

Vinícius Araújo Magalhães

Memória tipo Episódica em  
Camundongos deficientes do  
Transportador Vesicular de  
Acetilcolina (VAChT)

Belo Horizonte

Dezembro

2007

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Vinícius Araújo Magalhães

# Memória tipo Episódica em Camundongos deficientes do Transportador Vesicular de Acetilcolina (VACht)

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em  
Farmacologia Bioquímica e Molecular do Departamento  
de Farmacologia da Universidade Federal de Minas  
Gerais como requisito parcial para obtenção do grau  
Mestre em Ciências Biológicas: Farmacologia  
Bioquímica e Molecular

Orientador: *Marco Antônio Máximo Prado*

Co-orientadora: *Grace Schenatto Pereira*

Belo Horizonte

Dezembro

2007

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Neurofarmacologia do Departamento de Farmacologia e no Núcleo de Neurociências (NNC) do Departamento de Fisiologia e Biofísica, ambos do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, com auxílio das seguintes instituições:

- Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- American Health Assistance Foundation
- Pronex-MG
- NIH-Forgaty

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus.

Agradeço a meus pais e irmãos pela força e apoio diários, dedicação, empenho, paciência e principalmente pela união.

À minha namorada tão querida, Fabiana, obrigado pelo apoio, compreensão, auxílio e o amor.

Aos professores e orientadores Marco Antônio e Grace pela disponibilidade, dedicação, confiança e exemplo.

Aos professores Vânia Prado, Marcus Vinícius e Márcio Flávio pelos ensinamentos, auxílio e exemplo.

Aos professores do departamento de Fisiologia da PUC Ana Cristina, Raul, Leonor, Emerenciana e Wagner pelo incentivo e apoio.

Aos amigos Célio de Castro e Bráulio pelo companheirismo e auxílio fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos amigos e companheiros de laboratório Xavier, Nancy, Alessandra, Jomara, Fabiana, Bruno Resende, Adriane, Danuza, Diogo, Luciene, Cristina, Cristiane, Patrícia, Daniela, Monalise, Bento Jones, pelo companheirismo, empenho, e apoio científico.

A todos os amigos do laboratório de Neurofarmacologia e Neurociências.

Aos amigos e padrinhos André, Érica, Thiago Falci, Wender e Sandra que sempre me incentivaram e me acompanharam.

Ao Filipe e Penélope pelo companheirismo e auxílio.

A Dona Geralda, Sr. Brandão e toda a sua família pelo apoio.

A toda minha família e amigos de Mutum, vocês são muito importantes para mim.

# ÍNDICE

<b>1- INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1- MEMÓRIA .....	2
1.1.1- Aspectos gerais.....	2
1.1.2- Classificação das Memórias.....	4
1.1.2.3- Memória de longa duração .....	5
1.1.2.4.- Memória declarativa .....	8
1.1.3- Reconhecimento de objeto .....	9
1.2- SISTEMA COLINÉRGICO.....	9
1.2.1- Aspectos Gerais .....	9
1.2.2- Neurotransmissão colinérgica.....	10
1.2.3.- Acetilcolinesterase (AChE) e seus inibidores (anti-AChE) .....	12
1.2.3- Transmissão colinérgica e memória.....	14
1.3- MODELO ANIMAL DE HIPOFUNÇÃO COLINÉRGICA.....	17
<b>2- OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
2.1- OBJETIVO GERAL .....	19
2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
<b>3- METODOLOGIA .....</b>	<b>20</b>
3.1- METODOLOGIA.....	21
3.1.1- Protocolo de reconhecimento de objeto .....	21
3.1.2- Protocolo de preferência pelo objeto novo – componente novidade .....	22
3.1.3- Protocolo de localização espacial do objeto – componente espacial.....	22
3.1.4- Protocolo de ordem temporal de objetos – componente temporal .....	22
3.1.5- Intervenção farmacológica.....	22
3.1.6- Campo aberto (open field).....	23
3.2- Análise estatística.....	24
<b>4- RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
4-1 RESULTADOS .....	26

4.1.1- Protocolo de identificação temporal dos objetos – componente temporal.....	26
4.1.2- Protocolo de reconhecimento de um novo objeto.....	33
4.1.3- Protocolo de localização espacial do objeto – componente espacial.....	35
4.1.4- Campo aberto.....	36
<b>5- DISCUSSÃO.....</b>	<b>37</b>
5.1- DISCUSSÃO.....	38
<b>6- CONCLUSÃO.....</b>	<b>44</b>
6.1- CONCLUSÃO.....	45
<b>7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>46</b>
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
<b>8- ANEXO.....</b>	<b>59</b>

## **1- INTRODUÇÃO**



## **1.1- Memória**

### **1.1.1- Aspectos gerais**

As neurociências buscam elucidar diversos aspectos do funcionamento cerebral, sendo um deles a memória. Desde que o homem atribuiu ao sistema nervoso central (SNC) a capacidade de regulação e manutenção da memória, até os dias atuais, muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de investigar a fisiologia da cognição.

William James (1890) foi um dos pioneiros nestes estudos, classificando memórias quanto ao tempo de retenção em memórias de curta e de longa duração. Donald Hebb, em 1949, já com uma abordagem neurobiológica, propôs uma das mais importantes hipóteses para explicar como informações são armazenadas no cérebro. Ele propôs que os neurônios deveriam ser modificados pela experiência, o que causaria alterações no comportamento. Assim, se uma sinapse fosse ativada repetidamente ao mesmo tempo em que o neurônio pré e pós-sináptico disparassem potenciais de ação, mudanças estruturais e bioquímicas ocorreriam nas sinapses (revisado por Carlson 2002). Estas mudanças poderiam resultar no fortalecimento sináptico, porém na época não foi possível confirmar esta hipótese por métodos experimentais.

A memória é representada por um número de sistemas neuronais distintos que podem interagir entre si, o que torna possível a utilização do conhecimento adquirido e retido após um evento específico (revisado por Schacter 1994). Assim, podemos distinguir diferentes etapas durante o processamento da memória. A aquisição ou aprendizagem consiste na obtenção de uma informação ou evento pelos sistemas neurais ligados à memória. Por evento entendemos qualquer fato memorável: um objeto, um som, um acontecimento, um pensamento, uma emoção, uma seqüência de movimentos. Durante a aquisição ocorre uma seleção: como os eventos são geralmente múltiplos e complexos, os sistemas de memória só permitem a aquisição de alguns aspectos mais relevantes para a cognição. Guia-se para traços emocionalmente mais marcantes, mais focalizadas pela nossa atenção, mais fortes sensorialmente, ou simplesmente priorizados por critérios desconhecidos. Neurotransmissores, tais como a acetilcolina (ACh), podem exercer ação modulatória nos mecanismos atencionais. Assim, pelo seu papel fisiológico, a redução de

ACh em seus terminais pode gerar um déficit atencional, como demonstrado em pacientes com neurodegeneração colinérgica por doença de Alzheimer (DA) (revisado por Humby e cols., 1999).

A consolidação, ou seja, o armazenamento (retenção) de uma informação adquirida (aprendida) é o processo que estabiliza as memórias (Muller e Pilzecker, 1900- revisado por McGaugh, 2000). Sabe-se que inicialmente esta consolidação é vulnerável, mas que ao longo do tempo, ela se torna resistente e que este fortalecimento do traço mnemônico ocorre em nível celular e molecular (McGaugh, 2000; Dudai, 2006). A codificação e conseqüente evocação da memória em humanos tem sido associada a estruturas como o córtex pré-frontal e o hipocampo (revisado por Buckner, 1996). Durante a retenção da memória, os aspectos selecionados de cada evento ficam de algum modo disponíveis para serem lembrados. Com o passar do tempo, alguns desses aspectos ou mesmo todos eles podem desaparecer ou permanecer na memória.

À última etapa dá-se o nome de evocação ou lembrança. Embora algumas evocações de memória ocorram de forma espontânea, como resultados de flutuações nos modelos de atividade neural, a evocação usualmente ocorre como resultado da integração entre a chegada da informação do meio ambiente com a rede de memórias já existente. A evocação da memória leva à formação de novas memórias combinadas com as memórias anteriores (Izquierdo e McGaugh, 2000; Izquierdo e Medina, 1997).

Como resultado das ações conjuntas destas três etapas (aquisição, consolidação e evocação) ocorre aprendizagem e formação de um novo comportamento ou modificação de um pré-existente. Segundo Carlson (2002 - revisão), algumas alterações nos circuitos neurais promovem diferenciações bioquímicas e estruturais nas sinapses. Desta forma, a memória pode promover mudanças na execução de comportamentos, nas formas de planejamento e percepção de um indivíduo, favorecendo-o a se ajustar a um ambiente que muda constantemente.

### 1.1.2- Classificação das Memórias

As memórias podem ser classificadas de acordo com seu conteúdo e sua duração (Tulving 1982; Izquierdo 1999). Quanto ao seu conteúdo, podemos classificá-las como não-declarativa (procedural) ou declarativa. A memória procedural associa-se ao aprendizado de habilidades motoras e sensoriais, além dos hábitos e condicionamentos a respostas emocionais. Ela pode ser adquirida de forma imperceptível e, nesta, o aprendizado é lento e gradual, porém, pode durar por toda a vida (revisado por Bear e cols., 2002; Izquierdo 2002). Já a memória declarativa é genuinamente humana desde que somos capazes de declarar, ou seja, verbalizar o que aprendemos assim como o período e o local onde determinado aprendizado ocorreu. Este tipo de memória, ao contrário da memória não-declarativa, é de aprendizagem mais rápida, porém é muito mais instável e sujeita a interferências na manutenção da informação (revisado por Izquierdo, 2002).

Quanto ao tempo de duração, as memórias podem ser classificadas como memória de trabalho, de curta duração ou de longa duração (revisado por McGaugh, 2000; Izquierdo, 2002) (ver figura 1).

