotáxica 24
3.3 Manipulação dos animais 25
3.4 O paradigma do reconhecimento de objetos 25
3.5 Campo Aberto 27
3.6 Labirinto em Cruz Elevado 27
3.7 Esquiva Inibitória 28
3.8 Tratamento farmacológico 29
3.9 Controle histológico da região estudada 30
3.10 Experimentos bioquímicos 31
3.11 Imunoblot 31
3.12 Medida da atividade da NOS 31
3.13 Análise Estatística 31
4 RESULTADOS 32
4.1 A infusão intra-hipocampal de L-NN após o treino, impede a consolidação da memória de reconhecimento de objetos. 32
4.2 A infusão intra-hipocampal de LY83583 ou KT5823 após o treino impede a consolidação da memória de reconhecimento de objetos e a infusão intra-hipocampal de 8-Br-GMPc é capaz de reverter o efeito amnésico causado por L-NN e LY83583 sobre a consolidação da memória de reconhecimento de objetos, mas não é capaz de reverter o efeito amnésico de KT5823. 37
4.3 A infusão de timolol imediatamente após o treino impede a retenção da memória de longa duração de reconhecimento de objetos e 8-Br-GMPc e SNAP não são

capazes de reverter seu efeito amnésico. Porém a NA é capaz de reverter o efeito amnésico causado por L-NN, LY83583 e KT5823. 40
4.4 A infusão intra-hipocampal de Anti-BDNF após o treino impede a consolidação da memória de reconhecimento de objetos. E a infusão intra-hipocampal de BDNF não é capaz de reverter o efeito amnésico induzido por L-NN ou timolol após o treino na tarefa de reconhecimento de objetos. 42
5 DISCUSSÃO .....
6 CONCLUSÕES .....
7 REFERÊNCIAS .....

1 INTRODUÇÃO

1.1 Definição e Classificação das Memórias

A memória caracteriza-se pela aquisição, formação, conservação e evocação de informações, sendo que o acervo de memórias é que faz de cada indivíduo um ser único, em que o conjunto de memórias, proporcionadas pela experiência de vida, determina o que chamamos de personalidade (Izquierdo, 2002; Squire e Kandel, 2003). O conjunto de memórias é que faz com que sejamos aquilo que recordamos, pois só podemos fazer e expressar algo que temos conhecimento, que está em nossa memória.

Entretanto, de todas as informações processadas pelo sistema nervoso, apenas algumas são de fato retidas por longos períodos. A maioria nem sequer é adquirida, sendo filtrada por mecanismos atencionais e emocionais. Dentre aquelas que são adquiridas, apenas algumas são consolidadas como memórias de longa duração, e mesmo dentre estas, muitas são esquecidas. Apenas os aspectos mais relevantes para a cognição, mais marcantes emocionalmente, mais focalizados pela atenção ou mais fortes sensorialmente perduram por um tempo maior e fazem com que o acervo de informações, que constituem a memória se diferencie de acordo com diversos critérios, como função, conteúdo e tempo de duração, sendo que quanto ao tempo que permanecem armazenadas, as memórias são ditas de curta duração, com duração de poucas horas; de longa duração, com permanência de horas ou dias; ou ainda memórias remotas, que são as memórias de longa duração que persistem por muitos meses ou anos (Tabela 1).

	Tempo de permanência	Características
Memórias Sensoriais	Poucos segundos.	Retêm a breve impressão de um estímulo após este ter desaparecido, ou seja, depois que o sistema sensorial correspondente deixa de enviar informação ao cérebro.
Memórias de Curta Duração (MCD)	Menos de 3 horas.	Permite manter "na mente" e em um estado ativo e facilmente acessível, uma pequena quantidade de informação.
Memórias de Longa Duração (MLD)	Dias, meses, anos, a vida toda.	Contêm itens informacionais de diversas índoles altamente interconectados entre si os quais se encontram armazenados de maneira mais ou menos permanente constituindo um sistema de arquivo dinâmico.

Tabela 1 Classificação das memórias de acordo com o tempo que perduram. **(Izquierdo, 2002; ver também McGaugh, 2000).**

Quanto ao seu conteúdo, as memórias são chamadas declarativas ou explícitas se forem referentes a fatos, eventos ou conhecimentos que possam ser contados ou relatados por nós e são adquiridas com plena intervenção da consciência; e não-declarativas ou implícitas, quando forem referentes a capacidades ou habilidades motoras ou sensoriais difíceis de serem declaradas ou descritas (Tabela 2). Andar de bicicleta, dirigir um automóvel e digitar são exemplos de memórias procedimentais. As memórias declarativas podem ser subdivididas em episódicas ou semânticas. As episódicas são aquelas referentes a eventos aos quais assistimos ou participamos, ou seja, são as memórias autobiográficas. As memórias semânticas carregam informações que são de conhecimento geral, como o conhecimento em medicina, língua portuguesa ou história. As memórias, no entanto, não são adquiridas imediatamente na sua forma definitiva, e durante os primeiros minutos ou horas são suscetíveis à interferência por outras experiências, drogas ou tratamentos (McGaugh, 2000; Izquierdo *et al.*, 2002).

Características	Subdivisões e características

Explicitas/ Declarativas	Informações que usualmente sabemos que possuímos e a qual temos acesso consciente.	*Episódicas*	Guardam informação acerca de nossas próprias vidas e eventos.
		Semânticas	Armazenam informações acerca do mundo que nos rodeia, mas que lembramos sem saber como, quando e onde as adquirimos.
Implícitas/ Não-declarativas	Informações às quais não temos acesso consciente, tal como a informação obtida a partir de aprendizados simples como aqueles derivados pelo treino em tarefas de condicionamento clássico e habituação.	*Representação perceptual*	Representações (imagens, sons) sem significado aparente conhecido, mas úteis como dicas facilitatórias da evocação de informações inerentes; memória pré-consciente (priming).
		Procedimentos	Hábitos, habilidades, regras.
		Associativa	Associa dois ou mais estímulos (condicionamento clássico), ou um estímulo a uma resposta (condicionamento operante).
		Não associativa	Atenua uma resposta (habituação) ou a aumenta (sensibilização) através da repetição de um mesmo estímulo.

Tabela 2 Classificação das memórias de longa duração de acordo com o conteúdo. **(Izquierdo, 2002).**

A formação desses dois tipos de memórias depende de distintas estruturas encefálicas. Enquanto as memórias explícitas requerem a integridade do lobo temporal medial, que compreende o hipocampo, o giro denteado e o complexo subicular, juntamente com os córtices entorrinal, perirrinal e para-hipocampal; as memórias implícitas envolvem diferentes estruturas como a amígdala, os gânglios da base e o cerebelo (Albright *et al*., 2000; Lees e Jones, 2000; Izquierdo, 2002; Squire *et al*., 2007).

1.2 O hipocampo e seu envolvimento na formação de memórias

O hipocampo é uma estrutura encefálica bilateral localizada no lobo temporal e é um importante componente do sistema límbico, desempenhando um papel fundamental na formação de memórias de curto e longo prazo (Izquierdo *et al.*, 1998a), sendo que diferentes áreas corticais aferentes e eferentes interagem com

esta estrutura para regular a aquisição e o armazenamento de novas informações (Izquierdo *et al*., 1998b).

A formação de uma memória de longa duração envolve uma série de processos metabólicos no hipocampo e em outras estruturas cerebrais, processos estes que compreendem diversas fases e que requerem entre três e oito horas. Enquanto esses processos não estiverem concluídos, as memórias de longa duração encontram-se lábeis. O conjunto desses processos e o seu resultado final são chamados consolidação. Os mecanismos neurofisiológicos e neuroquímicos que subjazem os processos mnemônicos são um dos temas mais fascinantes das neurociências e objeto de estudo de pesquisadores há muito tempo.

Acredita-se que a formação de memórias e o aprendizado envolvam alterações na representação neural, através de eventos plásticos que modificam a comunicação entre os neurônios (Dudai *et al.*, 1989). Estes eventos plásticos podem incluir alterações na estrutura, na distribuição e no número de sinapses e também alterações morfológicas (Rusakov *et al.*, 1997; Woolf, 1998; Geinisman, 2000).

1.3 A tarefa de Reconhecimento de Objetos

A memória de reconhecimento permite discriminar características, elementos, situações e/ou artefatos familiares e novos, sendo que estas podem ser de um item individual como um objeto ou de um ambiente completo ou mesmo de uma cena constituída de um arranjo espacial de muitos itens, uma capacidade obviamente significativa no que diz respeito à sobrevivência (Wan *et al*., 1999).

Berlyne em 1950, destacou fatores como novidade e curiosidade como prováveis determinantes do comportamento exploratório de roedores. Anos mais tarde, Ennaceur e Delacour (1988) basearam-se nestas observações para propor um paradigma para o estudo da formação deste tipo de memórias. Este novo paradigma, o Reconhecimento de Objetos (RO), baseia-se na observação de um comportamento exploratório inato destes animais, sem depender de nenhum sistema de recompensa. Neste paradigma não se faz necessário um treinamento preliminar extenso já que o aprendizado se dá após uma única sessão. Recentemente foi descrito um protocolo específico de treinamento na tarefa de RO que, ao contrário de grande parte dos protocolos utilizados previamente, mostrou-se

capaz de induzir a formação de uma memória robusta em animais normais, capaz de durar até 120 horas (Rossato *et al*., 2007).

Este protocolo provou ser muito útil para a avaliação da retenção da memória de reconhecimento de longa duração, possuindo várias vantagens como, não depender de nenhum sistema de recompensa; não possuir estímulos aversivos (como choque); não requerer restrição a alimento ou água, poder utilizar uma grande variedade de aparatos e objetos, ser feita tanto com ratos como camundongos; e não necessitar de um treinamento preliminar extenso já que o aprendizado se dá após uma única sessão.

Análises neurofisiológicas de pacientes acometidos de amnésia e experimentos comportamentais realizados em animais de laboratório sugerem que a integridade funcional do lobo temporal, mais especificamente da formação hipocampal, é essencial para codificar e armazenar memórias de reconhecimento (Ennaceur e Delacour, 1988; Logothetis e Sheinberg, 1996; Clark *et al*., 2000; Riesenhuber e Poggio, 2002), como na Doença de Alzheimer (DA) em que a dificuldade para reconhecer itens familiares ou para discriminá-los de novos elementos, é um dos sintomas iniciais do declínio cognitivo (Laatu *et al*., 2003; Lee *et al*., 2003; Dudas *et al*., 2005; Budson *et al*., 2005). Em concordância com estas observações, estudos prévios mostraram que a consolidação da memória de reconhecimento de objetos depende da síntese de proteínas e da iniciação do processo de transcrição do DNA a RNAm (Rossato *et al.*, 2007; Myskiw *et al.*, 2007).

Por esta razão, paradigmas de aprendizado baseados no RO, são importantes para entender a neurobiologia das memórias declarativas.

1.4 A atividade do óxido nítrico

O óxido nítrico (NO, do inglês *nitric oxide*) tem sido aceito como um novo mensageiro neuronal no cérebro (Bredt e Snider, 1992; Dawson *et al*., 1992; Garthwaite, 1991; Moncada *et al*., 1991), que tem demonstrado atuar como mensageiro retrógrado nos receptores NMDA, mediando à potenciação de longa duração (LTP, do inglês *long term potentiation*), a qual é considerada um modelo sináptico de certas formas de memória (Bliss e Collingridge, 1993).

O NO é um radical livre, gasoso, inorgânico sintetizado a partir da L-arginina por um grupo de enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS) (NOS1-3;

também conhecida como NOS neuronal, ou NOSn, NOS endotelial ou NOSe, e NOS induzível ou NOSi) e modulam diferentes processos fisiológicos, incluindo progressão do sistema imune (Coleman, 2001), inflamação (Sharma *et al*., 2007), homeostasia do sódio (Pollock e Pollock, 2008) também o fluxo sanguíneo e a liberação de oxigênio aos tecidos (Buerk, 2007). No sistema nervoso, o NO atua como mensageiro retrógrado (Son *et al*., 1996) regulando a liberação de neurotransmissores e neuropeptídeos de uma maneira dependente de sua atividade (Hanbauer *et al*., 1992).

Em muitas células alvo, o NO se liga ao ferro no sítio ativo da enzima guanilil ciclase solúvel (GCs), levando a produção de GMPcíclico (GMPc), um segundo mensageiro que exerce seus efeitos através de canais iônicos, proteínas cinases, fosfodiesterases e que também contribui na plasticidade sináptica hipocampal (Zhuo *et al*., 1994a; Arancio *et al*., 2001; Monfort *et al*., 2002). A geração de GMPc pela GCs parece ser um passo crucial na sinalização de NO no cérebro (Boulton *et al*., 1994; Ahern *et al*., 2002; Monfort *et al*., 2004; Makhinson *et al.,* 2006).

A regulação exercida pelo GMPc sobre diversas proteínas é bem conhecida, incluindo a proteína cinase G (PKG, do inglês *protein kinase G*), cujo papel principal foi sugerido pela descoberta de que inibidores da PKG são capazes de bloquear a LTP, enquanto que seus ativadores são capazes de facilitar a LTP em resposta a um estímulo tetânico fraco (Zhuo *et al*., 1994a).

A LTP pode ser definida como um aumento estável e duradouro na eficiência da transmissão sináptica. Esta forma de plasticidade sináptica parece ser o substrato fisiológico da memória e aprendizado (Bliss e Collingridge, 1993). O NO está envolvido no processamento de várias formas de plasticidade sináptica, dentre estas, a LTP e a depressão de longa duração (LTD, do inglês *long term depression*) (Garthwaite e Boulton, 1995; Daniel *et al*., 1998; Prast e Philippu, 2001; Koylu *et al*., 2005; Edwards e Rickard, 2007), sendo que na LTP atua como mensageiro retrógrado nos receptores NMDA (O'Dell *et al*., 1991).

Estudos têm demonstrado que inibidores da NOS, dentre eles o L-nitroarginina (L-NoArg), L-NO-monometilarginina (LMeArg ou L-NMMA), e L-NC-nitroarginina-metil-éster (L-NAME) bloqueiam a indução da LTP hipocampal (Mizutani *et al*, 1993; Zorumski e Izumi, 1993), assim como inibidores da GCs. Contrariamente, análogos do GMPc produzem um aumento duradouro do potencial

pós-sináptico excitatório, associado com um aumento na atividade da PKG (Arancio *et al*., 1995).

Experimentos investigando o papel do NO hipocampal, nos processos relacionados à memória têm evidenciado que a inibição da NOS no hipocampo de ratos prejudica a memória de trabalho na tarefa de múltipla escolha (Ohno *et al*.,1993) e a retenção da memória na tarefa de esquiva inibitória (Bernabeu *et al*., 1995; Fin *et al*., 1995; Huang e Lee, 1995). Além disso, a administração periférica de inibidores da NOSn prejudicam (Prickaerts *et al*., 1997) enquanto, doadores de NO aumentam (Pitsikas *et al*., 2002) a retenção da memória de curta duração no RO.

Com relação ao papel do GMPc na formação de memórias, experimentos usando a tarefa de esquiva inibitória em ratos, demonstraram um aumento nos níveis de GMPc no hipocampo imediatamente após o treino, e a administração de um análogo do GMPc no hipocampo imediatamente após o treino aumentou a retenção da memória (Bernabeu *et al*., 1996), também foi observado um aumento da atividade da PKG imediatamente após o treino (Bernabeu *et al*., 1997).

A degeneração do *locus ceruleus* (LC), ponto de onde saem inervações noradrenérgicas para o hipocampo, é uma das primeiras características da patogênese da DA (Haglund *et al*., 2006; Weinshenker, 2008). Embora as conseqüências funcionais da diminuição de noradrenalina (NA) na progressão da DA não seja clara, evidências indicam que a administração de bloqueadores de receptores ß-adrenérgicos aumentam os déficits de memórias declarativas em pacientes cognitivamente prejudicados (Gliebus e Lippa, 2007), sugerindo que a sinalização por NA é importante para elucidar processos referentes a estas memórias.

A ativação noradrenérgica da amídala basolateral modula a consolidação da memória de RO (Roozendaal *et al*., 2008). Uma vez que o NO regula a liberação de NA no hipocampo (Lonart *et al*., 1992; Lonart e Johnson, 1995; Satoh *et al*., 1996), a descoberta de novidades aumenta a liberação hipocampal de NA (Ihalainen *et al*., 1999) e esta catecolamina modula a expressão de proteínas relevantes para a memória (Kobayashi e Yasoshima, 2001), dentre elas o BDNF (do inglês *brain-derived neurotrophic factor*) (Hutter *et al*., 1996; Haenisch *et al*., 2008).

Assim, decidimos verificar a participação desta via de sinalização (NO/GMPc/PKG) na tarefa de reconhecimento de objetos no hipocampo e analisar a

possível ligação entre a ativação da NOS e a sinalização através da NA e BDNF durante este processo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar a participação da via de sinalização da NO/GMPc/PKG no processo de formação da memória de reconhecimento de objetos (RO) e analisar a possível ligação entre a ativação da NOS e a sinalização através da NA e BDNF durante este processo.

2.2 Objetivos Específicos

Buscar responder as seguintes questões:

- Estudar o efeito do inibidor da enzima óxido nítrico sintase neuronal (NOSn), L-NN, quando administrado na região CA1 do hipocampo dorsal, na retenção da memória de RO.
- Estudar o efeito do inibidor da enzima guanilil ciclase solúvel (GCs), LY-83583, quando administrado na região CA1 do hipocampo dorsal na retenção da memória de RO.
- Estudar o efeito do inibidor seletivo da PKG hipocampal, KT-5823, quando administrado na região CA1 do hipocampo dorsal na retenção da memória de RO.
- Estudar o efeito do L-NN no estabelecimento do fenômeno de dependência de estado.
- Investigar se o possível efeito amnésico causado pela infusão intra-CA1 de LY-83583, KT-5823, L-NN é revertido com a co-infusão de um análogo não-hidrolisável do GMPc, 8-Br-GMPc, imediatamente pós-treino.
- Estudar o efeito do antagonista β-adrenérgico não-seletivo, timolol, quando administrado na região CA1 do hipocampo dorsal, na retenção da memória de RO.
- Verificar se o possível efeito amnésico causado pela infusão intra-CA1 de timolol, é revertido com a co-infusão de SNAP e 8-Br-GMPc, imediatamente pós-treino.
- Verificar se o possível efeito amnésico causado pela infusão intra-CA1 de LY-83583, KT-5823, L-NN é revertido com a co-infusão de um agonista adrenérgio, noradrenalina (NA), imediatamente pós-treino.

- Estudar o efeito do anticorpo anti-BDNF, quando administrado na região CA1 do hipocampo dorsal, na retenção da memória de RO. E verificar se BDNF é capaz de reverter o efeito amnésico de L-NN e timolol.

- Verificar um possível aumento na expressão de BDNF em distintos tempos após o treino na tarefa de RO.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais Experimentais

Foram utilizados ratos Wistar machos de 2,5 a 3 meses de idade, pesando em média 300 g. Os animais foram mantidos em caixas moradias em número de 5 por caixa, em ambiente climatizado (temperatura de 21-23° C), submetidos a um ciclo claro/escuro de 12 horas, com água e comida *ad libitum*; e adquiridos da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) e mantidos no biotério do Centro de Memória do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS.

3.2 Cirurgia Estereotáxica

Os animais utilizados foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas guia de 0,2 mm de calibre, posicionadas 1,0 mm acima da região CA1 do hipocampo dorsal, seguindo as coordenadas (A -4,2, L ±3,0, V -2,0 mm) segundo o Atlas de Paxinos e Watson (1986) (Figura 1).

Figura 1 Desenho esquemático do cérebro de rato mostrando o local de implantação das cânulas de infusão na região CA1 do hipocampo dorsal (Paxinos e Watson, 1986).

Todo o procedimento foi realizado com os animais previamente anestesiados com ketamina (“Francotar”; Virba, ou “Vetanarcol”; König) juntamente com Xilazina, que é um sedativo/miorrelaxante/analgésico (“Coopazine”; Coopers), administrados intra-peritonealmente (*i.p.*), nas doses de 75 mg/Kg e 10 mg/Kg, respectivamente (Figura 2).

Uma vez recuperados da anestesia, os animais foram recolocados em suas caixas-moradia, e não houve troca entre os animais em cada caixa ao longo de todo o experimento.

Figura 2 Foto do animal sendo submetido à cirurgia estereotáxica para a implantação de cânulas de infusão na região CA1 do hipocampo dorsal. No detalhe, vista geral do equipamento estereotáxico.

3.3 Manipulação dos animais

Quatro dias após a cirurgia, os animais passaram por duas sessões de manipulação. Durante cada sessão os animais foram levados do biotério até a sala onde os experimentos seriam conduzidos, retirados da gaiola e manuseados durante 5 minutos.

3.4 O paradigma do reconhecimento de objetos

Quando roedores são apresentados a objetos familiares e novos, eles despendem um tempo maior para explorar o objeto novo. Este comportamento típico tem sido utilizado no desenho de um paradigma comportamental conhecido como tarefa de RO (Ennaceur e Delacour, 1988), o qual vem sendo amplamente utilizado para avaliar os mecanismos envolvidos na formação de memórias declarativas (Reed *et al*., 1999; Moses *et al*., 2005; Mandolesi *et al*., 2003).

O aparato para estudar reconhecimento de objetos consiste de um campo aberto retangular com 60 cm de comprimento por 40 cm de profundidade e 50 cm de altura o qual se encontra em uma sala com baixa luminosidade e isolada acusticamente. A parte frontal do campo aberto é construída de vidro, para a melhor observação do animal. Antes de serem submetidos à tarefa de reconhecimento, os animais passaram por um processo de habituação ao dispositivo experimental que teve duração de 4 dias e foi constituída de uma sessão comportamental diária de 20

minutos, na qual os animais eram colocados individualmente no campo aberto para explorarem livremente (Akirav e Maroun, 2006; Kelly *et al*., 2003).

Os objetos-estímulo utilizados na tarefa de reconhecimento eram confeccionados em metal, vidro ou cerâmica. Nenhum dos objetos possuía significância comportamental para os animais experimentais, os quais não demonstraram preferência por nenhum deles, como comprovado em estudos piloto. Cada objeto foi preso ao assoalho do campo aberto pela base. A arena do campo aberto, assim como os objetos-estímulo foram limpos com uma solução de etanol a 30% entre a passagem de cada animal para garantir a ausência de pistas olfativas. Foram considerados como comportamentos exploratórios os atos de cheirar ou tocar os objetos de estímulo com o focinho ou as patas dianteiras. Sentar-se no objeto, usá-lo como apoio para explorar o ambiente ou permanecer ao redor dele não foram considerados comportamentos exploratórios. O tempo gasto explorando cada objeto foi medido por um observador e os dados expressos como percentagem do tempo total de exploração (Figura 3).

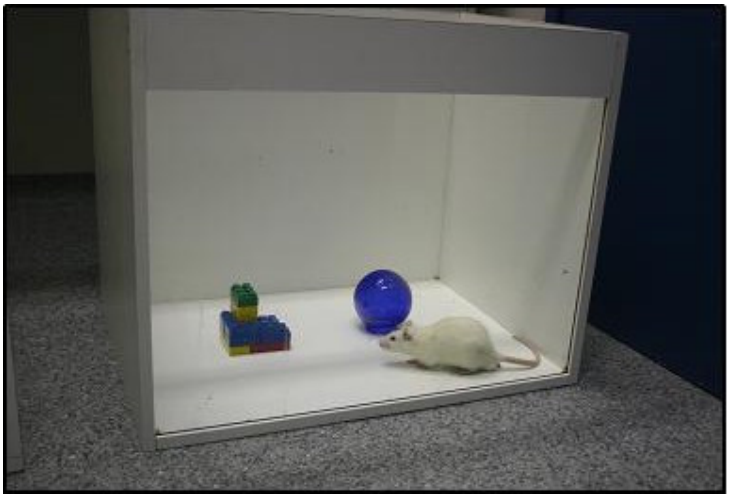

Figura 3 Fotografia de um animal sendo treinado na tarefa de Reconhecimento de Objetos.

No dia 1 (Sessão de treino), os ratos foram individualmente colocados no campo aberto contendo dois objetos diferentes (A e B) para explorarem livremente durante 5 min. O teste de retenção foi realizado 24 h após a sessão de treino (para analisar a memória de longa duração). Nestas sessões de teste de 5 min de duração, os ratos foram individualmente re-introduzidos no campo aberto onde um dos objetos apresentados durante o treino havia sido aleatoriamente substituído por um objeto novo (C). A infusão dos fármacos estudados ocorreu nos seguintes

momentos: imediatamente, 180 ou 360 min após a sessão de treino; nos experimentos que visaram avaliar os efeitos dos fármacos sobre a retenção da memória de longa duração. Imediatamente após o treino e 15 minutos antes do teste, nos experimentos que objetivaram avaliar um possível efeito de estabelecimento de dependência de estado.

3.5 Campo Aberto

Para avaliar a atividade locomotora e o comportamento exploratório dos animais utilizou-se um paradigma conhecido como campo aberto. O aparelho empregado para tal fim consiste em uma caixa de madeira com dimensões de 60 x 40 x 50 cm (comprimento x profundidade x altura) com a sua parede frontal de vidro transparente. O assoalho da caixa é dividido em 12 quadrantes com igual área de superfície. Durante o experimento, o animal foi gentilmente colocado na arena do campo aberto, a qual ele pode explorar livremente por 5 min. Durante este tempo registraram-se o número de linhas cruzadas e o número de elevações sobre as patas traseiras (em inglês *rearings*), comportamentos que nos roedores denotam exploração (Bonini *et al.*, 2006; da Silva *et al.*, 2006) (Figura 4).

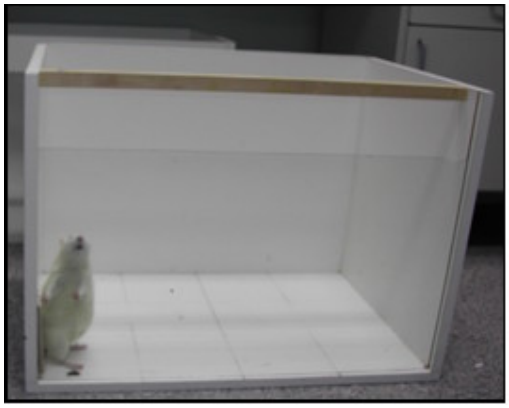

Figura 4 Fotografia de um rato explorando o Campo Aberto. Observe-se o comportamento de elevação sobre as patas traseiras (“rearing”).

3.6 Labirinto em Cruz Elevado

Para avaliar o estado de ansiedade dos animais, utilizou-se a tarefa do labirinto em cruz elevado. Este labirinto consiste em uma plataforma em cruz com 40

centímetros de comprimento em cada braço, posicionada a 1 metro de altura; dois braços contra laterais do labirinto possuem paredes elevadas, sendo denominados fechados, e os outros dois não possuem paredes, sendo denominados abertos. Os animais foram colocados no centro do labirinto e deixados livres para explorá-lo por 5 minutos. Registrou-se o tempo de permanência e o número de entradas nos braços abertos e fechados. Quanto mais ansioso estiver o animal, maior o tempo de permanência nos braços fechados e o número de entradas nestes braços (Bevilaqua *et al.,* 2003; Kerr *et al*., 2005; da Silva *et al*., 2006) (Figura 5).

Figura 5 Fotografia de um rato sendo submetido ao Labirinto em Cruz Elevado.

3.7 Esquiva Inibitória

Para verificar se as intervenções farmacológicas realizadas durante os experimentos no RO poderiam afetar de forma permanente a funcionalidade do hipocampo (em lugar de agir especificamente sobre o processo de consolidação da memória) animais previamente tratados com estas substâncias foram submetidos à tarefa de esquiva inibitória, paradigma onde a memória para ser formada, depende do hipocampo (Rossato *et al.*, 2006; da Silva *et al.*, 2008). Assim, o aparelho utilizado para o treino na tarefa de esquiva inibitória de uma única sessão consiste de uma caixa de madeira de 50,0 x 25,0 x 50,0 cm, com a parte frontal feita de acrílico. O assoalho do aparelho é formado por barras de bronze paralelas e no lado esquerdo da caixa, há uma plataforma de 5,0 cm de altura por 7,0 cm de largura.

Durante a sessão de treino, os animais foram cuidadosamente colocados sobre a plataforma elevada (Figura 6). Quando desciam desta, e colocavam as quatro patas na grade de barras de bronze eletrificáveis, recebiam um choque elétrico de 0,4 mA por 2 seg (Cammarota *et al.*, 2003) sendo imediatamente recolocados nas caixas-moradia. Para avaliar a retenção da memória de esquiva de longa duração, os animais foram submetidos a uma sessão de teste comportamental 24 h após o treino. O procedimento utilizado na sessão de teste foi idêntico àquele empregado na sessão de treino, exceto que ao descer da plataforma o animal não recebia choque. Para ambas as sessões, foram adotados tempos limite para a descida, sendo 30 seg para a sessão de treino e 300 seg para a sessão de teste. Aqueles animais que durante a sessão de treino não desceram da plataforma antes de transcorridos 30 seg foram eliminados do estudo.