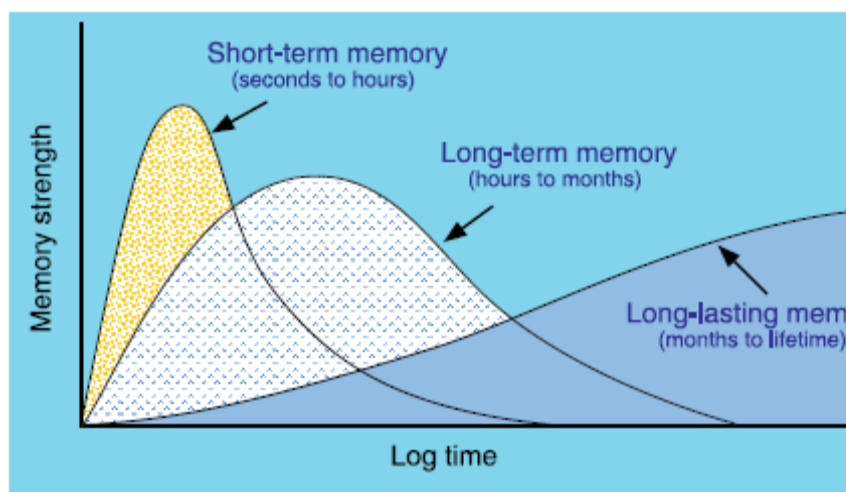


Figura 1- *Classificação das memórias quanto ao tempo de duração - Estudos de Muller e Pilzecker hipotizando a dependência temporal da consolidação das memórias. Ilustra também os dados de Izquierdo e cols. (1998 e 1999) mostrando que os mecanismos de armazenamento são, tanto em LTM quanto STM, paralelos e independentes. Retirado de McGaugh (2000).*

### **1.1.2.1.- Memória de trabalho**

A memória de trabalho (MT) tem como principal característica a capacidade de associar nova informação a uma já existente processando-as comparativamente (Goldman-Rakic 1991; revisado por Baddley, 1996). Devido à sua forma e tempo de atuação – segundos, no máximo minutos – ela é considerada um tipo de memória imediata (Barros e cols., 2001; Izquierdo e cols., 1998). Assim, atua com mínimas conseqüências bioquímicas decorrentes da atividade elétrica neuronal momentânea. Grande parte das informações nela contidas se perde por completo. A MT é uma das principais responsáveis pela definição e determinação do tipo e da quantidade de informação que será mantida em curto prazo e consolidada no sistema de longa duração (Izquierdo 2002).

### **1.1.2.2.- Memória de curta duração**

Nos primeiros minutos após a aquisição de um aprendizado, o traço mnemônico mantém-se instável por algumas horas. Quando testado em animais, este tempo pode variar de acordo com o paradigma comportamental utilizado. Esse tipo de memória susceptível é denominado memória de curta duração ou STM (do inglês, short-term memory) (McGaugh, 1966; revisado por Izquierdo e cols., 1999; revisado por McGaugh 2000). Isto se deve provavelmente ao fato de que, nesta fase, não ocorre expressão gênica nem síntese protéica, tornando essa memória susceptível à ação de muitas variáveis (Izquierdo 1998, 1999; Viana e cols., 1999). O álcool, por exemplo, quando administrado em pequenas doses, tem efeito agudo duplo, pode estimular a formação de STM em tarefa de condicionamento associativo e contextual, porém, em grande quantidade a inibe (Gulick e Gould, 2007). Basicamente a função da STM é a de manter as informações disponíveis até que estas se consolidem. Para isso, recruta principalmente a região CA1 do hipocampo e suas projeções para o córtex entorrinal (Izquierdo, 2002; Izquierdo e cols., 1998; Medina e cols., 1999).

### **1.1.2.3- Memória de longa duração**

O processo de estabilização e retenção de uma informação é descrito como o processo de consolidação. A estabilização de uma informação é importante para que a aprendizagem se torne eficaz, e a memória de longa duração (LTM, do inglês long-term

memory) tem como propriedade fundamental a manutenção da informação estável. Para isso, utiliza-se de síntese protéica, o que permite o armazenamento da informação por períodos mais prolongados em comparação à STM. Assim, apesar de compartilhar as mesmas estruturas neurais e possuir basicamente o mesmo conteúdo de informação que STM, a LTM possui mecanismos bioquímicos completamente distintos (Izquierdo, 2002; McGaugh 2000). Além disso, tanto STM quanto LTM ocorrem independentemente e de forma paralela (Izquierdo e cols., 1998; Izquierdo e cols., 1999).

Durante os últimos 40 anos, inúmeros pesquisadores têm se dedicado a descrever os mecanismos bioquímicos que contribuem para a estabilização de um traço lábil. Dentre os eventos neuronais, os que parecem ser universalmente requeridos para a LTM são a transcrição e tradução, além da fosforilação da proteína ligante de elemento responsivo ao AMPc (CREB). Além disso, a consolidação de uma nova informação no hipocampo é muito sensível a vias dopaminérgicas, noradrenérgicas e serotoninérgicas. Isto demonstra que as memórias emocionalmente ricas, portanto moduladas por estes sistemas de neurotransmissão, podem ser mais bem consolidadas (Izquierdo e cols., 2006).

A teoria da consolidação propõe que as memórias, uma vez consolidadas, são permanentes e imodificáveis (revisado por McGaugh, 2000). No entanto, dados da literatura têm mostrado que a reativação de uma memória consolidada proporciona novamente um estado lábil e dependente de síntese protéica (Nader e cols., 2000; Dudai, 2006). Além disso, outros dados indicam que a evocação ou lembrança de uma memória pode induzir uma fase lábil adicional que requer um processo ativo que estabiliza memórias após a evocação. Logo, a reativação de uma memória induz um segundo processo de consolidação denominado reconsolidação (Nader e cols., 2000; Sara, 2000; Dudai, 2006).

A reconsolidação é um processo complexo e para demonstrá-lo experimentalmente ou identificar a participação de uma molécula em particular, uma memória precisa, primeiramente, ser consolidada, e, posteriormente, reativada (evocada). E em um último estágio, a modificação de uma memória precisa ser observada (Tronson e Taylor, 2007). Quando repetidamente evocamos uma informação consolidada, ela, novamente e temporariamente, torna-se lábil e sujeita a alterações. Consequentemente, a reconsolidação pode requerer novamente um novo processo de estabilização para se tornar disponível a

uma nova evocação (revisado por Durvaci e Nader, 2004). Assim, no processo de reconsolidação, pode haver perda e conseqüente substituição de uma informação original, podendo formar memórias remotas que durem por toda a vida (revisado por McGaugh, 2000; Izquierdo, 2002).

O conteúdo final, apesar de diferir-se do original, possui novas informações da reconsolidação, o que pode ser responsável por refinar o conhecimento específico de uma dada informação retida. E, apesar de existir uma conseqüente diminuição na quantidade de neurônios no SNC ao longo da vida do ser humano, ocorre um aumento no número de informações por este retidas. Este processo é devido a um refinamento neuronal na reconsolidação e ocorre para que informações importantes retidas ao se atualizarem, se estabeleçam. Este refinamento do circuito neural ocorre através de um processo denominado *competição neuronal* que participa da codificação das memórias no adulto. Jin-Hee Han e colaboradores (2007) demonstraram que neurônios *in vitro* expressando constitutivamente CREB ativado, apresentaram maior facilidade para formação de potenciação de longa duração (LTP). Além disso, estes neurônios também mostraram elevado número de sinapses silenciosas em relação às células controle, mostrando que pode haver um direcionamento sináptico sobre uma determinada via. Esta competição entre neurônios no cérebro adulto associada à CREB mostra que apenas neurônios elegíveis participam em uma dada memória (Wilson e McNaughton, 1993; Guzowski e cols., 1999; Repa e cols., 2001; Rumpel e cols., 2005).

Na busca de bases bioquímicas para a consolidação das memórias, muitas hipóteses foram geradas e algumas comprovadas. Em 1973, Bliss e colaboradores mostraram que, em terminais glutamatérgicos, uma coincidência da atividade de elementos pré e pós sinápticos, causada por uma estimulação elétrica de alta frequência, causava uma facilitação na transmissão química. Essa facilitação *in vitro* durava horas e, *in vivo*, meses. Esse fenômeno foi denominado como potenciação de longa duração (LTP). A partir deste fato, alguns estudos sugerem que a LTP seja um dos principais substratos neurais para a consolidação da memória (Izquierdo e McGaugh, 2000, Izquierdo e Medina, 1997; Izquierdo e cols. 2006). O conhecimento detalhado da plasticidade neuronal, principalmente da LTP no hipocampo, proporcionou modelos úteis para abordar os mecanismos de formação de memórias declarativas. Na região CA1 do hipocampo, as

cascatas moleculares envolvidas na formação de memórias simples e de aquisição rápida, como a esquia inibitória, são semelhantes àquelas ativadas pela LTP (Izquierdo e Medina, 1997, revisado por Izquierdo e cols., 2006; Whitlock e cols., 2006; Pastalkova e cols., 2006). Assim, LTP é considerada como um tipo de plasticidade sináptica que pode estar associada ao armazenamento de memórias no cérebro. Bliss (2006) revisa estudos que associam LTP no hipocampo como substrato necessário para a formação da memória episódica pelo aprendizado espacial tanto em camundongos quanto em humanos.

#### **1.1.2.4.- Memória declarativa**

A memória declarativa pode ser associada ao armazenamento de fatos ou de eventos ocorridos, sendo o conceito mais próximo de memória que usamos no dia a dia. Um dos principais componentes da memória declarativa é a memória de eventos, denominada *episódica*. Esta foi descrita por Tulving em 1972, que a considerou o componente que diferencia o *lembrar* do *conhecer* (revisado por Clayton e cols., 2007). A Memória episódica é tida como um dos principais sistemas de memórias neurocognitivas, pois provê informações sobre *o que e quando* ocorreu um evento específico ou ainda mais sobre *onde* ele aconteceu.

A memória episódica já foi descrita como um tipo de memória estritamente humana (revisado por Tulving e Markowitsch, 1998; Conway e cols., 1995; Suddendorf e Corballis, 1997;). Entretanto, Suddendorf e Corballis (1997) sugeriram que este tipo específico de memória poderia ser descrito também em primatas não humanos, porém, sem resultados confirmatórios. Somente Clayton (1998) descreveu evidências claras nas quais os animais possuíam características deste tipo específico de memória humana, porém a descreveu como uma *memória semelhante à episódica* (episodic-like memory). Embora o estudo morfológico possa diferenciar cérebros humanos de animais, o estudo cognitivo comparativo perfeito não é possível. Assim, a memória declarativa em animais é considerada memória “semelhante” à episódica por não existirem formas de identificar se esta lembrança é, conscientemente, acompanhada de recordação (revisado por Clayton e cols., 2007; Griffiths e cols., 1999; Clayton e cols., 1998).

### **1.1.3- Reconhecimento de objeto**

Uma das formas de se investigar o processamento de uma informação do tipo episódica em animais é através da tarefa de reconhecimento de objeto. Em roedores, esta tarefa foi descrita por Ennaceur e Delacour (1988) como um teste de memória baseado na exploração diferencial de um objeto familiar e outro não familiar. Assim possui uma característica interessante, pois, baseia-se em um comportamento espontâneo. Desta forma é livre de componentes como repetições condicionais de reforço e associação de estímulos-resposta. Pode também ser considerado como um teste sem uso de memória de trabalho, já que é livre de componentes de memória com referenciais prévios (Ennaceur e Delacour 1988, revisado por Dere e cols., 2007).

O estímulo de reconhecimento é uma forma básica de memória que depende da interação entre os sistemas corticais e o límbico, que processam os estímulos de forma qualitativa (Murray, 1984; Mishkin, 1990; Otto 1992; Suzuki e cols., 1993). Vários autores têm se dedicado a caracterizar os substratos neurais recrutados no reconhecimento de objeto em ratos e camundongos. Para isso, utilizam intervenções farmacológicas sistêmicas ou intra-cerebrais (Ennaucer e Delacour, 1987; Ennaucer e cols., 1989; Ennaucer 1991; Mickley e cols., 1984; Scali e cols., 1994; Cobb e cols., 1995, Giovannelli e cols., 1995; Ennaceur, 1997; Izquierdo 2002). Diferentes sistemas de neurotransmissão parecem modular o paradigma do reconhecimento de objetos, entre eles destacaremos o sistema colinérgico (Bussey e cols., 2005; Wolf, 1996; Wang e cols., 2007).

## **1.2- Sistema colinérgico**

### **1.2.1- Aspectos Gerais**

A Acetilcolina (ACh) foi primeiramente isolada por O. Loewi e colaboradores. Seu grupo demonstrou que a ACh é uma substância liberada quando o nervo vago é estimulado, causando a diminuição dos batimentos cardíacos. Estudos também de Dale e colaboradores, iniciados em 1914, detectaram dois tipos de ação da ACh, uma nicotínica e outra muscarínica. Dale e colaboradores determinaram, em uma série de experimentos de 1929 a 1936, que o mecanismo químico da transmissão diz respeito não apenas aos efeitos dos



nervos autonômicos, mas também com a totalidade das atividades eferentes do sistema nervoso periférico (revisado por Brown, 2006).

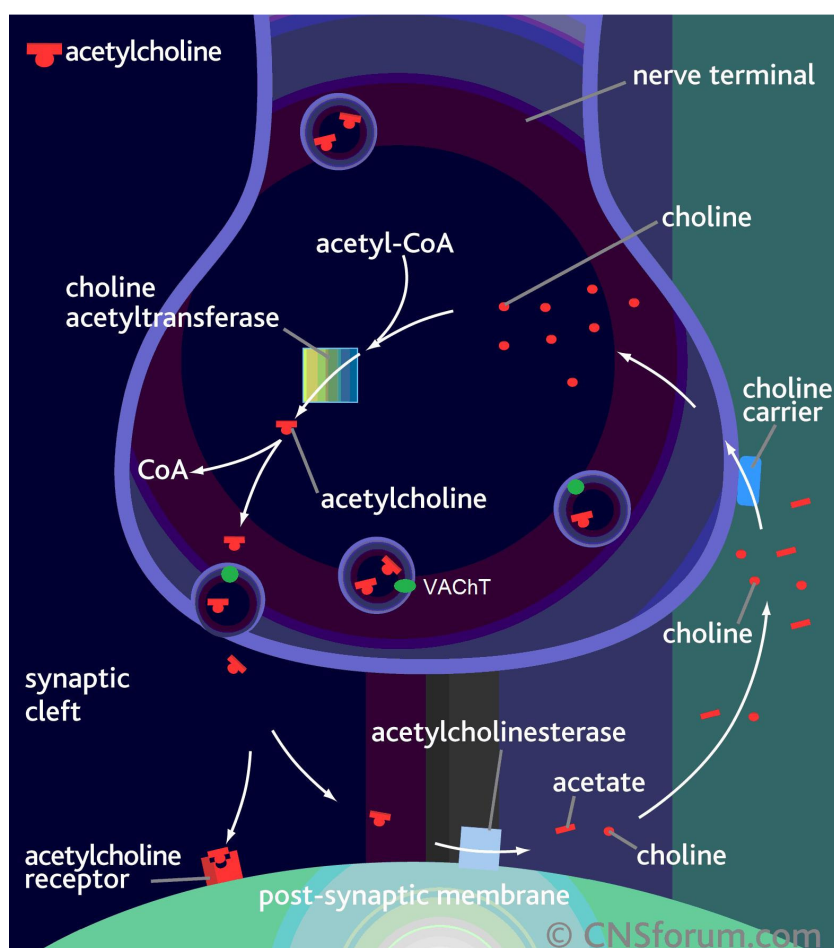
### **1.2.2- Neurotransmissão colinérgica**

O processo de transmissão sináptica clássica, independente do tipo de neurotransmissor, obedece às seguintes etapas: (1) síntese no terminal pré-sináptico, (2) armazenamento em vesículas sinápticas, (3) liberação na fenda sináptica, (4) interação com receptores pós-sinápticos e (5) inativação por hidrólise ou recaptção. Cada uma destas etapas pode sofrer interferência de fármacos distintos, que podem potencializar ou inibir a transmissão sináptica (Cooper e cols., 1996 ; revisado Valtorta e cols., 1990).

A ACh, como um neurotransmissor clássico, segue estas etapas (ver figura 2). A manutenção do tônus colinérgico no terminal sináptico está associada à sua eficaz síntese e liberação (Ribeiro e cols., 2006). Sua síntese ocorre em um único passo e a enzima responsável é a Colina Acetil Transferase (ChAT). A ChAT catalisa a reação entre a molécula de acetato, proveniente da Acetil-CoA, e colina. Os níveis de acetato são mantidos a partir do metabolismo da glicose, que é sustentada pela ação da enzima ATP-citrato liase no metabolismo basal (Beigneux e cols., 2004). A colina é proveniente da quebra enzimática da ACh em acetato e colina. Devido à incapacidade neuronal em sintetizar colina (Fernstrom 1981), a manutenção fisiológica de seus níveis está vinculada à ingestão dietética. E, na manutenção dos níveis de colina intracelulares, a captação da colina extracelular é realizada por um transportador de colina de alta afinidade sódio-dependente (CHT1) (Okuda e cols., 2000). O CHT1 pode sofrer endocitose, conseqüentemente, sua localização na membrana plasmática é transiente. Assim, a internalização do transportador pode ser associada como um fator de regulação da síntese de ACh por regular a função do transportador (Ribeiro e cols., 2005). Especificamente, a captação de colina por CHT1 se torna um fator limitante na síntese de ACh, associada a uma maior recaptção da colina, já que a ChAT não é fator limitante, se encontrado em excesso cinético (Haga, 1971; Yakamura e Snyder, 1972; Kuhar e Murrin; 1978).

O transporte da molécula de ACh para o interior de vesículas sinápticas é feito pelo transportador vesicular de acetilcolina (VAcHT), uma proteína com 12 domínios

transmembrana. O VACHT transporta a acetilcolina para o interior da vesícula através de um gradiente eletroquímico gerado por uma bomba de próton-ATPase vacuolar que bombeia prótons  $H^+$  para dentro das vesículas (Parsons, 2000; Prado e cols., 2002). A troca de dois íons  $H^+$  intravesiculares por uma molécula de ACh citosólica pelo VACHT, preenche as vesículas com o neurotransmissor (Nguyen e cols., 1998; Prado e cols., 2002). Assim, VACHT exerce um papel importante no preenchimento colinérgico vesicular do terminal pré-sináptico para eficiente exocitose da ACh. Após exocitose cálcio dependente, a ACh interage com seus receptores pós-sinápticos e também é degradada pela acetilcolinesterase (AChE) em acetato e colina, como mostra a figura 2 (Valtorta e cols., 1990).



**Figura 2- Neurotransmissão colinérgica.** Biosíntese, estocagem, liberação, degradação e recaptação da ACh (fonte: [www.cnsforum.com](http://www.cnsforum.com)).

A acetilcolina é o principal neurotransmissor secretado por axônios eferentes do SNC. A neurotransmissão colinérgica atua em todas as sinapses pré-ganglionares do sistema nervoso autônomo (SNA), nos neurônios pós-ganglionares do SNA parassimpático e nas junções neuromusculares (Hoffman e Taylor, 2001; Birks, 1961; Misgeld e cols., 2002). Sendo a ACh de importância fisiológica clara, não seria surpreendente que alterações na transmissão colinérgica interferissem na homeostase de um organismo e até mesmo promovessem situações fisiopatológicas. A presença de agonistas ou antagonistas de receptores colinérgicos podem tanto prejudicar quanto melhorar o desempenho de animais em tarefas de memória (Boess e cols., 2007; Wang e cols., 2007). Além dos receptores colinérgicos, uma proteína componente do sistema colinérgico que também é um potencial alvo farmacológico é a AChE.