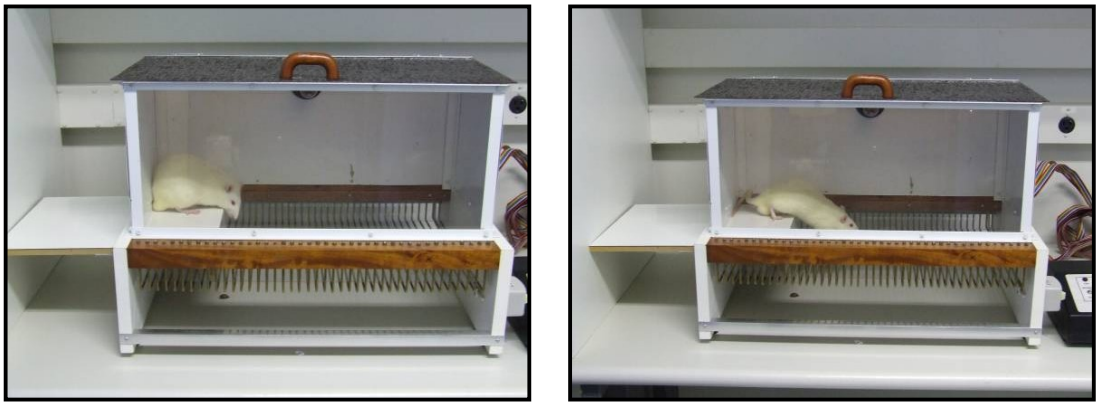

Figura 6 Fotografias da caixa de Esquiva Inibitória. Note-se o animal sobre a plataforma.

3.8 Tratamento farmacológico

Os compostos farmacológicos testados ou os veículos utilizados na diluição dos mesmos foram infundidos bilateralmente na região de interesse em diferentes tempos após o treino na tarefa do RO (no Dia 1) com auxílio de uma micro-seringa Hamilton, ou 24 h antes do treino na EI, Campo Aberto ou Labirinto em Cruz Elevado. O volume administrado foi 1 μl/lado. As cânulas de infusão foram mantidas dentro das cânulas-guia por pelo menos 60 seg após o fim da administração da droga, a fim de evitar o refluxo de líquido.

L-NN *(N_{ω}*-Nitroarginina-2,4-L-diaminobutírico amido di(trifluoroacetato), KT-5823, 8-Br-GMPc (8-bromoguanosina-3’,5’-monofosfato cíclico), noradrenalina,

timolol, BDNF (brain-derived neurotrophic factor) e anticorpo anti-BDNF foram obtidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), LY-83583 (6- Anilinoquinolina-5,8-quinona) e SNAP (S-nitroso-acetilpenicilamina) obtidos da Calbiochem (La Jolla, CA, USA). Os fármacos foram dissolvidos em DMSO 2% ou solução salina 0,9% e guardados protegidos da luz a -20°C até o uso. A infusão dos compostos foi realizada à temperatura ambiente e em uma sala com baixa luminosidade. As doses utilizadas foram determinadas com base em experimentos pilotos e em estudos prévios que mostraram o efeito destes fármacos sobre o aprendizado e a memória de ratos, e em outras variáveis comportamentais e fisiológicas.

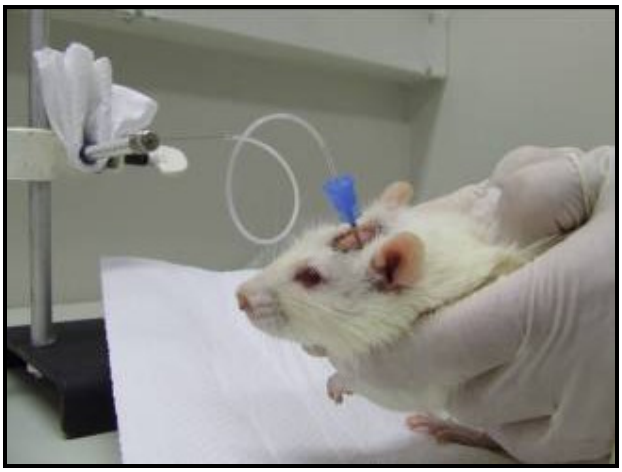

Figura 7 Infusão de fármacos através das cânulas-guia esterotaxicamente implantadas. A cânula de infusão, 1,0 mm maior em comprimento do que a cânula-guia é introduzida na luz desta, atingindo a região-alvo onde se deseja que o fármaco ou salina sejam infundidos.

3.9 Controle histológico da região estudada

A verificação do posicionamento anatômico das cânulas implantadas e do local atingido pela infusão foi realizada *post mortem*. Para isso, depois dos procedimentos comportamentais aos quais os animais foram submetidos, estes receberam a infusão de 1 μl de uma solução de azul de metileno 0,1% através das mesmas cânulas utilizadas para aplicação das drogas. Quinze minutos depois da infusão, os animais foram sacrificados por decapitação, seus cérebros removidos e colocados em uma solução de formol 4% por um período de quatro dias. Posteriormente, procedeu-se a análise histológica. Somente animais com a localização correta das cânulas foram considerados na análise estatística dos dados (Figura 1).

3.10 Experimentos bioquímicos

Nos experimentos bioquímicos foram utilizados 2 grupos controles: 1) Controle Absoluto total: animais que não receberam nenhum estímulo experimental e que foram utilizados como referência em todos os experimentos bioquímicos; 2) Controle: animais que não receberam nenhum estímulo experimental; 3) animais treinados e sacrificados em diferentes tempos após o treino.

3.11 Imunoblot

A separação eletroforética de proteínas foi realizada através de técnicas convencionais. A detecção imunológica das proteínas eletrotransferidas a membranas de PVDF foi realizada utilizando anticorpos secundários acoplados a peroxidase e um sistema quimioluminescente.

3.12 Medida da atividade da NOS

Para a medida da atividade da óxido nítrico sintase (NOS) no hipocampo foi utilizado o método colorimétrico empregando o Reagente de Griess. O método se resume em medir colorimetricamente a produção de ânion nitrito (NO_2^-) no meio, uma vez que a auto-oxidação do óxido nítrico gera como produto final, nitrito.

3.13 Análise Estatística

Para a análise estatística dos dados obtidos na tarefa de reconhecimento de objetos, utilizou-se o teste *t* de Student para amostra única (valor de referência 50). Para as tarefas do campo aberto, do labirinto em cruz elevado e da esquiva inibitória, assim como a para a atividade da óxido nítrico sintase foi utilizado teste *t* de Student. Para a análise estatística dos níveis de BDNF foi utilizado ANOVA seguido de contraste adequado. Valores de $p<0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

A análise estatística foi realizada em um computador Pentium IV 2.8 GHz utilizando o *software* Prism Graph-Pad 5.1.

4 RESULTADOS

4.1 A infusão intra-hipocampal de L-NN após o treino, impede a consolidação da memória de reconhecimento de objetos.

Em primeiro lugar decidimos investigar se a atividade da NOSn é requerida para a formação da memória de reconhecimento associada a tarefa do RO. Para tal, treinamos ratos na tarefa de reconhecimento de objetos (ver Metodologia) e, imediatamente, 180 ou 360 min, eles foram infundidos bilateralmente com L-NN (0.01-1 µg/lado), um inibidor especifico da NOSn, ou Veículo (Veh) na região CA1 do hipocampo dorsal. A retenção da memória foi avaliada 24 h após o treino. Durante esta sessão de teste, os animais foram expostos durante 5 minutos a um dos objetos que havia sido apresentado durante o treino juntamente com um objeto novo. Como se pode observar na figura 8A, os animais que receberam veículo (Veh) exploraram o objeto novo por tempo significativamente maior que o objeto conhecido, mostrando que retiveram a memória de longa duração para o objeto apresentado na sessão de treino. Entretanto os ratos que receberam infusão de L-NN na dose maior (1 µg/lado) passam a mesma quantidade de tempo explorando o objeto novo e o familiar durante a sessão de teste (Fig. 8A).

Isto sugere que a inibição da NOSn imediatamente após o treino bloqueia a consolidação da memória de reconhecimento de objetos de longa duração.

Em concordância com estes dados, o treino no RO aumentou a atividade das NOS na região CA1 do hipocampo dorsal, imediatamente após o treino (Fig. 8B).

Porém, quando o L-NN foi infundido na região CA1 do hipocampo dorsal 180 ou 360 min após o treino, não se observou efeito significante sobre a inibição da retenção da memória de RO (Fig. 8C).

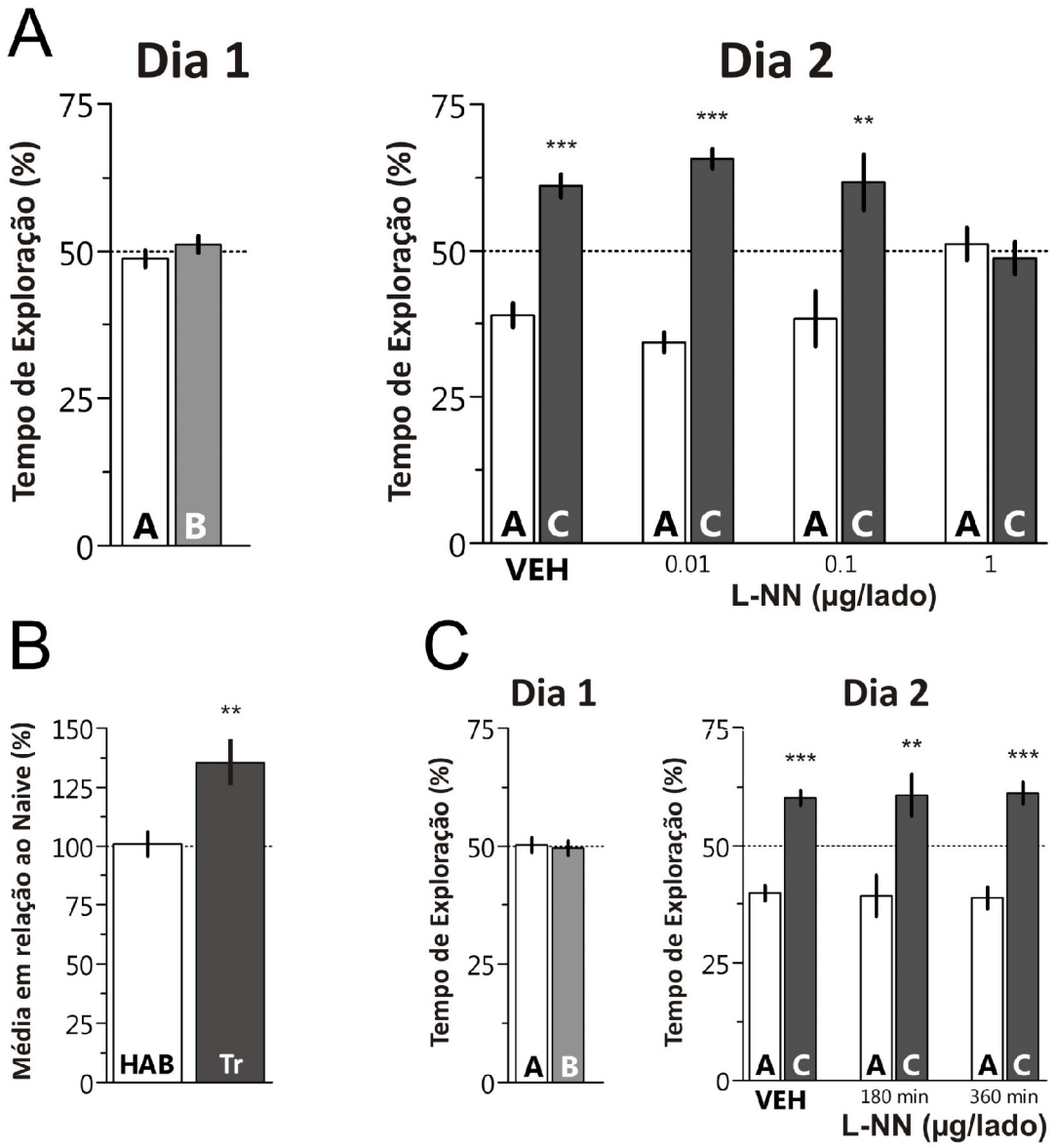

Figura 8 A infusão do inibidor da NOSn, L-NN, imediatamente mas não 180 ou 360 min após o treino, impede a retenção da memória de longa duração da tarefa de reconhecimento de objetos; o treino no RO aumenta a atividade da NOS. Ratos Wistar machos com cânulas estereotaxicamente posicionadas na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados na tarefa de Reconhecimento de Objetos. Para tanto, no Dia 1 (Treino; Tr), os ratos foram expostos a dois objetos distintos (A e B) por 5 min. *(A)* Imediatamente após o treino os animais receberam infusão bilateral (1 µl/lado) de veículo (Veh; 0,1% DMSO em salina) ou L-NN (0,1 – 1 µg/lado) na região CA1 do hipocampo dorsal. Os dados estão expressos como (média ± erro padrão) e são representados como porcentagem do tempo total de exploração. ***p<0,01 e **p<0,05 em teste *t* de Student. (n=10 por grupo). *(B)* Imediatamente após o treino no RO os animais foram sacrificados e a região CA1 hipocampal removida para a avaliação da atividade da NOS mediante o uso do Reagente de Griess Os dados estão expressos como (média ± erro padrão) em relação ao naive. ***p<0,01 e **p<0,05 em teste *t* de Student (n=4 por grupo). *(C)* Cento e oitenta ou 360 min após o treino os animais receberam infusão bilateral (1 µl/lado) de veículo (Veh; 0,1% DMSO em salina) ou L-NN (1 µg/lado) na região CA1 do hipocampo dorsal. No Dia 2 (Teste), os animais foram expostos a um objeto familiar (A) e um objeto novo (C) por 5 min, para avaliação da retenção da memória de longa duração. Os dados estão expressos como (média ± erro padrão) e são representados como porcentagem do tempo total de exploração. ***p<0,01 e **p<0,05 em teste *t* de Student. (n=10 por grupo).

O termo dependência de estado refere-se a um fenômeno em que a evocação de uma memória previamente adquirida é mais fácil se o indivíduo encontra-se no

mesmo estado neuro-humoral em que se encontrava no momento da aquisição. Neste sentido, o estado neuro-humoral participaria da aquisição da memória como mais um fator contextual do aprendizado, agindo como um estímulo condicionado. Tal acontecimento pode ser observado para diversas substâncias endógenas, como, por exemplo, os hormônios do estresse, e algumas exógenas, como morfina e álcool. Relatos têm descrito que a inibição da NOS hipocampal induz um déficit na memória de reconhecimento, devido a este fenômeno (Blokland *et al*., 1988) e que o NO modula uma amnésia estado-dependente causada pela administração pré-treino de morfina e lítio (Khavandgar *et al*., 2003; Zarrindast *et al*., 2007). Por esta razão estudamos se os efeitos negativos do L-NN poderiam dever-se à indução de um fenômeno deste tipo. Para responder esta questão treinamos animais que foram subdivididos em quatro diferentes grupos: 1) animais que receberam infusão de L-NN imediatamente após o treino e Veh 15 min antes do teste; 2) animais que receberam infusão de L-NN imediatamente após o treino e L-NN 15 nin antes do teste; 3) animais que receberam infusão de Veh imediatamente após o treino e Veh 15 antes do teste; 4) animais que receberam infusão de Veh imediatamente após o treino e L-NN 15 min antes do teste. Como pode se observar na figura 9, a infusão de L-NN imediatamente após o treino (como demonstrado anteriormente) induz amnésia e esta não é revertida pela infusão de L-NN 15 min antes do teste o que indica que o efeito amnésico da inibição da NOSn não ocorreu devido ao fenômeno de dependência de estado. Além disso, a infusão de L-NN 15 min antes do teste não exerce qualquer efeito sobre a formação deste tipo de memória.

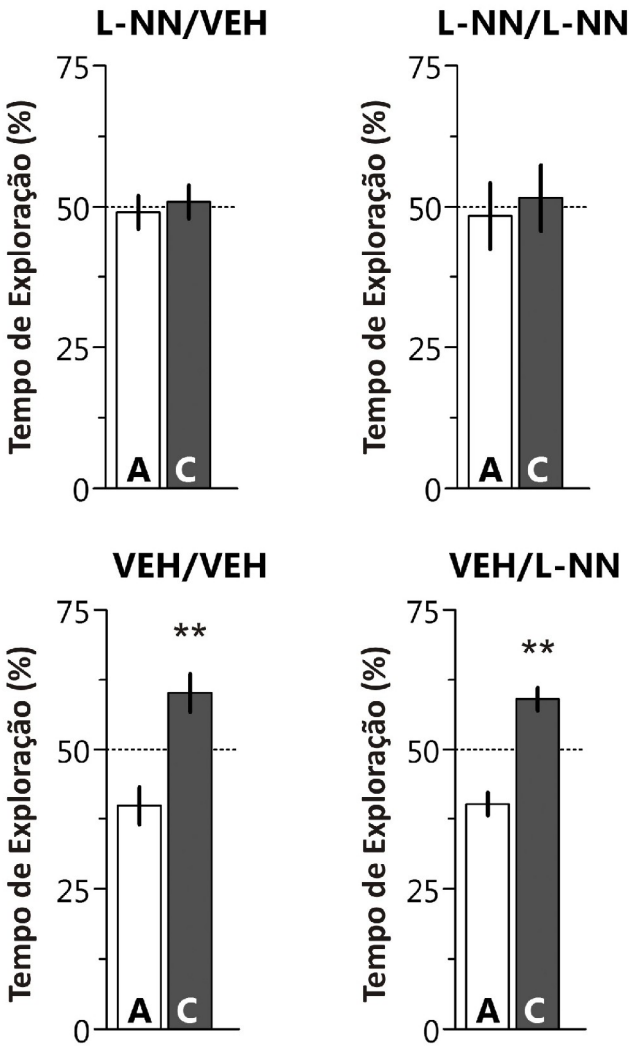

Figura 9 O efeito amnésico causado pela inibição da NOSn não ocorreu devido a dependência de estado. Ratos Wistar machos com cânulas posicionadas estereotaxicamente na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados na tarefa de Reconhecimento de Objetos. Para tanto, no Dia 1 (Treino; Tr), os ratos foram expostos a dois objetos distintos (A e B) por 5 min e imediatamente após o treino foram divididos em quatro grupos distintos que receberam diferentes combinações de infusões com (Veh; 0,1% DMSO em salina) ou L-NN (1 μg/lado) na região CA1 do hipocampo dorsal: 1) animais que receberam infusão de L-NN imediatamente após o treino e Veh 15 min antes do teste; 2) animais que receberam infusão de L-NN imediatamente após o treino e L-NN 15 nin antes do teste; 3) animais que receberam infusão de Veh imediatamente após o treino e Veh 15 antes do teste; 4) animais que receberam infusão de Veh imediatamente após o treino e L-NN 15 min antes do teste. Os dados estão expressos como (média ± erro padrão) e são representados como porcentagem do tempo total de exploração. **p<0,05 em teste *t* de Student. (n=10 por grupo).

Para averiguar se a infusão intra-hipocampal de L-NN exerceria alguma ação tardia no estado de ansiedade ou na atividade exploratória dos animais que pudesse mascarar a evocação da MLD de reconhecimento de objetos, infundimos bilateralmente VEH ou L-NN e submetemos os animais a uma sessão comportamental no campo aberto ou no labirinto em cruz elevado 24 horas após a infusão. Como pode se observar na tabela 3, o L-NN não afetou o número de entradas totais, o número de entradas nos braços abertos nem o tempo total gasto nos braços abertos durante uma sessão de 5 min no labirinto em cruz elevado. Similarmente, o L-NN não alterou nem o número de cruzamentos nem o número de

elevações durante uma sessão comportamental de 5 min de duração num campo aberto. Em conjunto, estes resultados indicam que quando infundida no hipocampo 24 h antes da avaliação comportamental, L-NN não modifica nem o estado de ansiedade nem a atividade motora dos animais (Tab. 3).

Para assegurar que o efeito amnésico causado por L-NN não se devia a um possível efeito permanente de perda da funcionalidade do hipocampo, ratos infundidos bilateralmente na região CA1 com L-NN (1 μg/lado) não mostraram nenhum déficit remanescente na sua capacidade de aprendizado após 24 horas. De fato, como se pode observar na tabela 3, quando infundidos bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal com L-NN 24 h antes do treino na tarefa da esquiva inibitória de sessão única, os ratos aprenderam normalmente a resposta condicionada aversiva (Tab. 3).

	VEH	**L-NN**
A) Labirinto em cruz-elevado		
Total de entradas	15.5 ± 1.3	14.5 ± 1.8
% de tempo nos braços abertos	40.2 ± 3.1	37.6 ± 4.8
B) Campo aberto		
Cruzamentos	35.9 ± 5.2	39.0 ± 5.5
Elevações	12.2 ± 2.5	12.8 ± 2.1
C) Esquiva inibitória		
Latência de descida na sessão de treino	10.2 ± 1.9	11.5 ± 3.1
Latência de descida na sessão de teste (S)	201.1 ± 30.5	228.7 ± 28.9

Tabela 3 A infusão de L-NN não afetou o desempenho dos animais na tarefa de campo aberto, labirinto em cruz elevado e esquiva inibitória. Ratos Wistar machos com cânulas posicionadas estereotaxicamente na região CA1 do hipocampo dorsal receberam 24 h antes das tarefas, infusão bilateral de veículo (Veh; 0,1% DMSO em salina) ou L-NN (1ug/lado). *(A)* Ratos foram submetidos à tarefa de campo aberto para verificar se L-NN afetaria a atividade locomotora. Os dados (média ± erro padrão) são representados como número de eventos. **p<0,05 em teste *t* de Student. (n=10 por grupo). *(B)* Os animais foram submetidos à tarefa do labirinto em cruz elevado para verificar o estado de ansiedade. *(C)* Os animais foram submetidos à tarefa de esquiva inibitória para verificar a funcionalidade do hipocampo. Os dados (média ± erro padrão) são representados como tempo em seg. **p<0,05 em teste *t* de Student. (n=10 por grupo).

4.2 A infusão intra-hipocampal de LY83583 ou KT5823 após o treino impede a consolidação da memória de reconhecimento de objetos e a infusão intra-hipocampal de 8-Br-GMPc é capaz de reverter o efeito amnésico causado por L-NN e LY83583 sobre a consolidação da memória de reconhecimento de objetos, mas não é capaz de reverter o efeito amnésico de KT5823.

Uma vez que a via de sinalização NO/GMPc/PKG esta envolvida em muitas das respostas fisiológicas do NO, em diferentes preparações experimentais (Spolidório *et al*., 2007; Bouallegue *et al*., 2007; Haghikia *et al*., 2007; Prieto-Castelló *et al*., 2007), e já que encontramos que a inibição da NOSn prejudica a formação da memória de reconhecimento de objetos, resolvemos investigar a participação desta cascata de sinalização na formação dessa memória. Para tal, treinamos animais como descrito anteriormente e, em diferentes tempos após a sessão de treino, eles foram infundidos bilateralmente com o inibidor da GCs, LY83583 (0,002 - 0,2 μg/lado; Fig. 10A) ou com o inibidor da PKG, KT5823 (0,001 - 0,1 μg/lado; Fig. 10B) ou Veículo (Veh) imediatamente após o treino, na região CA1 do hipocampo dorsal. A retenção da memória foi avaliada 24 h após o treino. Durante esta sessão de teste, os animais foram expostos durante 5 minutos a um dos objetos que tinha sido apresentado durante o treino juntamente com um objeto novo. Como se pode observar na Fig.10, os animais que receberam veículo (Veh) exploraram o objeto novo por tempo significativamente maior que o objeto conhecido, mostrando que retiveram a memória de longa duração para o objeto apresentado na sessão de treino. Entretanto os ratos que receberam infusão de LY83853 ou KT5823 na dose maior (0,2 e 0,1 µg/lado respectivamente) passaram a mesma quantidade de tempo explorando o objeto novo e o familiar durante a sessão de teste.

Isto sugere que a inibição da GCs e da PKG imediatamente após o treino bloqueiam a consolidação da memória de reconhecimento de objetos de longa duração.

Após termos realizado experimentos onde verificamos que a atividade da NOSn, bem como da GCs e da PKG hipocampais se fazem necessárias para a formação da memória de reconhecimento de longa duração decidimos investigar se o análogo não-hidrolisável do GMPc, o 8-Br-GMPc, teria a capacidade de reverter o efeito amnésico causado por L-NN, LY83583 e KT5823. Para tanto, treinamos animais como descrito na metodologia e imediatamente após o treino realizamos a infusão de 8-Br-GMPc (5 μg/lado) com L-NN (1 μg/lado), LY83583 (0,2 μg/lado) ou

KT5823 (0,1 μg/lado), como pode se observar na figura 10C, 8-Br-GMPc reverteu o efeito amnésico de L-NN e LY83583, mas não aquele induzido por KT5823.

Nossos resultados sugerem que a PKG é posteriormente ativada em relação a NOS e a GC nesta via de sinalização proposta como NO/GMPc/PKG.

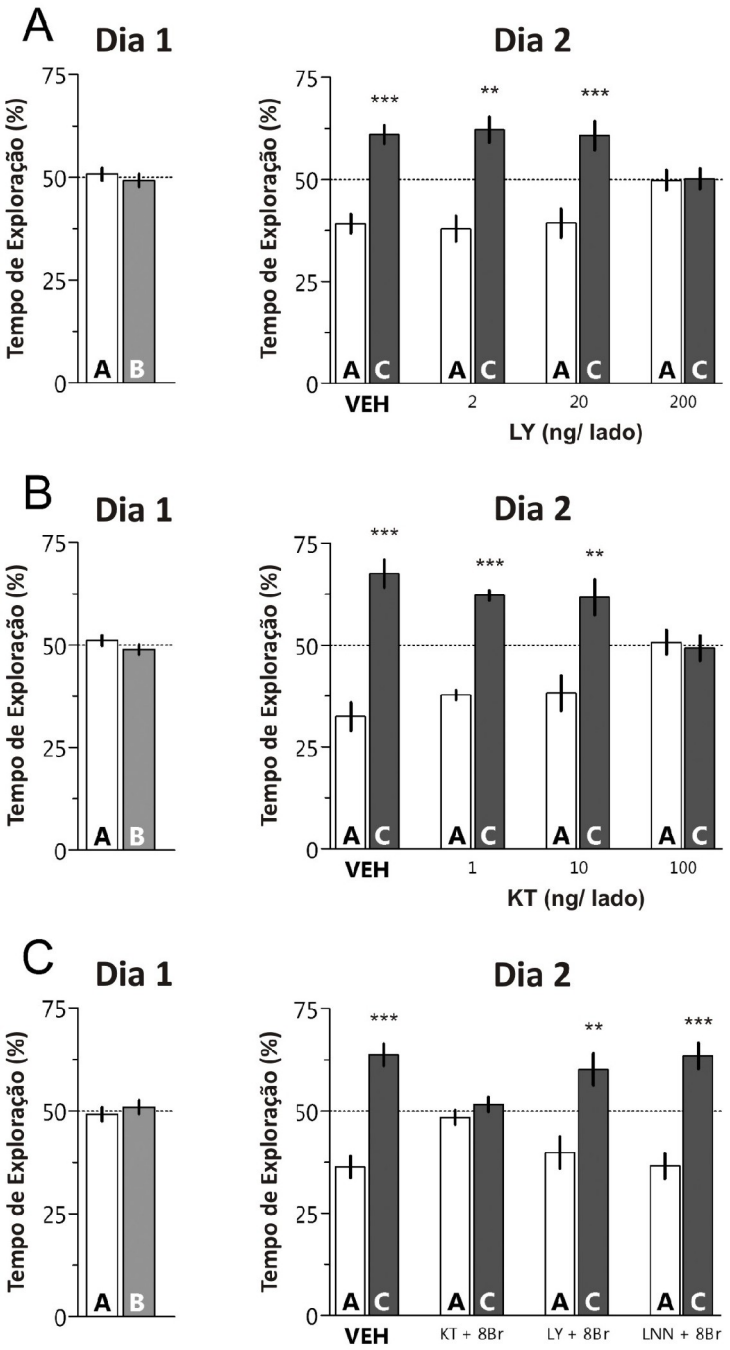

Figura 10 A infusão do inibidor da GCs, LY83583 ou do inibidor da PKG, KT5823, imediatamente após o treino impedem a retenção da memória de longa duração de reconhecimento de objetos. Ratos Wistar machos com cânulas posicionadas estereotaxicamente na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados na tarefa de Reconhecimento de Objetos. Para tanto, no Dia 1 (Treino; Tr), os ratos foram expostos a dois objetos distintos (A e B) por 5 min. *(A)* Imediatamente após o treino, os animais receberam infusão bilateral (1 µl/lado) de veículo (Veh; 0,1% DMSO em salina) ou LY83583 (0,002 - 0,2 µg/lado) na região CA1 do hipocampo dorsal. *(B)* Imediatamente após o treino, os animais receberam infusão bilateral (1 µl/lado) de veículo (Veh; 0,1% DMSO em salina) ou KT5823 (0,001 - 0,1 µg/lado) na região CA1 do hipocampo dorsal. *(C)* Imediatamente após o treino, os animais receberam infusão bilateral (1 µl/lado) de veículo (Veh; 0,1% DMSO em salina) ou a co-infusão de L-NN (1 µg/lado), de LY83583 (0,2 µg/lado) e de KT5823 (0,1 µg/lado) com 8-Br-GMPc (5 µg/lado). No Dia 2 (Teste), os animais foram expostos a um objeto familiar (A) e um objeto novo (C) por 5 min, para avaliação da retenção da memória de longa duração. Os dados estão expressos como (média ± erro padrão) e são representados como porcentagem do tempo total de exploração. ***p<0,01 e **p<0,05 em teste *t* de Student. (n=10 por grupo).

4.3 A infusão de timolol imediatamente após o treino impede a retenção da memória de longa duração de reconhecimento de objetos e 8-Br-GMPc e SNAP não são capazes de reverter seu efeito amnésico. Porém a NA é capaz de reverter o efeito amnésico causado por L-NN, LY83583 e KT5823.