### **1.2.3 - Acetilcolinesterase (AChE) e seus inibidores (anti-AChE)**

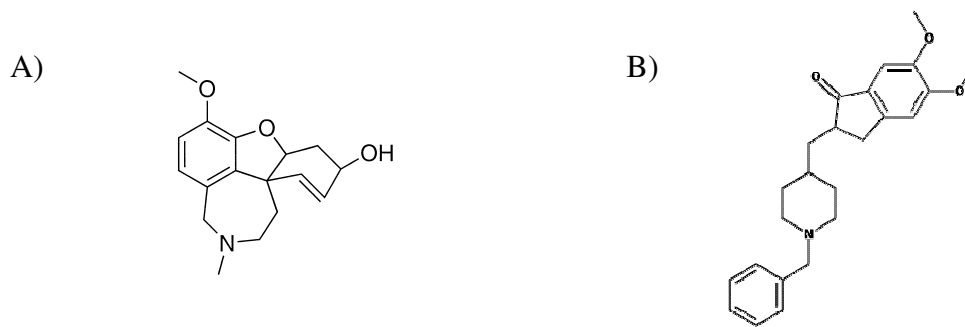
Sabe-se que a função das moléculas de AChE nas sinapses e junções neuromusculares é, por meio de hidrólise, degradar a ACh em acetato e colina, finalizando a ação do neurotransmissor. Fármacos que inibem a ação da AChE são denominados anticolinesterásicos (anti- AChE) e podem ser classificados como reversíveis ou irreversíveis. Dentre os mecanismos de ação utilizados, podem: alterar quantitativamente a taxa de deacilação da enzima, interferir no sítio de ligação da ACh ou modificar a conformação da enzima AChE propriamente dita. Além disso, algumas anti-AChE agem como substrato e são hidrolisadas no lugar da ACh (Hoffman e cols., 2000). Independente de sua ação, os anti-AChE têm sido utilizados no tratamento de diferentes doenças, dentre elas a doença de Alzheimer (DA).

O déficit de aprendizado e cognição normalmente observado em pacientes idosos com doença de Alzheimer é associado à degeneração colinérgica inicialmente no prosencéfalo basal (Bartus e cols., 1982; Whitehouse e cols., 1981). Esse déficit, de uma forma geral, tem sido relacionado com receptores colinérgicos principalmente muscarínicos, porém, os receptores nicotínicos estão significativamente reduzidos no córtex e hipocampo de pacientes com DA (Araujo e cols., 1988; London e cols., 1989). Os inibidores de AChE são os principais agentes farmacológicos usados para combater os sintomas da DA, apesar de existirem estudos de outros agentes, porém, com uso

controverso (Akhondzadeh e cols., 2002; Bullock, 2002; Stip e cols., 2007). Estudo com inibidores da AChE em animais têm sido eficazes no tratamento crônico de ratos idosos com déficit colinérgico e de memória. Todavia, o uso de inibidores de AChE tem apresentado efeitos colaterais como náusea, anorexia, vômito e diarreia em pacientes com DA (Akhondzadeh e Abbasi, 2006). Dentre os fármacos aprovados para utilização do tratamento da DA podemos destacar galantamina, donepezil e rivastigmina (Greenblatt, 1999; Gustav, 2005).

Baseada em substâncias naturais, a galantamina (Figura 3A), uma terceira geração de inibidores de acetilcolinesterase e modulador de receptores nicotínicos, é um alcalóide capaz de ultrapassar a barreira hemato-encefálica (Fulton e Benfield, 1996). Atua de forma que sua inibição é considerada do tipo reversível, pela baixa afinidade com a AChE (Greenblatt, 1999). Além disso, é um agonista de receptores nicotínicos pós-sinápticos, porém, de baixa eficácia por se ligar somente alostericamente neste receptor (Pereira e cols., 2002, Gustav Akk, 2005; Greenblatt, 1999). Em tratamentos clínicos, tem sido eficaz por aliviar os sintomas da DA (Raskind e cols., 2000; Tariot e cols., 2000; Yuede e cols., 2007). Tem meia vida de cinco a seis horas, sendo metabolizada pela enzima hepática citocromo oxidase P-450 (CYP-450). Em ensaios clínicos, sua utilização não tem sido associada com hepatotoxicidade (Akhondzadeh e cols., 2002; Akhondzadeh e Abbasi, 2006; Raskind e cols., 2000). Em coelhos idosos é relacionada por melhorar o aprendizado de tarefas de condicionamento (Weible e cols., 2004; Woodruff-Pak e cols., 2001; revisado por Oh e cols., 2006). Este referido fármaco também tem sido eficaz no combate à demência e à memorização dependente do hipocampo em roedores (Yuede e cols., 2007).

Donepezil (ver figura 4B) é também um inibidor reversível de AChE e de atuação central, mas que, ao contrário da galantamina, possui maior afinidade pela AChE e maior disponibilidade no organismo quando ingerido oralmente (Geerts, 2005; Murai, 2007). Assim como a galantamina, donepezil é metabolizado pela CYP-450 (Akhondzadeh e Abbasi, 2006). Este fármaco também é utilizado para reduzir os déficits de aprendizagem e sintomas gerados pela DA (Yuede e cols., 2007), além de ser utilizado em pessoas com impedimento cognitivo vascular médio ou moderado, melhorando a função cognitiva destas após 6 meses de tratamento (Malouf e Birks; 2007).



**Figura 3- Inibidores da Acetilcolinesterase.**

**A)** *Galantamina*, alcalóide da flor *Galanthus nivalis* da família *Amaryllidaceae* descoberto em 1950 (Greenblatt, 1999). **B)** *Donepezil* possui uma biodisponibilidade oral de 100% quando ingerido; tem meia vida de 70 horas (Geerts, 2005).

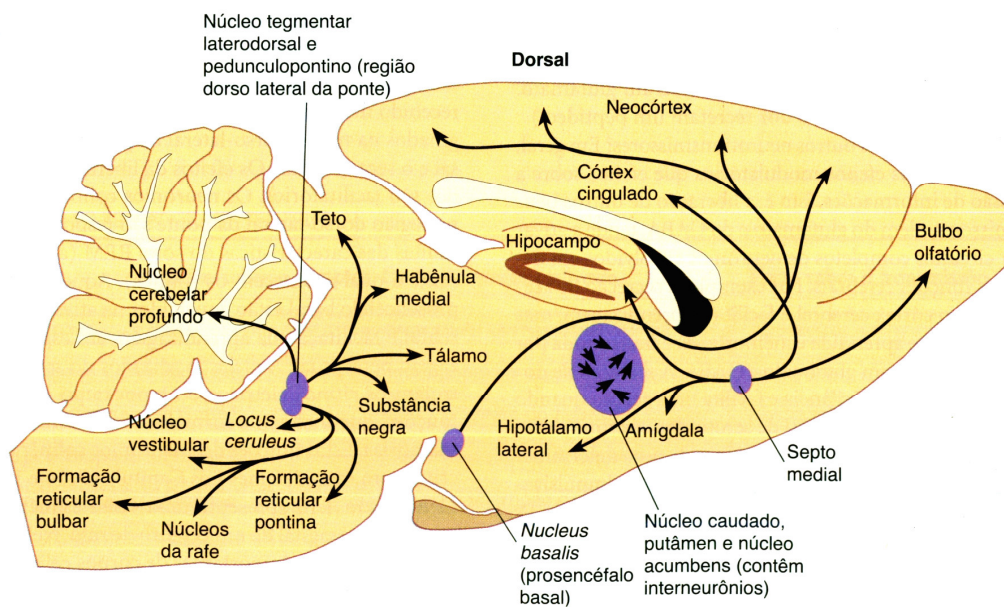
De fato, a prescrição de anti-AChE se deve ao fato de que sua administração é capaz de melhorar alguns dos sintomas cognitivos apresentados na DA (Cummings, 2004).

### 1.2.3- Transmissão colinérgica e memória

Os terminais colinérgicos são amplamente distribuídos ao longo do cérebro (ver figura 4). Desta forma, eles podem ser classificados em sistemas tais como o originado na região dorso lateral da ponte, no prosencéfalo basal e nos núcleos do septo medial e basal de Meynert. Os neurônios colinérgicos estão difundidos nas regiões dorsal e ventral do estriado, todas as regiões do sistema de projeção do prosencéfalo basal, os núcleos pedúnculo pontino e os núcleos tegmentais látero-dorsais das projeções mesopontinas, da subdivisão motora esquelética e autonômica nos núcleos nervosos craniais parassimpáticos, e na medula espinhal (Carlson, 2002).

Na região dorso-lateral da ponte, existe uma rede neuronal associada à regulação colinérgica do sono, especificamente na fase REM. A destruição de neurônios colinérgicos na região dorsal lateral da ponte resultou na perda tanto do sono REM quanto do tônus muscular (Webster e Jones, 1988; Indian, 2007) enquanto a estimulação elétrica destes neurônios foi responsável pelo aumento do sono (Thakkar e cols., 1996; Indian, 2007). O septo medial é responsável pelo controle do ritmo elétrico do hipocampo e atuam na modulação de suas funções na memorização. O núcleo basal de Meynert provê a inervação colinérgica para o neocórtex (Wolf, 1991; Carlson 2002; Bear e cols., 2002).

A ACh pode exercer efeitos específicos sobre o comportamento (Cooper e cols., 1996, Hoffman e cols.; 2000, Izquierdo e cols., 2002). Ela é responsável por modular também a eficácia geral do processamento cortical ou sensorio associativo. Exerce, *in vivo*, efeito de modificação da resposta celular e modulação de funções tais como a auditiva e somatosensória, além de participar nas funções cognitivas superiores através de modelamento de redes neurais (Miranda e cols., 2003; Weinberger e Bakin, 1998; Myers e cols., 1996; Metherate e Ashe, 1993; Dykes e cols., 1990).



**Figura 4-** Um corte esquemático mediosagital de um cérebro de rato, mostrando a localização dos grupos mais importantes de neurônios colinérgicos e a distribuição de seus axônios e botões terminais (adaptado de Wool, 1991).

A transmissão colinérgica parece ser importante na tarefa de reconhecimento de objeto, pois tanto escopolamina quanto atropina – antagonistas de receptores muscarínicos colinérgicos – administrados sistemicamente, impedem o reconhecimento visual em mamíferos (Jones e Higgins, 1995; Robbins e cols., 1997, Penetar e McDonough, 1983; Aigner e Mishkin, 1986; Aigner e cols., 1991; Huston e Aggleton, 1987; Bartolini e cols., 1996; Vannucchi e cols., 1997; Pitsikas e cols., 2001). Em humanos, o déficit do reconhecimento visual é revertido pelo uso de inibidores de AChE (Wezenberg e cols., 2005). A administração sistêmica de escopolamina (0,2-1 mg/kg) impede a aquisição da

memória espacial no reconhecimento de objetos, mostrando que os receptores colinérgicos muscarínicos estão envolvidos neste tipo de memória espacial episódica (Linstow Roloff e cols., 2007).

Dentre as estruturas cerebrais estudadas, o córtex perirrinal tem sido relatado como fundamental na tarefa de reconhecimento de objeto. A administração de escopolamina intra-perirrinal promove prejuízos na tarefa de reconhecimento visual em primatas não humanos (Tang e cols., 1997; Warburton e cols., 2003; Abe e cols., 2004). A administração, no córtex perirrinal, de imunotoxinas inativadoras de vias colinérgica prejudicou o desempenho dos animais na tarefa de reconhecimento de objeto (Warburton e cols., 2003). Lesões seletivas de projeções colinérgicas do prosencéfalo basal para o córtex perirrinal impedem a tarefa de reconhecimento de objetos (Bussey, 2005). Assim, é possível associar ao sistema colinérgico do córtex perirrinal uma contribuição para o aprendizado na tarefa de reconhecimento de objeto.

Durante a tarefa de reconhecimento de objetos não podemos excluir o componente atencional inerente a este paradigma. Capacidades atencionais são mediadas por circuitos parietais e pré-frontais (Posner and Dehaene, 1994; Coull, 1998; Corbetta and Shulman, 2002). Neurônios colinérgicos provenientes do prosencéfalo basal que se projetam para estas regiões corticais representam um componente crucial para os processos atencionais (Robbins e cols., 1997; Sarter e cols., 2005). Bensadoun e colaboradores (2004) demonstraram que o pretratamento com escopolamina, atagonista colinérgico, diminui a habilidade de camundongos numa tarefa de discriminação visual, a qual exige a eficiência dos circuitos atencionais.

Além da abordagem comportamental associada com a farmacológica, estudos recentes têm utilizado como ferramenta modelos animais geneticamente modificados (Oddo e cols., 2003; Gainetdinov e cols., 2003; Young e cols., 2006; Myslivecek e cols., 2007; Prado e cols., 2006). Estes modelos são bastante úteis para avaliar alterações comportamentais decorrentes de modificações plásticas dependentes de proteínas específicas, que podem ser abolidas totalmente ou ter sua expressão diminuída, principalmente quando se trata de proteínas essenciais à sobrevivência.

### 1.3- Modelo animal de hipofunção colinérgica

A manipulação biomolecular de componentes genéticos do sistema de neurotransmissão tem sido uma das formas para avaliar e investigar as funções neuroquímicas e suas associações através do comportamento. Quando proteínas componentes do sistema colinérgico têm sua expressão abolida completamente, como por exemplo deleções dos genes para ChAT (Brandon e cols., 2003; Misgeld e cols., 2002), CHT1 (Ferguson e cols., 2004) e VACHT (Prado e cols., não publicado), geram animais natimortos. Entretanto, animais heterozigotos para deleção induzida de genes para ChAT (Brandon e cols., 2004) ou CHT1 (Bazalakova e cols., 2007) sobrevivem e são aptos a estudos de funções cognitivas. Camundongos com redução de expressão do transportador vesicular de acetilcolina (VACHT KD) são viáveis para estudar as funções cognitivas em um modelo de hipofunção colinérgica (Prado e cols., 2006). Nestes animais, VACHT KD<sup>HET</sup> (knockdown heterozigotos), assim denominados por expressarem apenas 55% ( $\pm 4$ ) dos níveis normais da proteína VACHT, apresentaram déficits de memória de reconhecimento social e de objetos. Já os animais KD<sup>HOM</sup> (knockdown homozigotos), assim denominados por expressarem apenas de 30-35% dos níveis normais da proteína VACHT, apresentaram pronunciadas alterações neuromusculares. Estes animais possuem tônus colinérgico reduzido e conseqüentemente dificuldades na aprendizagem de uma atividade motora. Embora os camundongos mutantes possam aprender as tarefas motoras, eles precisam de mais treinamento para alcançar a performance máxima atingida pelos animais normais (de Castro e cols., em anexo).

Os camundongos KD, portanto, vêm sendo estudados para avaliar como a diminuição da liberação de acetilcolina no cérebro afeta funções cognitivas. Já que a memória tipo episódica em animais, assim como a episódica em humanos, apresenta componentes espaciais e temporais, avaliamos a memória de reconhecimento de objetos enfatizando estes dois componentes em camundongos VACHT KD<sup>HET</sup>.



## **2- OBJETIVOS**

## **2.1- Objetivo Geral**

Investigar o processamento da memória, especificamente do tipo episódica, em camundongos deficientes do transportador vesicular de acetilcolina (VChT KD).

## **2.2- Objetivos específicos**

2.2.1. Avaliar o componente espacial e o temporal da tarefa de reconhecimento de objetos em animais VChT KD.

2.2.2. Avaliar o efeito de inibidores de acetilcolinesterase sobre a aprendizagem do componente temporal da tarefa de reconhecimento de objetos em animais VChT KD.

2.2.3. Avaliar o efeito de inibidores de acetilcolinesterase sobre a evocação do componente temporal da tarefa de reconhecimento de objetos em animais VChT KD.

### **3- METODOLOGIA**

### **3.1- Metodologia**

Utilizamos camundongos adultos machos (3-5 meses), cujo genótipo wild-type (WT) (selvagens), heterozigotos (VChT KD<sup>HET</sup>) ou homozigotos (VChT KD<sup>HOM</sup>), foi determinado por reação em cadeia da polimerase (PCR). Sempre que possível, foram utilizados animais da mesma ninhada (littermates) e foram feitos todos os esforços possíveis para a utilização otimizada de animais. Os camundongos foram mantidos em gaiolas com, no máximo, cinco indivíduos. Estes foram acondicionadas em estante climatizada, com temperatura controlada 22±1 °C e ciclo claro-escuro de 12h. A alimentação e água foram oferecidas *ad libitum*. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) e estiveram de acordo com as normas dos “*Principles of laboratory animal care*” NIH publication N° 85-23, revisado em 1996.

#### ***3.1.1- Protocolo de reconhecimento de objeto***

O reconhecimento de objetos pode ser avaliado utilizando-se diferentes protocolos que acessam diferentes componentes da memória tipo-episódica. Em todos os paradigmas realizados neste trabalho, utilizamos como contexto uma caixa branca retangular (30 cm de largura por 50 cm de comprimento), igualmente iluminada. Todos os animais passaram por uma sessão de habituação ao contexto de 10 min, 24h antes dos experimentos de memória. Em todos os protocolos, tanto as sessões de treino quanto as de teste foram de 10 minutos, e os intervalos entre as sessões foram de 1 hora. Utilizamos objetos plásticos (legos) os quais eram limpos pós-exploração com álcool 70%, concomitantemente com a limpeza do contexto. Consideramos como tempo de exploração quando o animal tocava, cheirava ou encostava suas vibrissas no objeto ou mantinha sua cabeça voltada ao objeto dentro de um raio de dois centímetros. Os tempos de exploração para cada objeto foram contabilizados manualmente com o uso de cronômetro digital graduado em centésimo de segundo. Além disso, todos os experimentos foram filmados, e realizamos, sempre que necessário, a confirmação off-line dos dados. Em todos os experimentos o experimentador desconhecia o genótipo dos animais.

### ***3.1.2- Protocolo de preferência pelo objeto novo – componente novidade***

Durante a sessão de treino os animais foram expostos à dois objetos idênticos e durante a sessão de teste, um dos objetos foi trocado por um objeto novo, mantendo a mesma localização espacial dentro da caixa. Durante a sessão de treino, espera-se que o animal explore igualmente os objetos, já que são idênticos. Na sessão de teste, espera-se que o animal seja capaz de distinguir um objeto familiar de um desconhecido, assim, passe a maior parte do tempo explorando o objeto novo.

### ***3.1.3- Protocolo de localização espacial do objeto – componente espacial***

Durante a sessão de treino os animais exploraram dois objetos idênticos e, após o intervalo de uma hora, na sessão de teste, um dos objetos teve sua localização espacial modificada. Espera-se que um animal capaz de identificar a alteração espacial do objeto explore por mais tempo o objeto que teve sua posição modificada.

### ***3.1.4- Protocolo de ordem temporal de objetos – componente temporal***

Esta tarefa de identificação temporal (Mitchell e Laiacona, 1998) é constituída de três partes e avalia a capacidade do animal discernir entre um objeto antigo e o mais recente. Na primeira sessão de treino foram apresentados dois objetos idênticos, denominados antigos. Na segunda sessão de treino foram apresentados outros dois objetos idênticos, denominados recentes. No terceiro momento, durante a sessão teste, foi apresentado um objeto idêntico ao antigo e um objeto idêntico ao recente. Espera-se que o animal explore por mais tempo o objeto antigo do que o recente.

### ***3.1.5- Intervenção farmacológica***

Todas as intervenções farmacológicas relacionadas ao processamento da memória foram realizadas utilizando o protocolo de ordem temporal de objetos. Utilizamos os inibidores de acetilcolinesterase, *galantamina* e *donepezil*. A via de administração foi intraperitoneal. Para o cálculo do volume a ser injetado foi feito uma média entre os camundongos de massas semelhantes e utilizado um volume aproximadamente de 100 µl por animal. Além disso, em todos os experimentos que exigiram intervenção

farmacológica, foram realizados testes controles com aplicação de 24 horas antes de cada experimento. Isto foi necessário para uma avaliação controlada do efeito, por si só, desta intervenção em ocasionar alguma alteração comportamental.