Ainda que os efeitos fisiológicos da via NOS/GMPc/PKG no hipocampo não tenham sido inteiramente elucidados, inúmeros relatos indicam que a liberação de NA é um importante fator situado abaixo dessa cascata de sinalização. Com relação a isto, tem-se demonstrado que a inibição de NOSn impede a diminuição de NA hipocampal induzida pelo bloqueador de NA, DSP-4 (Szökõ *et al*., 2001), e que doadores de NO estimulam a liberação de NA em fatias hipocampais (Lonart *et al*., 1992; Satoh *et al*., 1996; 1997) e potenciam a liberação obtida por 3,4-diaminopiridina (Lauth *et al*., 1993) e NMDA (Jones *et al*., 1994, 1995; Stout e Woodward, 1995).

Para verificarmos a ação dos receptores β-adrenérgicos nesta via de sinalização, administramos na região CA1 do hipocampo dorsal, timolol (1 μg/lado), um bloqueador dos receptores β-noradrenérgicos, que como podemos observar na figura 11 prejudicou a retenção da MLD do RO. Seu efeito amnésico não foi revertido pela co-infusão de 8-Br-GMPc (5 μg/lado) ou do doador de NO, SNAP (5 μg/lado) (Fig. 11).

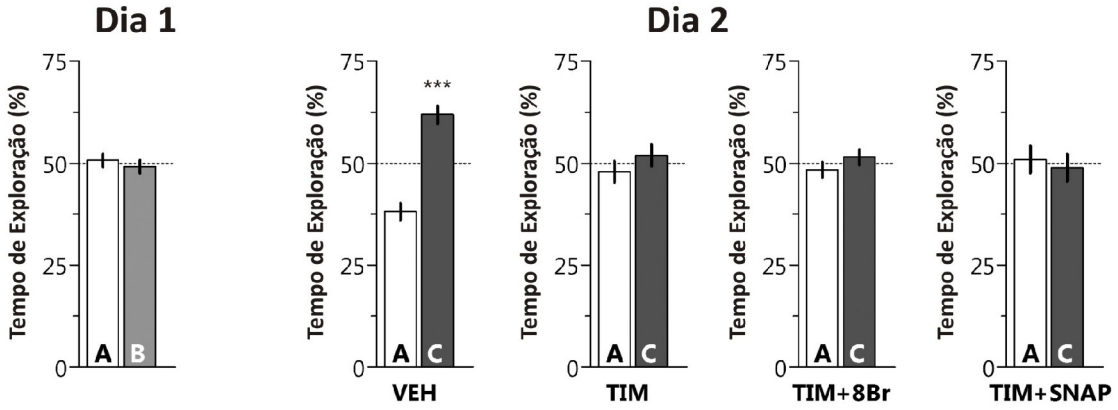

Figura 11 A infusão de timolol imediatamente após o treino impede a retenção da memória de longa duração de reconhecimento de objetos e 8-Br-GMPc e SNAP não são capazes de reverter seu efeito amnésico. Ratos Wistar machos com cânulas posicionadas estereotaxicamente na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados na tarefa de Reconhecimento de Objetos. Para tanto, no Dia 1 (Treino; Tr), os ratos foram expostos a dois objetos distintos (A e B) por 5 min. Imediatamente após o treino, os animais receberam infusão bilateral (1 μl/lado) de veículo (Veh; 0,1% DMSO em salina) ou de timolol (1 μg/lado), além da co-infusão de timolol (1 μg/lado) com 8-Br-GMPc (5 μg/lado) ou SNAP (5 μg/lado). Os dados estão expressos como (média ± erro padrão) e são representados como porcentagem do tempo total de exploração. ***p<0,01 e **p<0,05 em teste *t* de Student. (n=10 por grupo).

Entretanto, a amnésia causada pela infusão intra-CA1 de L-NN, LY83583 e KT5823 foi revertida pela co-administração de NA (1 μg/lado) (Fig. 12), indicando que a estimulação de receptores β-adrenérgicos hipocampais é essencial para a consolidação da memória de longa duração no RO, e que este processo está intimamente ligado à ativação da via de sinalização NOS/GMPc/PKG.

Estes resultados indicam que a ativação dos receptores β-noradrenérgicos é importante para a formação da memória de reconhecimento de objetos e por sua vez ocorre posteriormente a ativação da via NO/GMPc/PKG, já que a infusão de NA é capaz de reverter o efeito amnésico induzido pelos inibidores desta via.

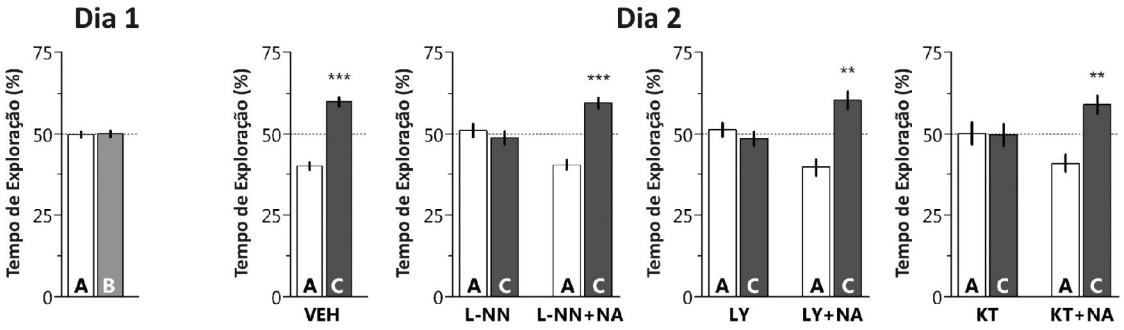

Figura 12 A amnésia causada pela infusão intra-CA1 de L-NN, LY83583 e KT5823 é revertida pela co-administração de NA. Ratos Wistar machos com cânulas posicionadas estereotaxicamente na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados na tarefa de Reconhecimento de Objetos. Para tanto, no Dia 1 (Treino; Tr), os ratos foram expostos a dois objetos distintos (A e B) por 5 min. Imediatamente após o treino, os animais receberam a infusão bilateral (1 μl/lado) de veículo (Veh; 0,1% DMSO em salina) ou a co-infusão de NA (1 μg/lado) com L-NN (1 μg/lado), LY83583 (0,2 μg/lado) ou KT5823 (0,1 μg/lado). No Dia 2 (Teste), os animais foram expostos a um objeto familiar (A) e um objeto novo (C) por 5 min, para avaliação da retenção da memória de longa duração. Os dados estão expressos como (média ± erro padrão) e são representados como porcentagem do tempo total de exploração. ***p<0,01 e **p<0,05 em teste *t* de Student. (n=10 por grupo).

4.4 A infusão intra-hipocampal de Anti-BDNF após o treino impede a consolidação da memória de reconhecimento de objetos. E a infusão intra-hipocampal de BDNF não é capaz de reverter o efeito amnésico induzido por L-NN ou timolol após o treino na tarefa de reconhecimento de objetos.

Descobertas recentes sugerem que, através de mecanismos dependentes de GMPc e NA, o NO aumenta a expressão de BDNF (Chen e Russo-Neustadt, 2007), uma neurotrofina que apresenta papel essencial na formação e persistência de memórias (Lu *et al*., 2008; Bekinschtein *et al*., 2008). Assim, resolvemos investigar a possível existência de uma ligação entre a ativação da NOS, a estimulação de receptores β-adrenérgicos e a expressão de BDNF durante a formação da memória de RO. Para tal treinamos animais na tarefa do RO como descrito anteriormente e em diferentes tempos após o treino os animais foram sacrificados e a região CA1 do hipocampo dorsal dissecada para análises posteriores. Como podemos observar, quando treinamos animais na tarefa do RO e os submetemos à infusão bilateral na região CA1 do hipocampo dorsal do anticorpo Anti-BDNF (0,5 μg/lado) imediatamente após o treino, observamos um claro prejuízo na retenção da memória de RO (Fig. 13A). Ainda, a co-infusão de BDNF, em uma dose previamente mostrada por reverter a amnésia induzida por inibidores de síntese protéica em memórias de medo (Beckinschtein *et al*., 2007), não previne o efeito amnésico causado por L-NN ou timolol (Fig. 13B). Além disso, o treino na tarefa do reconhecimento de objetos induz um aumento nos níveis de BDNF na região CA1 hipocampal, apresentando um máximo em 120 min após o treino (Fig.13C) e quando administrado na região CA1 do hipocampo dorsal, imediatamente após o treino, L-NN e timolol bloqueiam, enquanto SNAP e NA levam ao aumento de BDNF desencadeado pelo RO (Fig. 13D).

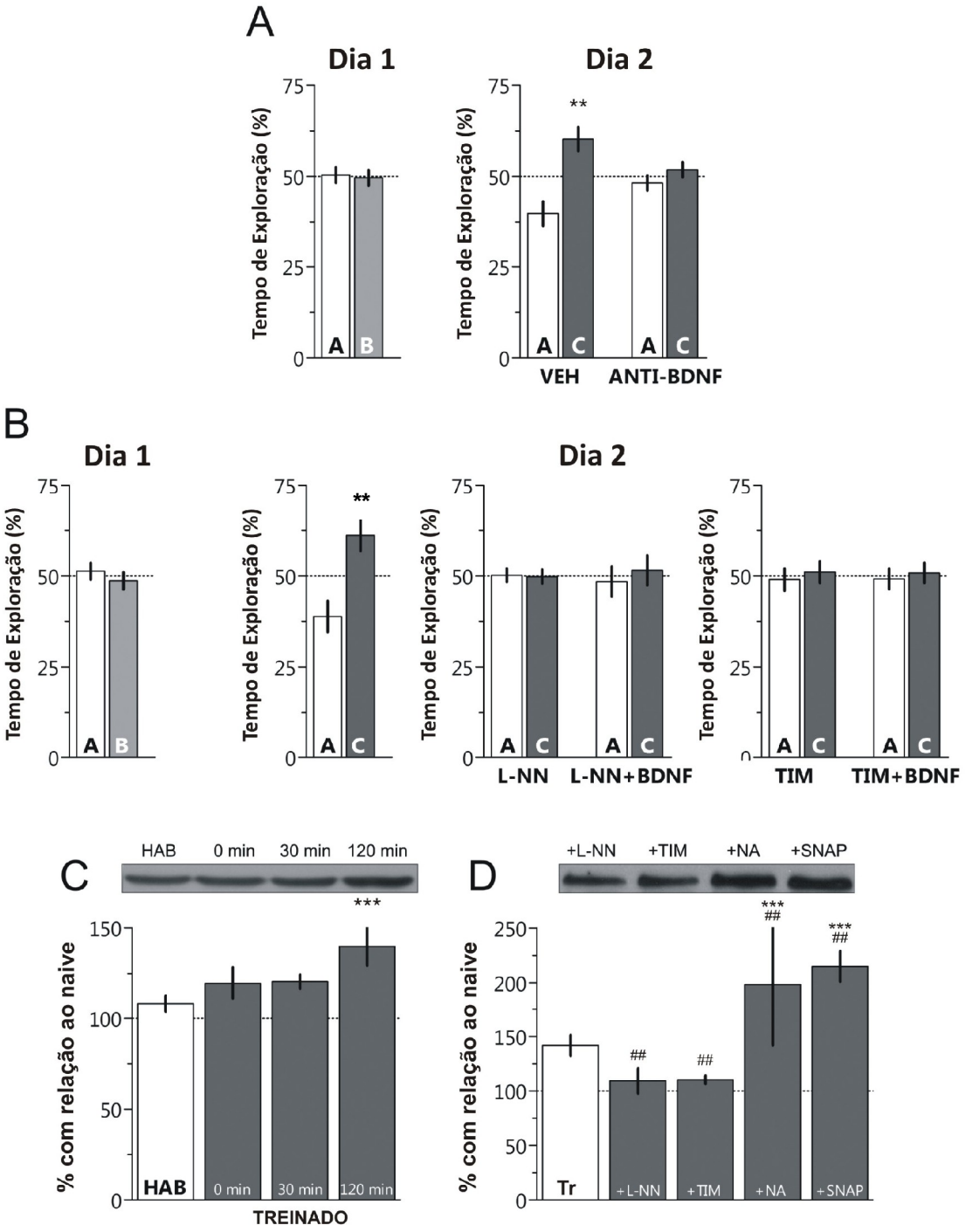
A
Dia 1
Dia 2
Tempo de Exploração (%)
75
50
25
0
A
B
C
**
VEH
ANTI-BDNF
B
Dia 1
Dia 2
L-NN
L-NN+BDNF
TIM
TIM+BDNF
C
HAB
0 min
30 min
120 min
***
% com relação ao naive
150
100
50
TREINADO
D
+L-NN
+TIM
+NA
+SNAP
250
200
150
100
50
Tr
##
***
##

Figura 13 A) A infusão intra-CA1, do anticorpo anti-BDNF prejudica a retenção da memória do RO. Ratos Wistar machos com cânulas posicionadas estereotaxicamente na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados na tarefa de Reconhecimento de Objetos. Para tanto, no Dia 1 (Treino; Tr), os ratos foram expostos a dois objetos distintos (A e B) por 5 min e imediatamente após o treino, os animais receberam a infusão bilateral (1 μl/lado) de veículo (Veh; 0,1% DMSO em salina) ou a infusão do anticorpo anti-BDNF (0,5 μg/lado). No Dia 2 (Teste), os animais foram expostos a um objeto familiar (A) e um objeto novo (C) por 5 min, para avaliação da retenção da memória de longa duração. Os dados estão expressos como (média ± erro padrão) e são representados como porcentagem do tempo total de exploração. ***p<0,01 e **p<0,05 em teste *t* de Student. (n=10 por grupo). **B) A infusão de BDNF não reverte o efeito amnésico de L-NN ou timolol quando administrados imediatamente após o treino.** Ratos Wistar machos com cânulas posicionadas estereotaxicamente na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados na tarefa de Reconhecimento de Objetos. Para tanto, no Dia 1 (Treino; Tr), os ratos foram expostos a dois objetos distintos (A e B) por 5 min. (A) Imediatamente após, os animais receberam infusão bilateral (1 μl/lado) de veículo (Veh; 0,1% DMSO em salina), ou a co-infusão de BDNF (0,25 μg/lado) com L-NN (1 μg/lado). Imediatamente após, os animais receberam infusão bilateral (1 μl/lado) de veículo (Veh; 0,1% DMSO em salina), ou a co-infusão de BDNF (0,25 μg/lado) com timolol (1 μg/lado). Os dados estão expressos como (média ± erro padrão) e são representados como porcentagem do tempo total de exploração em teste *t* de Student. (n=10 por grupo). **C) O treino no RO induz um aumento nos níveis de BDNF na região CA1 hipocampal.** Ratos Wistar machos foram treinados na tarefa de Reconhecimento de Objetos. Para tanto, no Dia 1 (Treino; Tr), os ratos foram expostos a dois objetos distintos (A e B) por 5 min e imediatamente, 30 ou 120 min após o treino os animais foram sacrificados e a região CA1 do hipocampo dorsal removida. Os níveis da proteína BDNF foram verificados mediante técnica de Western-Blot. Os dados estão expressos (média ± erro padrão) e são representados como porcentagem em relação ao grupo controle absoluto total. ***p<0,01 e **p<0,05 em teste ANOVA seguido de Dunnet (n=4 por grupo). **D) Quando administrados na região CA1 do hipocampo dorsal, imediatamente após o treino, L-NN e timolol (TIM) bloqueiam, enquanto SNAP e noradrenalina (NA) aumentam os níveis de BDNF na tarefa do RO.** Ratos Wistar machos foram treinados na tarefa de Reconhecimento de Objetos. Para tanto, no Dia 1 (Treino; Tr), os ratos foram expostos a dois objetos distintos (A e B) por 5 min e imediatamente após o treino os animais receberam a infusão de L-NN (1 μg/lado), TIM (1 μg/lado), NA (1 μg/lado) ou SNAP (5 μg/lado), e foram sacrificados 120 min após e a região CA1 do hipocampo dorsal removida. Os níveis da proteína BDNF foram verificados mediante técnica de Western-Blot. Os dados estão expressos como (média ± erro padrão) e são representados como porcentagem do tempo total de exploração. $^{###}$p<0,01 e $^{##}$p<0,05 e são representados como porcentagem em relação ao grupo controle (naive), em teste ANOVA seguido de Tukey (n=4 por grupo). ***p<0,01 e são representados como porcentagem em relação ao grupo treinado 120 min, em teste ANOVA seguido de Tukey (n=4 por grupo).