Para avaliar o efeito da galantamina na aprendizagem, administramos as doses de 0,5 mg/kg; 1,0 mg/kg; 3,0 mg/kg e 10 mg/kg, trinta minutos antes da primeira sessão de treino. Para avaliar o efeito da galantamina na evocação, administramos somente a dose de 1,0 mg/kg, trinta minutos antes da sessão de teste.

Para avaliar o efeito do donepezil na aprendizagem, administramos a dose de 0,5 mg/kg, trinta minutos antes da primeira sessão de treino.

### ***3.1.6- Campo aberto (open field)***

Para avaliar se os efeitos promnésicos da galantamina foram decorrentes de alterações na atividade locomotora, utilizamos um Sistema Computadorizado de Monitoramento de Atividade Animal Digiscan (Omnitech Digiscan). Este sistema registra a atividade horizontal percorrida em uma caixa (20 x 20 x 30,5 cm) rodeada por feixes de sensores internos de infra-vermelho horizontais e verticais. As caixas foram conectadas ao Analisador Digiscan, que trabalhava diretamente associado por interface ao computador, para interpretar as interrupções dos feixes de luz. Com este sistema foram medidos apenas os valores de atividade horizontal, expressos em um número de interrupções dos sensores horizontais em intervalos de 5 min. Camundongos WT e VChT KD<sup>HET</sup> exploraram o campo aberto por 60 min para habituares à caixa e então receberam salina i.p. e medimos a atividade locomotora por mais 120min. No dia seguinte, novos animais exploraram o campo aberto 60 min, para garantir que todos os animais habituassem à caixa e então foi administrado galantamina (i.p.) na dose de 1,0 mg/kg e a atividade locomotora foi monitorada por mais 120 min.

### ***3.2- Análise estatística***

Os resultados referentes aos protocolos de reconhecimento de objetos foram expressos como porcentagem de tempo de exploração de cada objeto. Para comparar os tempos de exploração de cada objeto numa única sessão (treino ou teste) utilizamos teste t de Student. Para verificar se havia diferença entre os genótipos, utilizamos ANOVA de uma via seguida pelo post-hoc de Bonferroni. Na análise dos resultados provenientes dos experimentos de atividade locomotora, utilizamos ANOVA de duas vias seguida pelo post-hoc de Bonferroni.

## **4- RESULTADOS**

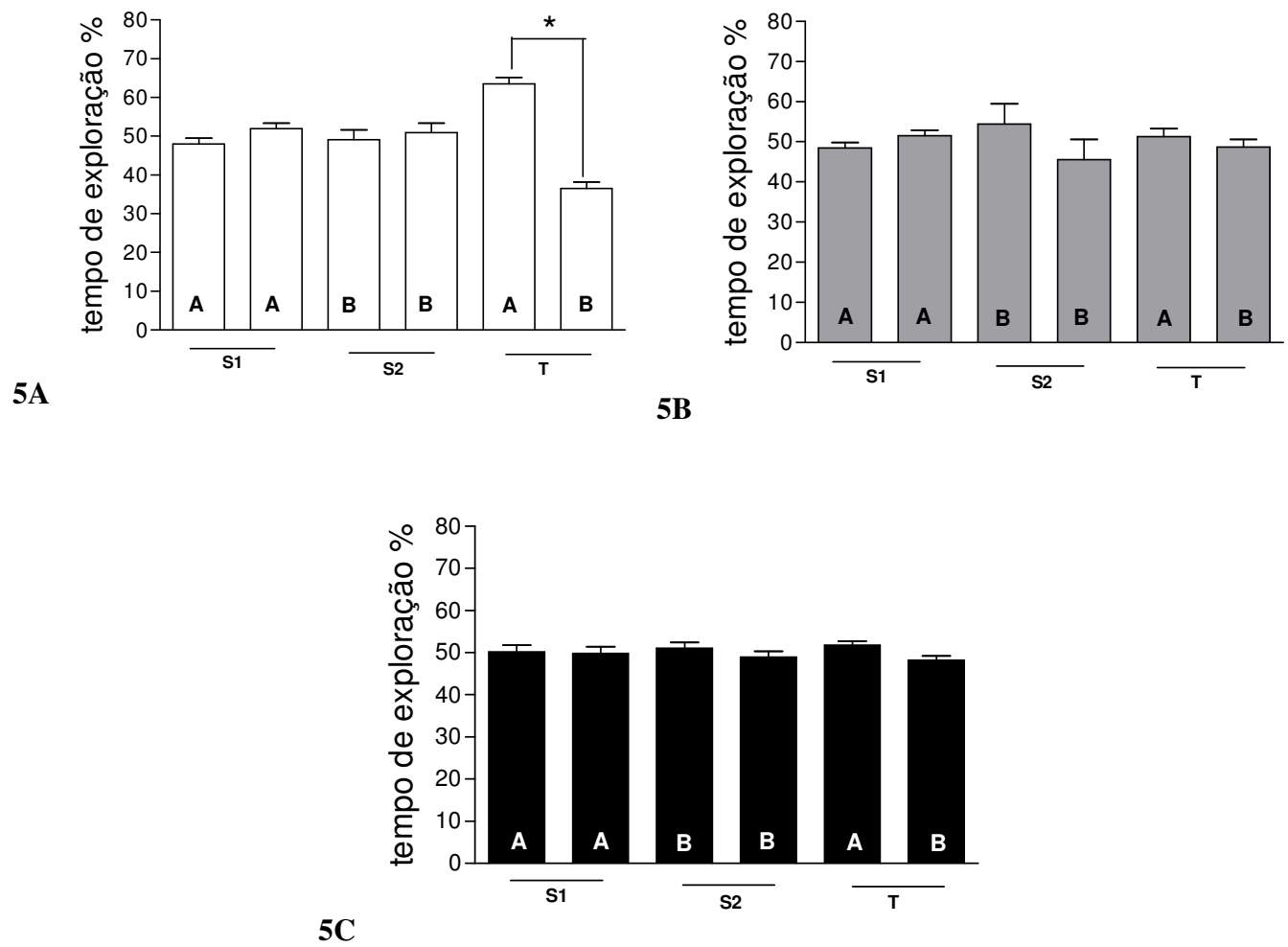


## 4-1 Resultados

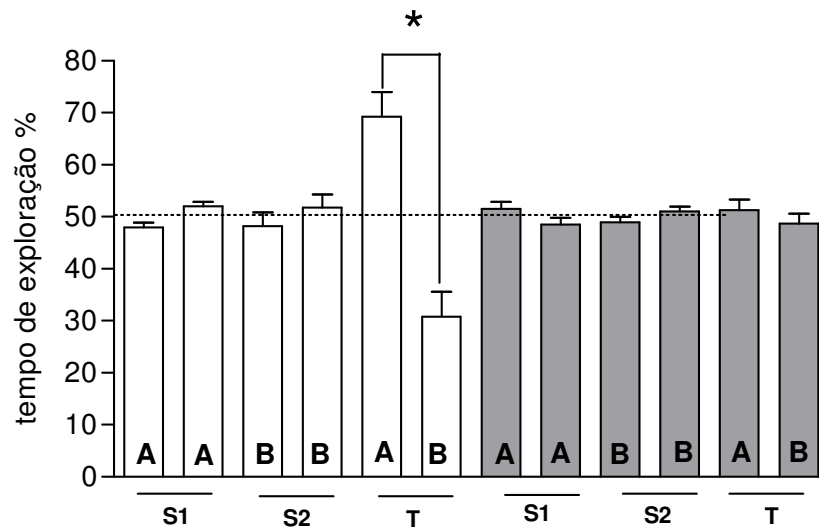
### 4.1.1- Protocolo de identificação temporal dos objetos – componente temporal

Para identificar se o animal distingue, dentre dois objetos já vistos, qual o mais recente, foi realizado o teste de memória temporal (Mitchell e Laiacóna, 1998). A figura 5 nos mostra que, após 2 horas, e, diferentemente do grupo controle (figura 5A), os animais VACHT KD<sup>HET</sup> (Figura 5B) e VACHT KD<sup>HOM</sup> (Figura 5C) não distinguem, entre dois objetos previamente vistos, qual deles é o mais recente.

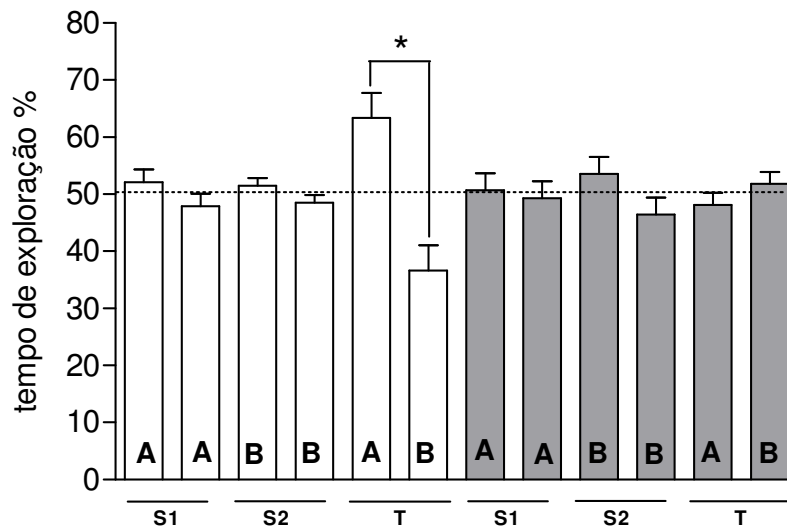
Como previamente mostrado, os animais VACHT KD apresentam déficits cognitivos em relação à identificação, entre dois objetos, qual o mais recente. Assim, administramos inibidores da acetilcolinesterase tais como donepezil e galantamina para ver se o déficit é revertido com o aumento do tônus colinérgico. Desde que os dois genótipos VACHT KD apresentam o mesmo déficit, nós utilizamos apenas VACHT KD<sup>HET</sup> nesta administração, por estes serem menos suscetíveis à fadiga muscular. Administração de salina i.p. também não tem efeito (ver gráfico 6A). O cálculo da dose foi realizado a partir de grupos de animais com pesos semelhantes, porém, com solução diluída sempre para um volume final de 100 µl de salina administrada intraperitonealmente. Inicialmente, a aplicação da dose de 0,5 mg/kg de galantamina intraperitoneal (i.p.) *trinta minutos antes do treino*, não foi capaz de reverter o déficit fenotípico apresentado por animais VACHT KD<sup>HET</sup>. O gráfico 6B mostra que os animais VACHT KD<sup>HET</sup> não foram capazes de fazer distinção entre os objetos, explorando-os aproximadamente em tempos iguais durante o período de test (T).