Nossos experimentos indicam que a neurotrofina BDNF é necessária para que ocorra a formação da memória de reconhecimento, uma vez que o treino nesta tarefa induz a um aumento nesta proteína e que a infusão de anti-BDNF prejudica a retenção desta memória.

No entanto, apesar de ser necessário, o BNDF não é suficiente para formação deste tipo de memória, já que não é capaz de reverter o efeito amnésico causado pela inibição da NOSn e pelo bloqueio dos receptores β-adrenérgicos.

5 DISCUSSÃO

Nossos resultados mostram que:

1) A infusão do inibidor da óxido nítrico sintase neuronal, L-NN, imediatamente após o treino na tarefa de RO, impede a formação da memória de longa duração.

2) A infusão do inibidor da guanilil ciclase solúvel (GCs), LY-83583, imediatamente após o treino na tarefa de RO, impede a formação da memória de longa duração.

3) A infusão do inibidor seletivo da PKG, KT-5823, imediatamente após o treino na tarefa de RO, impede a formação da memória de longa duração.

4) O efeito amnésico causado pelo inibidor da NOS, L-NN, na região CA1 do hipocampo dorsal, imediatamente após o treino na tarefa de RO não se deve ao estabelecimento de dependência de estado.

5) O efeito amnésico causado pela infusão intra-CA1 de LY-83583 e L-NN é revertido com a co-infusão do análogo não-hidrolisável do GMPc, 8-Br-GMPc, porém o efeito amnésico ocasionado pela infusão de KT5823 não é revertido, imediatamente pós-treino na tarefa de RO.

6) O antagonista β-adrenérgico não-seletivo, timolol, bloqueia a retenção da memória de RO.

7) O efeito amnésico causado pela infusão intra-CA1 de timolol, não é revertido com a co-infusão de SNAP e 8-Br-GMPc, imediatamente pós-treino.

8) O efeito amnésico causado pela infusão intra-CA1 de LY-83583, KT-5823, L-NN é revertido com a co-infusão do agonista adrenérgico, noradrenalina, imediatamente pós-treino.

9) A infusão do anticorpo Anti-BDNF, imediatamente após o treino na tarefa de RO, impede a formação da memória de longa duração. E BDNF não é capaz de reverter o efeito amnésico induzido por L-NN ou timolol após o treino na tarefa de reconhecimento de objetos.

10) Observa-se um aumento na expressão de BDNF 120 min após o treino na tarefa de RO.

Os resultados mostrados corroboram com resultados previamente descritos sobre o envolvimento da via de sinalização durante o processamento da informação. Sabe-se que a inibição da atividade da NOS prejudica a memória em diferentes modelos experimentais, incluindo galinhas (Rickard *et al*., 1998), peixes (Xu *et al*., 2007), camundongos (Baratti e Kopf, 1996) e ratos (Myslivecek *et al*., 1996) enquanto que ativadores da NOS e doadores de NO são conhecidos por aumentar a retenção de memórias (Telegdy e Kokavszky, 1997; Khavandgar *et al*., 2003; Pitsikas *et al*., 2005). Além disso, drogas que reduzem a atividade da GCs e da PKG também reduzem a retenção de memórias enquanto que, drogas que aumentam os níveis de GMPc, melhoram a retenção de memórias (Bernabeu *et al*., 1996; 1997; Chien *et al*., 2005). Entretanto, quase todos os estudos relativos ao papel do NO no processamento de memórias empregam motivação com medo ou alguma tarefa que envolva um aprendizado condicionado ao medo, mas pouco se sabe sobre a participação da cascata de sinalização NO/GMPc/PKG em memórias declarativas.

Paradigmas de aprendizado baseados no reconhecimento de objetos (RO) são importantes para entender a neurobiologia das memórias declarativas e por esse motivo foi empregado neste trabalho para analisar a participação da via de sinalização NO/GMPc/PKG na formação destas memórias.

Assim, os resultados apresentados demonstram que o inibidor da NOSn, L-NN, administrado intra-CA1 imediatamente após o treino na tarefa de RO prejudica a retenção da memória 24 h após o treino. Porém quando a infusão ocorre 180 ou 360 min após o treino, esse efeito já não é mais observado. Esses resultados são confirmados quando se observa que a atividade da NOSn apresenta-se aumentada imediatamente após o treino na tarefa de RO. A inibição da NOS hipocampal poderia estar causando um déficit na memória de reconhecimento devido ao fenômeno de dependência de estado (Blokland *et al*., 1998), no entanto, como foi observado, a infusão de L-NN intra-CA1 não induziu a ocorrência desse fenômeno na memória de RO.

Ainda, quando administrada 24 h antes da respectiva sessão comportamental, esta droga não afetou o desempenho de animais nas tarefas de Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevado, ou seja, o efeito amnésico causado por L-NN no RO provavelmente se deve a uma ação específica sobre o processo de consolidação da memória, já que não se observa modificação na atividade locomotora, exploratória ou estado de ansiedade do animal. Além disso, ratos que receberam L-NN intra-CA1

24 h antes de serem treinados no paradigma da EI foram capazes de formar e conservar a memória pertinente a esta tarefa. Já que a formação da memória de EI depende da participação funcional do hipocampo, este resultado demonstra que o efeito amnésico que esta droga tem sobre a memória de reconhecimento não se deve à indução de danos permanentes ao hipocampo, mas a um efeito inibitório real sobre o processo de consolidação.

Dando sequência a cascata de sinalização que ocorre na via NO/GMPc/PKG, observamos que inibidores da GCs (LY83583) e da PKG (KT5823) quando administrados intra-CA1 imediatamente após o treino, bloqueiam a retenção da memória de RO no teste realizado 24 h depois e assim como L-NN, não apresentam efeito na retenção da memória de RO quando infundidos 180 ou 360 min após o treino.

A co-infusão dos inibidores da cascata de sinalização NO/GMPc/PKG, com o análogo não-hidrolisável do GMPc, 8-Br-GMPc, foi capaz de reverter o efeito amnésico causado por L-NN e LY83583 mas não o causado por KT5823.

Ainda que os efeitos fisiológicos da via NO/GMPc/PKG no hipocampo não tenham sido inteiramente elucidados, inúmeros relatos indicam que a liberação de NA é um importante fator situado abaixo dessa cascata de sinalização, assim a verificação da participação dos receptores β-adrenérgicos se deu pela administração intra-CA1 do inibidor destes, timolol, que bloqueou a retenção da MLD de RO e cujo efeito não foi revertido pela co-infusão com 8-Br-GMPc e pelo doador de NO, SNAP.

A amnésia induzida pelos inibidores L-NN, LY83583 e KT5823 foi revertida pela co-administração de NA, na região CA1 do hipocampo dorsal o que indica que a estimulação de receptores β-adrenérgicos hipocampais é essencial para a consolidação da memória de longa duração no RO, e que este passo está abaixo na ativação da via de sinalização NOS/GCs/GMPc/PKG.

Como a indução de BDNF parece aumentar através de mecanismos dependentes GMPc e NA, verificamos que o treino no RO induz um aumento de BDNF na região CA1 hipocampal com um pico 120 min após o treino, e a infusão do anticorpo anti-BDNF prejudica a retenção da memória de RO.

Além disso, quando administrado na região CA1 do hipocampo dorsal, imediatamente após o treino, L-NN e timolol demonstraram bloquear, enquanto SNAP e NA aumentaram os níveis de BDNF desencadeado pelo RO.

As primeiras evidências que o NO aumenta os níveis de GMPc em diferentes localizações, incluindo o cérebro, foram descritas por Arnold e colaboradores (1977) e foi confirmada por Gerzer e colaboradores (1981), quem purificou em pulmões uma guanilil ciclase estimulada por nitroprussiato de sódio solúvel e depois por Garthwaite e colaboradores (1988) e Bredt e Snyder (1989).

Além disso, há inúmeros trabalhos sugerindo a participação da regulação mediada pelo NO na via da GCs/PKG, durante a plasticidade neuronal onde observa-se que a indução de LTP e/ou de LTD requerem a atividade da GCs e PKG no córtex visual (Haghikia *et al*., 2007), no cerebelo (Shin e Linden, 2005), na medula espinhal (Zhang, Zhang & Zhao, 2006) na amídala (Chien *et al*., 2003) e no hipocampo (East e Garthwaite, 1991; Chetkovich *et al*., 1993; Arancio *et al.,* 1995; Boulton *et al*., 1995; Bon e Garthwaite, 2003; Zhuo *et al*., 1994b; Gage *et al*., 1997; Stanton *et al*., 2003). Ainda, inúmeros estudos farmacológicos e comportamentais, incluindo alguns descritos recentemente (Domek-Lopacinska e Strosznajder, 2008; Wang *et al*., 2008) indicam uma ligação entre a síntese de NO e um aumento nos níveis de GMPc e na atividade da PKG, sendo que ambos são importantes na formação de memórias; demonstrando-se ainda que o bloqueio da síntese de NO através de inibidores da NOS é capaz de bloquear a expressão de LTP em fatias hipocampais (Haley *et al*., 1992; Schuman e Madison, 1991).

Em tarefas comportamentais, a administração sistêmica de inibidores da NOS tem demonstrado prejudicar a retenção da memória no labirinto radial (Böhme *et al*., 1993; Noda *et al*., 1997; Yamada *et al*., 1995; Zou *et al*., 1998) ou no labirinto aquático de Morris (Chapman *et al*., 1992; Hölscher *et al*., 1995; Koylu *et al*., 2005; Majlessi *et al*., 2003; Mogensen *et al*., 1995; Prendergast *et al*., 1997). Enquanto estudos descrevendo o papel do GMPc, demonstram que imediatamente após o treino na tarefa de esquiva inibitória ocorre um aumento nos níveis de GMPc no hipocampo, e que a administração de um análogo do GMPc imediatamente após o treino na esquiva, melhora a retenção dessa memória aversiva (Bernabeu *et al*., 1996), além de inibidores da GCs causarem amnésia quando infundidos após o treino (Bernabeu *et al*., 1997).

O NO induz a liberação de NA de fatias hipocampais (Lonart *et al*., 1992) a partir dos terminais nervosos noradrenérgicos e indiretamente através da liberação de glutamato (Lonart e Johnson, 1995). Usando doadores de NO, ocorre um aumento na liberação de NA e glutamato de maneira dependente de GMPc (Lei *et*

al., 2000; Satoh *et al*., 1996). E tem-se descrito que a inibição de NOSn impede a diminuição de NA hipocampal induzida pelo bloqueador de NA, DSP-4 (Szökõ *et al*., 2001), e que doadores de NO estimulam a liberação de NA em fatias hipocampais (Lonart *et al*., 1992; Satoh *et al*., 1996; 1997).

Estudos têm demonstrado que um aumento na neurotrifina, BDNF em cultura de neurônios hipocampais, se deve a NA, e é dependente de NO (Chen *et al*., 2007). Efeitos similares ocorrem pela atividade de um alvo intracelular do NO, a GCs, ou pelo aumento dos níveis de GMPc, sendo a secreção de BDNF mediada também pela PKG (Canossa *et al*., 2002). Ainda, os efeitos da NA nos níveis de BDNF são inibidos quando a NA é aplicada na presença de um capturador de NO ou um inibidor da NOS e o tratamento com um doador de NO leva a um aumento de BDNF (Chen *et al*., 2007).

Levando-se em consideração que as memórias declarativas constituem memórias de grande importância, por permitirem que recordemos de fatos e eventos relativos a experiências; se torna de grande importância a descoberta de vias de sinalização que possam estar envolvidas na aquisição e consolidação deste traço. Tem sido descrito o envolvimento da via de sinalização NO/GMPc/PKG na formação de memórias e a consequente relação desta com receptores β-adrenérgicos. Sendo assim, neste trabalho buscamos demonstrar os passos envolvidos nesta via de sinalização e os efeitos que inibidores e ativadores das distintas proteínas participantes causam sobre a consolidação da memória na tarefa de RO.

Assim, é importante destacar que os resultados obtidos indicam que a inibição da via de sinalização NO/GMPc/PKG, na região CA1 do hipocampo dorsal, impede a consolidação da memória para a tarefa de reconhecimento de objetos, assim como o bloqueio de receptores β-adrenérgicos, e esse efeito é revertido por NA e por análogos dos produtos desta via de sinalização.

6 CONCLUSÕES

A partir da análise dos resultados obtidos nesta dissertação pode-se concluir que a inibição da via de sinalização NO/GMPc/PKG; durante um restrito intervalo de tempo; na região CA1 do hipocampo dorsal, impede a consolidação da memória para a tarefa de reconhecimento de objetos, assim como o bloqueio de receptores β-adrenérgicos, e esse efeito é revertido por NA e por análogos dos produtos desta via de sinalização. Além de demonstrar que a neurotrofina, BDNF, é necessária para consolidação da memória da tarefa de reconhecimento de objetos.

Esta conclusão baseia-se nas seguintes observações:

- A infusão do inibidor da óxido nítrico sintase neuronal (NOSn), L-NN, na região CA1 do hipocampo dorsal imediatamente, mas não 180 ou 360 min após o treino na tarefa de RO, impede a formação da memória de longa duração.

- A infusão do inibidor da guanilil ciclase solúvel (GCs), LY-83583, na região CA1 do hipocampo dorsal imediatamente, mas não 180 ou 360 min após o treino na tarefa de RO, impede a formação da memória de longa duração.

- A infusão do inibidor seletivo da PKG, KT-5823, na região CA1 do hipocampo dorsal imediatamente, mas não 180 e 360 min após o treino na tarefa de RO, impede a formação da memória de longa duração.

- O efeito amnésico causado pelo inibidor da NOSn, L-NN, na região CA1 do hipocampo dorsal imediatamente após o treino na tarefa de RO não se deve ao estabelecimento de dependência de estado.