**Figura 5-** Camungongos VChT KD<sup>HET</sup> (B) e VChT KD<sup>HOM</sup> (C) não distinguem um objeto recente de um objeto velho apresentado em relação a um grupo controle (A). Resultados são apresentados como MÉDIA ± EPM [animais selvagens, F(2,5) = 18.27, p<0,05 n=7; camundongo VChT KD<sup>HET</sup> F(2,6) = 0.1633, p = 0.8504 n=8] com ANOVA de uma via seguida com teste post-hoc de Bonferroni. Durante as sessões de treino (S) todos os genótipos exploraram igualmente os objetos.



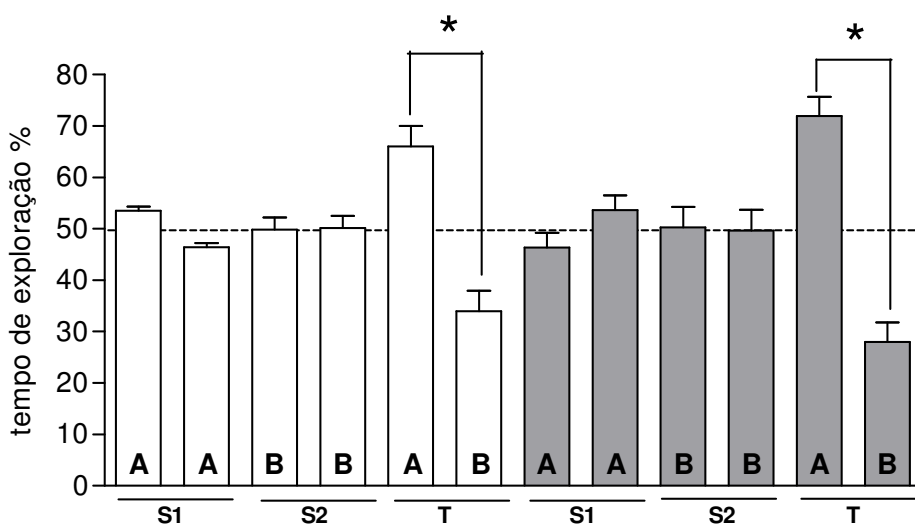
6A



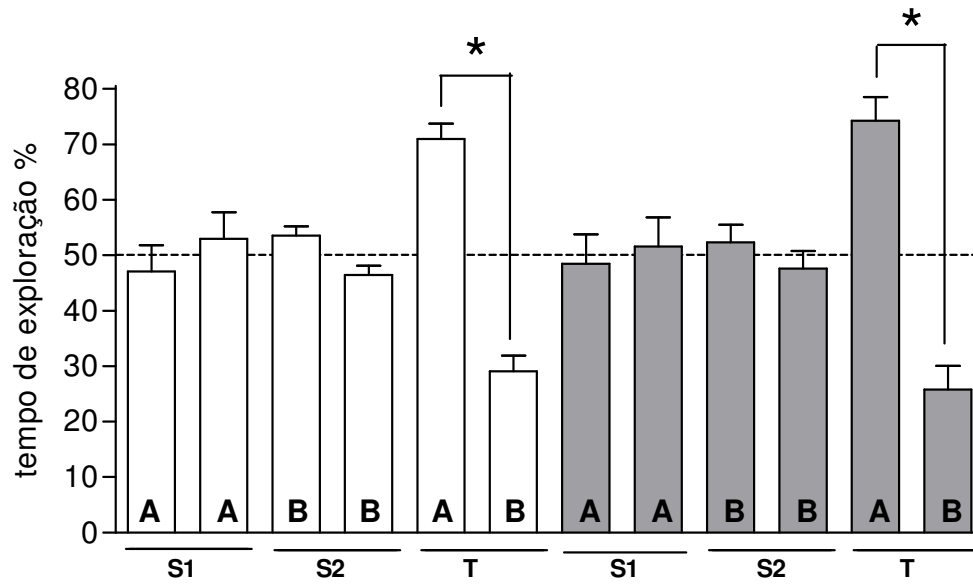
6B

**Figura 6. (A)- Administração (i.p.) de salina 100 µl pré-treino não altera a exploração** – Injeção de salina não teve efeito em ambos os genótipos . A análise apresenta MÉDIA ± EPM [WT, barras brancas,  $F(2,4) = 15.03$ ,  $*p < 0.05$   $n=8$ ; camundongos VChT KD<sup>HET</sup>, barras cinza,  $F(2,4) = 0.9116$   $p=0.2295$ ,  $n = 8$ ] com ANOVA de uma via e teste post hoc de Bonferroni. **(B)- Galantamina 0,5mg/kg (i.p.) administrada trinta minutos antes da aquisição não reverte o déficit nos animais VChT KD<sup>HET</sup> (barras cinza)**. A análise apresenta MÉDIA ± EPM [animais selvagens,  $F(2,6) = 8,538$ ,  $P < 0,05$   $n=8$ ; camundongos VChT KD<sup>HET</sup>  $F(2,6) = 0,8987$   $p = 0,4909$   $n = 8$ ] com ANOVA de uma via e com teste post-hoc de Bonferroni.

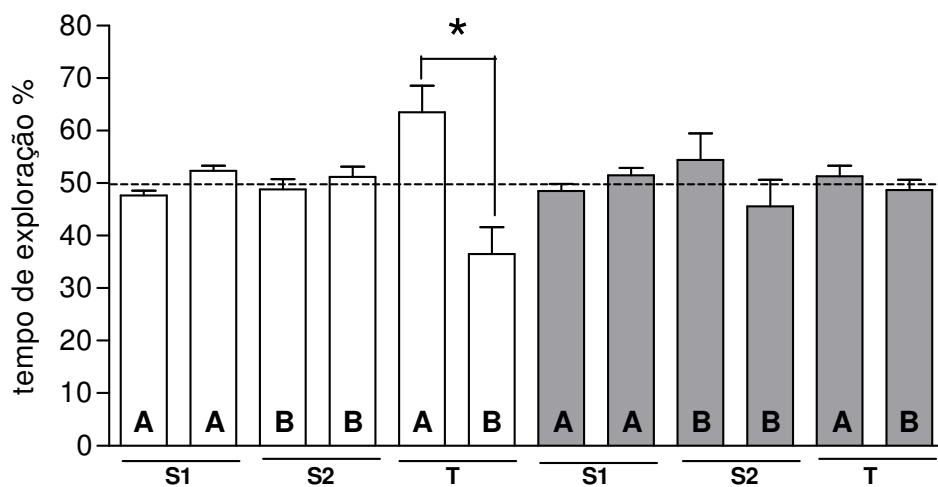
Também foi realizada, trinta minutos antes do treino, administração de *galantamina* i.p. nas dosagens de 1,0 mg/kg, 3,0 mg/kg e 10,0 mg/kg tanto no grupo controle como nos animais VChT KD<sup>HET</sup>. Desta forma, foi possível perceber, pela análise das figuras 7 e 8, que as duas primeiras doses administradas nos animais VChT KD<sup>HET</sup> proporcionaram a reversão do déficit. Logo após a administração pré-treino da dose de 10 mg/kg do referido fármaco, os animais apresentaram inúmeros efeitos colaterais pelo excesso de estimulação parassimpática, o que impossibilitou a exploração dos objetos na caixa, e assim inviabilizou a utilização do fármaco nesta concentração. Tendo em vista a dose mínima de *galantamina* administrada i.p. capaz de reverter o fenótipo nos animais VChT KD<sup>HET</sup> ser de 1,0 mg/kg, a mesma dosagem foi aplicada i.p. novamente, porém agora, 30 minutos antes do “teste”. A administração de Galantamina 1,0 mg/kg no período pré-teste, não reverteu o déficit apresentado pelos animais VChT KD<sup>HET</sup> (figura 9).



**Figura 7- Galantamina 1,0 mg/kg (i.p.) administrada trinta minutos antes da aquisição reverteu o déficit observado nos camundongos VChT KD<sup>HET</sup>. A análise apresenta MÉDIA ± EPM [WT, barras brancas, F(2,4) = 9.260, \*p<0.05 n=8; camundongos VChT KD<sup>HET</sup>, barras cinza, F(2,4)=14.82, \*p<0.05, n = 8] com ANOVA de uma via e teste post hoc de Bonferroni.**

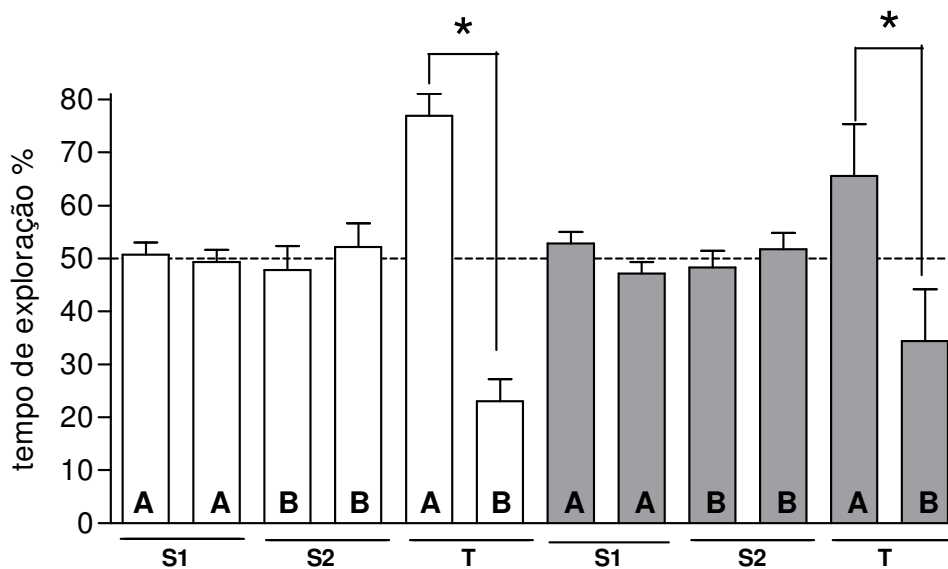


**Figura 8. -Galantamina 3,0 mg/kg (i.p.) administrada trinta minutos antes da aquisição reverteu o déficit observado nos camundongos VChT KD<sup>HET</sup>.A análise apresenta MÉDIA ± EPM [WT, barras brancas, F(2,9) = 16.36, \*p<0,05 n=10; camundongos VChT KD<sup>HET</sup>, barras cinza, F(2,8)= 12.62 p<0.05, n = 9] por ANOVA de uma via com teste post-hoc de Bonferroni.**