- O efeito amnésico causado pela infusão intra-CA1 de LY-8358 e L-NN é revertido com a co-infusão do análogo não-hidrolisável do GMPc, 8-Br-GMPc, porém não reverte o efeito amnésico ocasionado pela infusão de KT5823.

- O antagonista ß-adrenérgico não-seletivo, timolol, bloqueia a retenção da memória de RO, quando administrado na região CA1 do hipocampo dorsal.

- O efeito amnésico causado pela infusão intra-CA1 de timolol, não é revertido com a co-infusão de SNAP e 8-Br-GMPc, imediatamente pós-treino.

- O efeito amnésico causado pela infusão intra-CA1 de LY-83583, KT-5823, L-NN é revertido com a co-infusão do agonista adrenérgico, noradrenalina, imediatamente pós-treino.

- A infusão do anticorpo Anti-BDNF, imediatamente após o treino na tarefa de RO, impede a formação da memória de longa duração. E BDNF não é capaz de

reverter o efeito amnésico induzido por L-NN ou timolol após o treino na tarefa de reconhecimento de objetos.

- Observa-se um aumento na expressão de BDNF 120 min após o treino na tarefa de RO.

7 REFERÊNCIAS

AHERN, G.P.; KLYACHKO, V.A.; JACKSON, M.B. cGMP and S-nitrosylation: two routes for modulation of neuronal excitability by NO. **Trends in Neurosciences,** 25 (10): 510-7, 2002.

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

ALBRIGHT, T.D.; KANDEL, E.R.; POSNER, M.I. Cognitive neuroscience. **Current Opinion in Neurobiology**, 10 (5): 612-24, 2000.

ARANCIO, 0.; KANDEL, E.R.; HAWKINS, R.D. Activity-dependent long-term enhancement of transmitter release by presynaptic 3 ‘,5 ‘-cyclic GMP in cultured hippocampal neurons. **Nature,** 376 (6535): 74-80, 1995.

ARANCIO, O.; ANTONOVA, I.; GAMBARYAN, S.; LOHMANN, S.M.; WOOD, J.S.; LAWRENCE, D.S.; HAWKINS, R.D. Presynaptic role of cGMP-dependent protein kinase during long-lasting potentiation. **The journal of neuroscience: the official journal of society for neuroscience**, 21 (1): 143-9, 2001.

ARNOLD, W.P.; MITTAL, C.K.; KATSUKI, S.; MURAD, F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** 74 (8): 3203-7, 1977.

BARATTI, C.M.; KOPF, S.R. The post-training memory enhancement induced by physostigmine and oxotremorine in mice is not state-dependent. **Neurobiology of Learning and Memory,** 65 (2): 121-4, 1996.

BEKINSCHTEIN, P.; CAMMAROTA, M.; IGAZ, L.M.; BEVILAQUA, L.R.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. **Neuron,** 53 (2): 261-77, 2007.

BEKINSCHTEIN, P.; CAMMAROTA, M.; KATCHE, C.; SLIPCZUK, L.; ROSSATO, J.I.; GOLDIN, A.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** 105 (7): 2711-6, 2008.

BERLYNE, D.E. Novelty and curiosity as determinants of exploratory behaviour. **British Journal of Psychology,** 41, 68-80, 1950.

BERNABEU, R.; DE STEIN, M. L.; FIN, C.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Role of hippocampal NO in the acquisition and consolidation of inhibitory avoidance learning. **Neuroreport,** 6 (11): 1498-1500, 1995.

BERNABEU, R.; SCHMITZ, P.; FAILLACE, M.P.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Hippocampal cGMP and cAMP are differentially involved in memory processing of inhibitory avoidance learning. **Neuroreport,** 7 (2): 585-8, 1996.

BERNABEU, R.; SCHRODER, N.; QUEVEDO, J.; CAMMAROTA, M.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Further evidence for the involvement of a hippocampal cGMP/cGMP-dependent protein kinase cascade in memory consolidation. **Neuroreport,** 8 (9-10): 2221-4, 1997.

BEVILAQUA, L.R.; ROSSATO, J.I.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Src kinase activity is required for avoidance memory formation and recall. **Behavioural pharmacology**, 14 (8): 649-52, 2003.

BLISS, T.V.P.; COLLINGRIDGE, G.L. A synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. **Nature,** 361 (6407): 31-9, 1993.

BLOKLAND, A.; PRICKAERTS, J.; HONIG, W.; DE VENTE, J. State-dependent impairment in object recognition after hippocampal NOS inhibition. **Neuroreport,** 9 (18): 4205-8, 1998.

BÖHME, G.A.; BON, C.; LEMAIRE, M.; REIBAUD, M.; PIOT, O.; STUTZMANN, J.M.; DOBLE, A.; BLANCHARD, J.C. Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** 90 (19): 9191-4, 1993.

BON, C.L.; GARTHWAITE, J. On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. **The Journal of Neuroscience,** 23 (5): 1941-8, 2003.

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

BOUALLEGUE, A.; DAOU, G.B.; SRIVASTAVA, A.K. Nitric oxide attenuates endothelin-1-induced activation of ERK1/2, PKB, and Pyk2 in vascular smooth muscle cells by a cGMP-dependent pathway. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology,** 293 (4): H2072-9, 2007.

BOULTON, C.L.; IRVING, A.J.; SOUTHAM, E.; POTIER, B.; GARTHWAITE J, COLLINGRIDGE G.L. The nitric oxide–cyclic GMP pathway and synaptic depression in rat hippocampal slices. **The European Journal of Neuroscience**, 6 (10): 1528-35, 1994.

BOULTON, C.L.; SOUTHAM, E.; GARTHWAITE, J. Nitric oxide-dependent long-term potentiation is blocked by a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase. **Neuroscience,** 69 (3): 699-703, 1995.

BREDT, D.S.; SNYDER, S.H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** 86(22):9030-3, 1989.

BREDT, D.S.; SNYDER, S.H. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. **Neuron,** 8 (1): 3-11, 1992.

BUDSON, A.E.; DODSON, C.S.; DAFFNER, K.R.; SCHACTER, D.L. Metacognition and false recognition in Alzheimer's disease: further exploration of the distinctiveness heuristic. **Neuropsychology,** 19 (2): 253-8, 2005.

BUERK, D. G. Nitric oxide regulation of microvascular oxygen**. Antioxidants & Redox Signaling,** 9 (7): 829-43, 2007.

CAMMAROTA, M.; BEVILAQUA, L.R.; KERR, D.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I. Inhibition of mRNA and protein synthesis in the CA1 region of the dorsal hippocampus blocks reinstallment of an extinguished conditioned fear response. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience,** 23 (3): 737-41, 2003.

CANOSSA, M.; GIORDANO, E.; CAPPELLO, S.; GUARNIERI, C.; FERRI, S. Nitric oxide down-regulates brain-derived neurotrophic factor secretion in cultured hippocampal neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** 99 (5): 3282-7, 2002.

CHAPMAN, P.F.; ATKINS, C.M.; ALLEN, M.T.; HALEY, J.E.; STEINMETZ, J.E. Inhibition of nitric oxide synthesis impairs two different forms of learning. **Neuroreport,** 3 (7): 567-70, 1992.

CHEN, M.J.; RUSSO-NEUSTADT, A.A. Nitric oxide signaling participates in norepinephrine-induced activity of neuronal intracellular survival pathways. **Life sciences,** 81 (16): 1280-90, 2007.

CHETKOVICH, D.M.; KLANN, E.; SWEATT, J.D. Nitric oxide synthase-independent long-term potentiation in area CA1 of hippocampus. **Neuroreport,** 4 (7): 919-22, 1993.

CHIEN, W.L.; LIANG, K.C.; TENG, C.M.; KUO, S.C.; LEE, F.Y.; FU, W.M. Enhancement of long-term potentiation by a potent nitric oxide-guanylyl cyclase activator, 3-(5-hydroxymethyl-2-furyl)-1-benzyl-indazole. **Molecular Pharmacology,** 63 (6): 1322-8, 2003.

CHIEN, W.L.; LIANG, K.C.; TENG, C.M.; KUO, S.C.; LEE, F.Y.; FU, W.M. Enhancement of learning behaviour by a potent nitric oxide-guanylate cyclase activator YC-1. **The European Journal of Neuroscience**, 21 (6): 1679-88, 2005.

CLARK, R.E.; ZOLA, S.M.; SQUIRE, L.R. Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. **Journal of Neuroscience,** 20 (23): 8853-60, 2000.

COLEMAN, J.W. Nitric oxide in immunity and inflammation. **International Immunopharmacology,** 1 (8): 1397-406, 2001.

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

DA SILVA, W.C.; BONINI, J.S.; BEVILAQUA, L.R.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Inhibition of mRNA synthesis in the hippocampus impairs consolidation and reconsolidation of spatial memory. **Hippocampus,** 18 (10): 29-39, 2008.

DANIEL, H.; LEVENES, C.; CREPEL, F. Cellular mechanisms of cerebellar LTD. **Trends in Neurosciences,** 21 (9): 401-7, 1998.

DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L.; SNYDER, S. H. A novel neuronal messenger molecule in brain: The free radical, nitric oxide. **Annals of Neurology**, 32 (3): 297-311, 1992.

DOMEK-LOPACINSKA, K.; STROSZNAJDER, J.B. The effect of selective inhibition of cyclic GMP hydrolyzing phosphodiesterases 2 and 5 on learning and memory processes and nitric oxide synthase activity in brain during aging. **Brain Research,** 1216: 68-77, 2008.

DUDAI, Y. Some basic notions and their ontogenisis. **In: The neurobiology of memory: concepts, findings, trends**, 1989.

DUDAS, R.B.; CLAGUE, F.; THOMPSON, S.A.; GRAHAM, K.S.; HODGES, J.R. Episodic and semantic memory in mild cognitive impairment. **Neuropsychology,** 43 (9): 1266-76, 2005.

EAST, S.J.; GARTHWAITE, J. NMDA receptor activation in rat hippocampus induces cyclic GMP formation through the L-arginine-nitric oxide pathway. **Neuroscience Letters,** 123 (1): 17-9, 1991.

EDWARDS, T.M.; RICKARD, N.S. New perspectives on the mechanisms through which nitric oxide may affect learning and memory processes. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews,** 31 (3): 413-25, 2007.

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

FIN, C., DA CUNHA, C., BROMBERG, E., SCHMITZ, P. K., BIANCHIN, M., & MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I. Experiments suggesting a role for nitric oxide in the hippocampus in memory processes. **Neurobiology of Learning and Memory**, 63 (2): 113-5, 1995.

GAGE, A.T.; REYES, M.; STANTON, P.K. Nitric-oxide-guanylyl-cyclase-dependent and -independent components of multiple forms of long-term synaptic depression. **Hippocampus,** 7 (3): 286-95, 1997.

GARTHWAITE, J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. **Trends in Neurosciences**, 14 (2): 60-7; 1991.

GARTHWAITE, J.; CHARLES S.L.; CHESS-WILLIAMS R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. **Nature,** 336 (6197):385-8, 1988.

GARTHWAITE, J.; BOULTON, C.L. Nitric oxide signaling in the central nervous system. **Annual Review of Physiology,** 57: 683–706, 1995.

GEINISMAN, Y. Structural synaptic modifications associated with LTP and behavioral learning. **Cerebral Cortex,** 10 (10): 52-62, 2000.

GERZER, R.; HOFMANN, F.; SCHULTZ, G. Purification of a soluble, sodium-nitroprusside-stimulated guanylate cyclase from bovine lung. **European Journal of Biochemistry,** 116 (3): 479-86, 1981.

GLIEBUS, G.; LIPPA, C.F. The influence of beta-blockers on delayed memory function in people with cognitive impairment**. American Journal of Alzheimer's disease and other dementias,** 22 (1): 57-61, 2007.

HAENISCH, B.; GILSBACH, R.; BÖNISCH, H. Neurotrophin and neuropeptide expression in mouse brain is regulated by knockout of the norepinephrine transporter. **Journal of Neural Transmission**, 15(7):973-82, 2008.

HAGHIKIA, A.; MERGIA, E.; FRIEBE, A.; EYSEL, U.T.; KOESLING, D.; MITTMANN, T. Long-term potentiation in the visual cortex requires both nitric oxide receptor guanylyl cyclases. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience,** 27 (4): 818-23, 2007.

HAGLUND, M.; SJÖBECK, M.; ENGLUND, E. Locus ceruleus degeneration is ubiquitous in Alzheimer's disease: possible implications for diagnosis and treatment. **Neuropathology,** 26 (6): 528-32, 2006.

HALEY, J.E.; WILCOX, G.L.; CHAPMAN, P.F. The role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. **Neuron,** 8 (2): 211-6, 1992.

HANBAUER, I.; WINK, D.; OSAWA, Y.; EDELMAN, G. M.; GALLY, J. A. Role of nitric oxide in NMDA-evoked release of [3H]-dopamine from striatal slices. **Neuroreport,** 3 (5): 409-12, 1992.

HÖLSCHER, C.; CANEVARI, L.; RICHTER-LEVIN, G. Inhibitors of PLA2 and NO synthase cooperate in producing amnesia of a spatial task. **Neuroreport,** 6 (5): 730-2, 1995.

HUANG, A. M.; LEE, E. H. Role of hippocampal nitric oxide in memory retention in rats. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, 50 (3): 327–32, 1995.

HUTTER, P.; JOHANSSON, M.; SARIA, A.; HUMPEL, C. Acute and chronic noradrenergic regulation of neurotrophin messenger RNA expression in rat hippocampus: evidence from lesions and organotypic cultures. **Neuroscience,** 70 (1): 15-29, 1996.

IHALAINEN, J.A.; RIEKKINEN, P. JR.; FEENSTRA, M.G. Comparison of dopamine and noradrenaline release in mouse prefrontal cortex, striatum and hippocampus using microdialysis. **Neuroscience Letters,** 277 (2): 71-4, 1999.

IZQUIERDO, I.; BARROS, D.M.; MELLO E SOUZA, T.; DE SOUZA, M.M.; IZQUIERDO, L.A.; MEDINA, J.H. Mechanisms for memory types differ. **Nature,** 393 (6686): 635-6, 1998a.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. On brain lesions, the milkman and Sigmunda. **Trends in Neuroscience,** 21 (10): 421-4, 1998b.

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

JONES, N.M.; LOIACONO, R.E.; MØLLER, M.; BEART, P.M. Diverse roles for nitric oxide in synaptic signalling after activation of NMDA release-regulating receptors. **Neuropharmacology,** 33 (11): 1351-6, 1994.

JONES, N.M.; LOIACONO, R.E.; BEART, P.M. Roles for nitric oxide as an intra- and interneuronal messenger at NMDA release-regulating receptors: evidence from studies of the NMDA-evoked release of [3H]noradrenaline and D-[3H]aspartate from rat hippocampal slices. **Journal of Neurochemestry,** 64 (5): 2057-63, 1995.

KELLY, A.; LAROCHE, S.; DAVIS, S. Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory. **The Journal of Neuroscience**, 23 (12): 5354-60, 2003.

KERR, D.S.; BEVILAQUA, L.R.; BONINI, J.S.; ROSSATO, J.I.; KOHLER, C.A.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Angiotensin II blocks memory consolidation through an AT2 receptor-dependent mechanism. **Psychopharmacology**, 179 (3): 529-35, 2005.

KHAVANDGAR, S.; HOMAYOUN, H.; ZARRINDAST, M.R. The effect of L-NAME and L-arginine on impairment of memory formation and state-dependent learning induced by morphine in mice. **Psychopharmacology,** 167 (3): 291-6, 2003.

KOBAYASHI, K.; YASOSHIMA, Y. The central noradrenaline system and memory consolidation. **The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry**, 7 (5): 371-6, 2001.

KOYLU, E.O.; KANIT, L.; TASKIRAN, D.; DAGCI, T.; BALKAN, B.; POGUN, S. Effects of nitric oxide synthase inhibition on spatial discrimination learning and central DA2 and mACh receptors. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior,** 81 (1): 32–40, 2005.

LAATU, S.; REVONSUO, A.; JÄYKKÄ, H.; PORTIN, R.; RINNE, J.O. Visual object recognition in early Alzheimer's disease: deficits in semantic processing. **Acta Neurologica Scandinavica,** 108 (2): 82-9, 2003.

LAUTH, D.; HERTTING, G.; JACKISCH, R. Involvement of nitric oxide synthase in 3,4-diaminopyridine-evoked noradrenaline release in rat hippocampus. **European Journal of Pharmacology,** 236 (1): 165-6, 1993.

LEE, A.C.; RAHMAN, S.; HODGES, J.R.; SAHAKIAN, B.J.; GRAHAM, K.S. Associative and recognition memory for novel objects in dementia: implications for diagnosis. **The European Journal of Neuroscience,** 18 (6): 1660-70, 2003.

LEES, G.V.; JONES, E.G. Expressive genes Record memories. **Neurobiology of Disease**, 7 (5): 533-6, 2000.

LEI, S.; JACKSON, M.F.; JIA, Z.; RODER, J.; BAI, D.; ORSER, B.A.; MACDONALD, J.F. Cyclic GMP-dependent feedback inhibition of AMPA receptors is independent of PKG. **Nature Neuroscience,** (6): 559-65, 2000.

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

LONART, G.; WANG, J.; JOHNSON, K.M. Nitric oxide induces neurotransmitter release from hippocampal slices. **European Journal of Pharmacology**, 220 (2-3): 271-2, 1992.

LONART, G.; JOHNSON, K.M. Characterization of nitric oxide generator-induced hippocampal [3H]norepinephrine release. I. The role of glutamate. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics,** 275 (1): 7-13, 1995.

LU, Y.; CHRISTIAN, K.; LU, B. BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? **Neurobiology of Learning and Memory,** 89 (3): 312-23, 2008.

MAJLESSI, N.; KADKHODAEE, M.; PARVIZ, M.; NAGHDI, N. Serotonin depletion in rat hippocampus attenuates L-NAME-induced spatial learning deficits. **Brain Research,** 963 (1-2): 244-51, 2003.

MAKHINSON, M.; OPAZO, P.; CARLISLE, H.J.; GODSIL, B.; GRANT, S.G.; O'DELL, T.J. A novel role for cyclic guanosine 3',5'monophosphate signaling in synaptic plasticity: a selective suppressor of protein kinase A-dependent forms of long-term potentiation. **Neuroscience,** 140 (2): 415-31, 2006.

MANDOLESI, L.; LEGGIO, M.G.; SPIRITO, F.; PETROSINI, L. Cerebellar contribution to spatial event processing: do spatial procedures contribute to formation of spatial declarative knowledge? **The European Journal of Neuroscience,** 18 (9): 2618-26, 2003.

MCGAUGH, J.L. Memory – A century of consolidation. **Science,** 287 (5451): 248-51, 2000.

MIZUTANI, A.; SAITO, H.; ABE, K. Involvement of nitric oxide in long-term potentiation in the dentate gyrus in vivo. **Brain Research,** 605 (2): 309-11, 1993.

MOGENSEN, J.; WÖRTWEIN, G.; HASMAN, A.; NIELSEN, P.; WANG, Q. Functional and neurochemical profile of place learning after L-nitro-arginine in the rat. **Neurobiology of Learning and Memory,** 63 (1): 54-65, 1995.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews,** 43 (2): 109-42, 1991.

MONFORT, P.; MUNOZ, M.D.; KOSENKO, E.; FELIPO, V. Long-term potentiation in hippocampus involves sequential activation of soluble guanylate cyclase, cGMP-dependent protein kinase, and cGMP-degrading phosphodiesterase. **The journal of neuroscience: the official journal of society for neuroscience,** 22 (23): 10116-22, 2002.

MONFORT, P.; MUNOZ, M.D.; KOSENKO, E.; LLANSOLA, M.; SANCHEZ-PEREZ, A.; CAULI,O.; FELIPO, V. Sequential activation of soluble guanylate cyclase, protein kinase G and cGMP-degrading phosphodiesterase is necessary for proper induction of long-term potentiation in CA1 of hippocampus. Alterations in hyperammonemia. **Neurochemistry Internationa**l, 45 (6): 895-901, 2004.

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

MYSKIW, J.C.; ROSSATO, J.I.; BEVILAQUA, L.R.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. On the participation of mTOR in recognition memory**. Neurobiology of Learning and Memory**, 89 (3): 338-51, 2008.

MYSLIVECEK, J.; HASSMANNOVÁ, J.; BARCAL, J.; SAFANDA, J.; ZALUD V. Inhibitory learning and memory in newborn rats influenced by nitric oxide. **Neuroscience,** 71 (2): 299-312, 1996.

NODA, Y.; YAMADA, K.; NABESHIMA, T. Role of nitric oxide in the effect of aging on spatial memory in rats. **Behavioural Brain Research,** 83 (1-2): 153-8, 1997.

O'DELL, T. J.; HAWKINS, R.D.; KANDEL, E.R.; ARANCIO, 0. Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: Evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** 88 (24): 11285-9, 1991.

OHNO, M.; YAMAMOTO, T.; WATANABE, S. Deficits in working memory following inhibition of hippocampal nitric oxide synthesis in the rat. **Brain Research**, 632 (1-2): 36-40, 1993.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. **Academic Press: San Diego**, p.119, 1986.

PITSIKAS, N.; RIGAMONTI, A.E.; CELLA, S.G.; MULLER, E.E. Effects of the nitric oxide donor molsidomine on different memory components as assessed in the object-recognition task in the rat. **Psychopharmacology,** 162 (3): 239-45, 2002.

PITSIKAS, N.; RIGAMONTI, A.E.; CELLA, S.G.; SAKELLARIDIS, N.; MULLER, E.E. The nitric oxide donor molsidomine antagonizes age-related memory deficits in the rat. **Neurobiology of Aging,** 26 (2): 259-64, 2005.

POLLOCK, J. S.; POLLOCK, D. M. Endothelin and NOS1/nitric oxide signaling and regulation of sodium homeostasis. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension,** 17 (1): 70-5, 2008.

PRAST, H.; PHILIPPU, A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. **Progress in Neurobiology,** 64 (1): 51-68, 2001.

PRENDERGAST, M.A.; BUCCAFUSCO, J.J.; TERRY, A.V.JR. Nitric oxide synthase inhibition impairs spatial navigation learning and induces conditioned taste aversion. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior,** 57 (1-2): 347-52, 1997.

PRICKAERTS, J.; STEINBUSCH, H.W.; SMITS, J.F.; DE VENTE, J. Possible role of nitric oxide-cyclic GMP pathway in object recognition memory: effects of 7-nitroindazole and zaprinast. **European Journal of Pharmacology,** 337(2-3):125-36, 1997.

PRIETO-CASTELLÓ, M.J.; HERNÁNDEZ-VIADEL, M.L.; CARDONA, A.; MARHUENDA, D.; FELIPO, V. Activation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide is increased in lymphocytes from both rats chronically exposed to 2,5-hexanedione and workers chronically exposed to n-hexane. **Toxicology,** 229 (1-2): 73-8, 2007.

REED, J.M.; SQUIRE, L.R.; PATALANO, A.L.; SMITH, E.E.; JONIDES, J. Learning about categories that are defined by object-like stimuli despite impaired declarative memory. **Behavioural Neuroscience**, 113 (3): 411-19, 1999.

RICKARD, N.S.; NG K.T.; GIBBS, M.E. Further support for nitric oxide-dependent memory processing in the day-old chick. **Neurobiology of Learning and Memory,** 69 (1): 79-86, 1998.

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

ROOZENDAAL, B.; CASTELLO, N.A.; VEDANA, G.; BARSEGYAN, A.; MCGAUGH, J.L. Noradrenergic activation of the basolateral amygdala modulates consolidation of object recognition memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, 90 (3): 576-9, 2008.

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

ROSSATO, J.I.; BEVILAQUA, R.M.; MYSKIW, J.C.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, 14 (1): 36-46, 2007.

RUSAKOV, D.A.; DAVIES, H.A.; HARRISON, E.; DIANA, G.; RICHTER-LEVIN, G.; BLISS, T.V.P.; STEWART, M.G. Ultrastructural synaptic correlates of spatial learning in rat hippocampus. **Neuroscience***,* 80 (1): 69-77, 1997.

SATOH, S.; KIMURA, T.; TODA, M.; MIYAZAKI, H.; ONO, S.; NARITA, H.; MURAYAMA, T.; NOMURA, Y. NO donors stimulate noradrenaline release from rat hippocampus in a calmodulin-dependent manner in the presence of L-cysteine. **Journal of Cellular Physiology**, 169 (1): 87-96, 1996.

SATOH, S.; KIMURA, T.; TODA, M.; MAEKAWA, M.; ONO, S.; NARITA, H.; MIYAZAKI, H.; MURAYAMA, T.; NOMURA, Y. Involvement of L-type-like amino acid transporters in S-nitrosocysteine-stimulated noradrenaline release in the rat hippocampus. **Journal of Neurochemistry,** 69 (5): 2197-205, 1997.

SCHUMAN, E.M.; MADISON, D.V. A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. **Science,** 254(5037):1503-6, 1991.

SHARMA, J. N.; AL-OMRAN, A.; PARVATHY, S. S. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. **Inflammopharmacology,** 15 (6): 252-9, 2007.

SHIN, J.H.; LINDEN, D.J. An NMDA receptor/nitric oxide cascade is involved in cerebellar LTD but is not localized to the parallel fiber terminal. **Journal of Neurophysiology,** 94 (6): 4281-9, 2005.

SON, H.; HAWKINS, R. D.; MARTIN, K.; KIEBLER, M.; HUANG, P. L.; FISHMAN, M. C.; KANDEL, E. R. Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase. **Cell,** 87 (6): 1015-23, 1996.

SPOLIDÓRIO, P.C.; ECHEVERRY, M.B.; IYOMASA, M.; GUIMARÃES, F.S.; DEL BEL, E.A. Anxiolytic effects induced by inhibition of the nitric oxide-cGMP pathway in the rat dorsal hippocampus. **Psychopharmacology,** 195 (2): 183-92, 2007.

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

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

STANTON, P.K.; WINTERER, J.; BAILEY, C.P.; KYROZIS, A.; RAGINOV, I.; LAUBE, G.; VEH, R.W.; NGUYEN, C.Q.; MÜLLER, W. Long-term depression of presynaptic release from the readily releasable vesicle pool induced by NMDA receptor-dependent retrograde nitric oxide. **The Journal of Neuroscience,** 23 (13): 5936-44, 2003.

STOUT, A.K.; WOODWARD, J.J. Mechanism for nitric oxide's enhancement of NMDA-stimulated [3H]norepinephrine release from rat hippocampal slices. **Neuropharmacology**, 34 (7): 723-9, 1995.

SZÖKÕ, E.; HABERLE, D.; HALÁSZ, A.S.; TEKES, K.; MAGYAR, K. Protective effect of 7-nitroindazole against DSP-4 induced noradrenaline depletion in mouse hippocampus. **Journal of Neural Transmission**, 108 (4): 407-13, 2001.

TELEGDY, G.; KOKAVSZKY, R. The role of nitric oxide in passive avoidance learning. **Neuropharmacology,** 36 (11-12): 1583-7, 1997.

WAN, H.; AGGLETON, J.P.; BROWN, M.W. Different contributions of the hippocampus and perirhinal cortex to recognition memory. **The Journal of Neuroscience,** 19 (3):1142-1148, 1999.

WANG, Z.; PAN, Y.; LI, W.; JIANG, H.; CHATZIMANOLIS, L.; CHANG, J.; GONG, Z.; LIU, L. Visual pattern memory requires foraging function in the central complex of Drosophila. **Learning & memory,** 15 (3): 133-42, 2008.

WEINSHENKER, D. Functional consequences of locus coeruleus degeneration in Alzheimer's disease. **Current Alzheimer Research,** 5 (3): 342-5, 2008.

WOOLF, N.J. A structural basis for memory storage in mammals. **Progress in Neurobiology,** 55 (1): 59-77, 1998.

XU, X.; SCOTT-SCHEIERN, T.; KEMPKER, L.; SIMONS, K. Active avoidance conditioning in zebrafish (Danio rerio). **Neurobiology of Learning and Memory,** 87 (1): 72-7, 2007.

YAMADA, K.; NODA, Y.; NAKAYAMA, S.; KOMORI, Y.; SUGIHARA, H.; HASEGAWA, T.; NABESHIMA, T. Role of nitric oxide in learning and memory and in monoamine metabolism in the rat brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** 115 (5): 852-8, 1995.

ZARRINDAST, M.R.; SHENDY, M.M.; AHMADI, S. Nitric oxide modulates state dependency induced by lithium in an inhibitory avoidance task in mice. **Behavioural Pharmacology**, 18 (4): 289-95, 2007.

ZHANG, X.C.; ZHANG Y.Q.; ZHAO, Z.Q. Different roles of two nitric oxide activated pathways in spinal long-term potentiation of C-fiber-evoked field potentials. **Neuropharmacology,** 50 (6): 748–54, 2006.

ZHUO, M.; HU, Y.; SCHULTZ, C.; KANDEL, E.; HAWKINS, R.D. Role of guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase in long-term potentiation. **Nature,** 368 (6472): 635-9, 1994a.

ZHUO, M.; KANDEL, E.R.; HAWKINS, R.D. Nitric oxide and cGMP can produce either synaptic depression or potentiation depending on the frequency of presynaptic stimulation in the hippocampus. **Neuroreport,** 5 (9): 1033-6, 1994b.

ZORUMSKI, C.F.; IZUMI, Y. Nitric oxide and hippocampal synaptic plasticity. **Biochemical Pharmacology**, 46 (5): 777-85, 1993.

ZOU, L.B.; YAMADA, K.; TANAKA, T.; KAMEYAMA, T.; NABESHIMA, T. Nitric oxide synthase inhibitors impair reference memory formation in a radial arm maze task in rats. **Neuropharmacology,** 37 (3): 323-30, 1998.

This document was created with Win2PDF available at http://www.win2pdf.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

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