**Figura 9- Galantamina 1,0 mg/kg (i.p.) administrada trinta minutos antes da evocação não reverteu o déficit nos animais VACHT KD<sup>HET</sup>. A análise apresenta MÉDIA ± EPM [WT, barras brancas,  $F(2,6) = 38.78$ ;  $*p < 0.05$   $n=8$ ; camundongos VACHT KD<sup>HET</sup>, barras cinza,  $F(2,6) = 1.773$ ,  $p = 0.19$   $n = 8$ ] com ANOVA de uma via e com teste post-hoc de Bonferroni.**

A partir destes resultados já demonstrados com galantamina, utilizou-se outro inibidor de acetilcolinesterase, *donepezil*. Este foi administrado i.p. na dosagem única de 0,5 mg/kg pré-treino nos animais VACHT KD<sup>HET</sup> e no grupo controle (figura 10). Esta dose foi suficiente para reverter o déficit encontrado em animais VACHT KD<sup>HET</sup> na tarefa de diferenciação temporal. Esta dose foi escolhida a partir da metodologia utilizada para galantamina, e baseada em estudos de Barnes e colaboradores (2000).



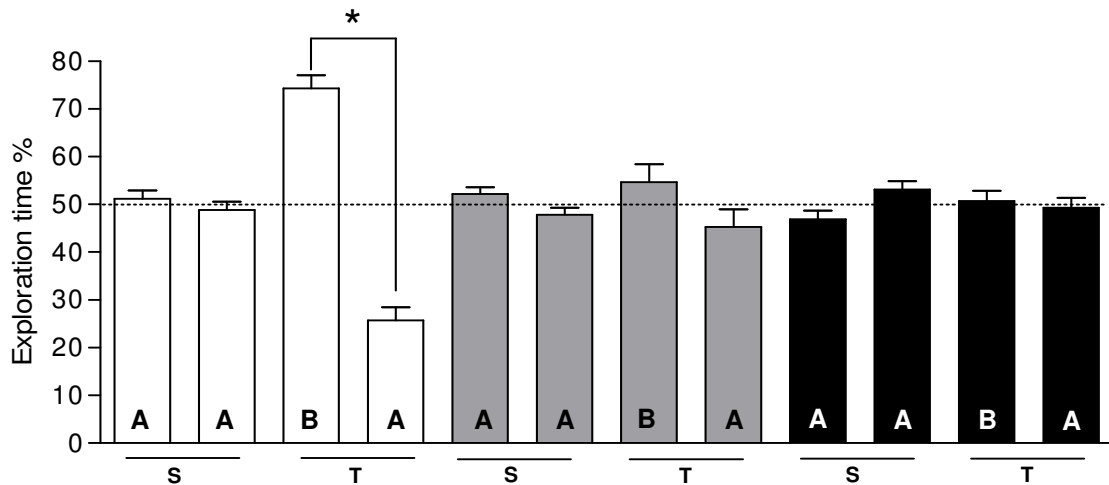
**Figura 10 - Donepezil 0,5 mg/kg (i.p.) administrada trinta minutos antes da aquisição reverteu o déficit nos animais VACHT KD<sup>HET</sup>. A análise apresenta MÉDIA ± EPM [animais selvagens,  $F(2,5) = 20.81$ ,  $p < 0.05$   $n = 7$ ; camundongos VACHT KD<sup>HET</sup>  $F(2,5) = 3,007$ ,  $p < 0,05$   $n = 7$ ] com ANOVA de uma via e com teste post-hoc de Bonferroni.**

#### ***4.1.2- Protocolo de reconhecimento de um novo objeto***

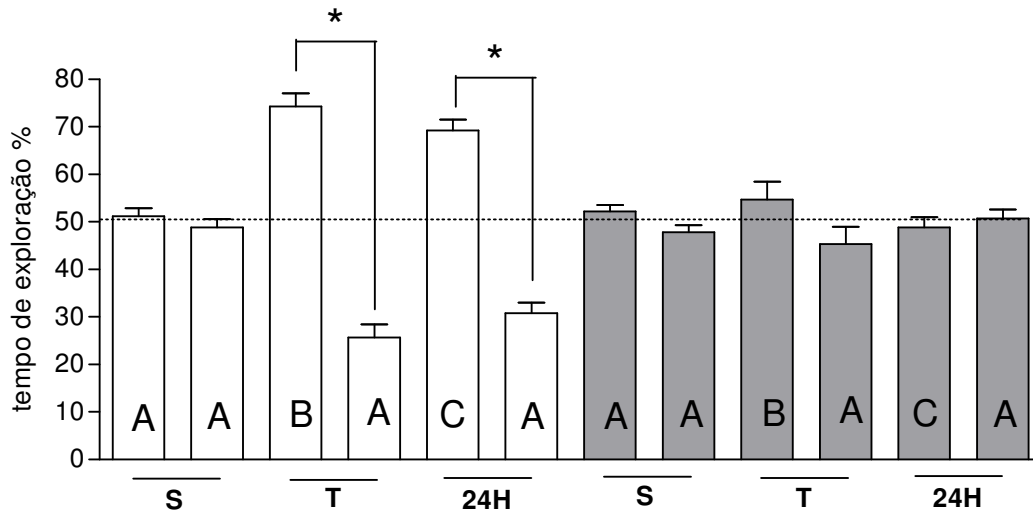
Para verificar se os camundongos VChT KD eram capazes de distinguir um objeto novo de um previamente conhecido, utilizamos o protocolo de reconhecimento de um novo objeto. Os animais de todos os genótipos exploraram igualmente os dois objetos idênticos (A) durante a sessão de treino (S). Na sessão de teste (T), uma hora pós-treino, os animais WT foram capazes de reconhecer o novo objeto, já que exploraram mais tempo o objeto novo (B) (figura 11A). Os animais VChT KD não foram capazes de diferenciar o novo objeto (B) do visto inicialmente (A), já que exploraram pela mesma porcentagem de tempo os dois objetos.

Quando realizamos o teste 24 horas após a sessão de treino, apenas os animais WT reconheceram o novo objeto, uma vez que passaram mais tempo explorando o objeto novo (24h após o primeiro treino). Já os animais VChT KD<sup>HET</sup> apresentaram déficit de reconhecimento a longo prazo de um novo objeto.





11A

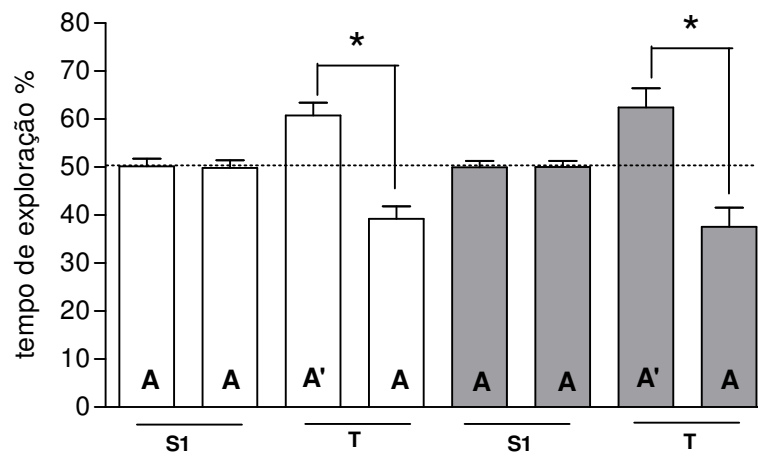


11B

**FIGURA 11. (A)- Camundongos VChT KD possuem déficit na tarefa de reconhecimento a curto-prazo de um novo objeto.** As barras brancas (WT, n = 7), cinza (VChT KD<sup>HET</sup>, n = 8) e pretas (VChT KD<sup>HOM</sup>, n=8) representam média ± erro padrão da média da porcentagem do tempo de exploração de cada objeto (letras A e B no interior de cada barra). Durante as sessões de treino (S) todos os genótipos exploraram igualmente os objetos. Na sessão de teste (T), realizada 1h após a sessão de treino, os animais VChT KD<sup>HET</sup> ( $F(2,6) = 0.1633$ ,  $p = 0.8504$ ) e VChT KD<sup>HOMO</sup> ( $F(2,6) = 0.1463$ ,  $p=0.1828$ ) não foram capazes de distinguir os dois objetos, apenas os animais WT ( $F(2,5) = 18.27$ ,  $*p<0.05$ ). **(B) - Camundongos VChT KD<sup>HET</sup> (barras cinza) não distinguiram entre um objeto já visto e um novo objeto apresentado após vinte e quatro horas.** O gráfico apresenta MÉDIA ± EPM; camundongo selvagem  $F(2,5) = 18.27$ ,  $p<0,05$ ; camundongo VChT KD<sup>HET</sup>  $F(2,6) = 0.1633$ ,  $p = 0.8504$  n=15; por ANOVA de uma via com teste post-hoc de Bonferroni

#### 4.1.3- Protocolo de localização espacial do objeto – componente espacial

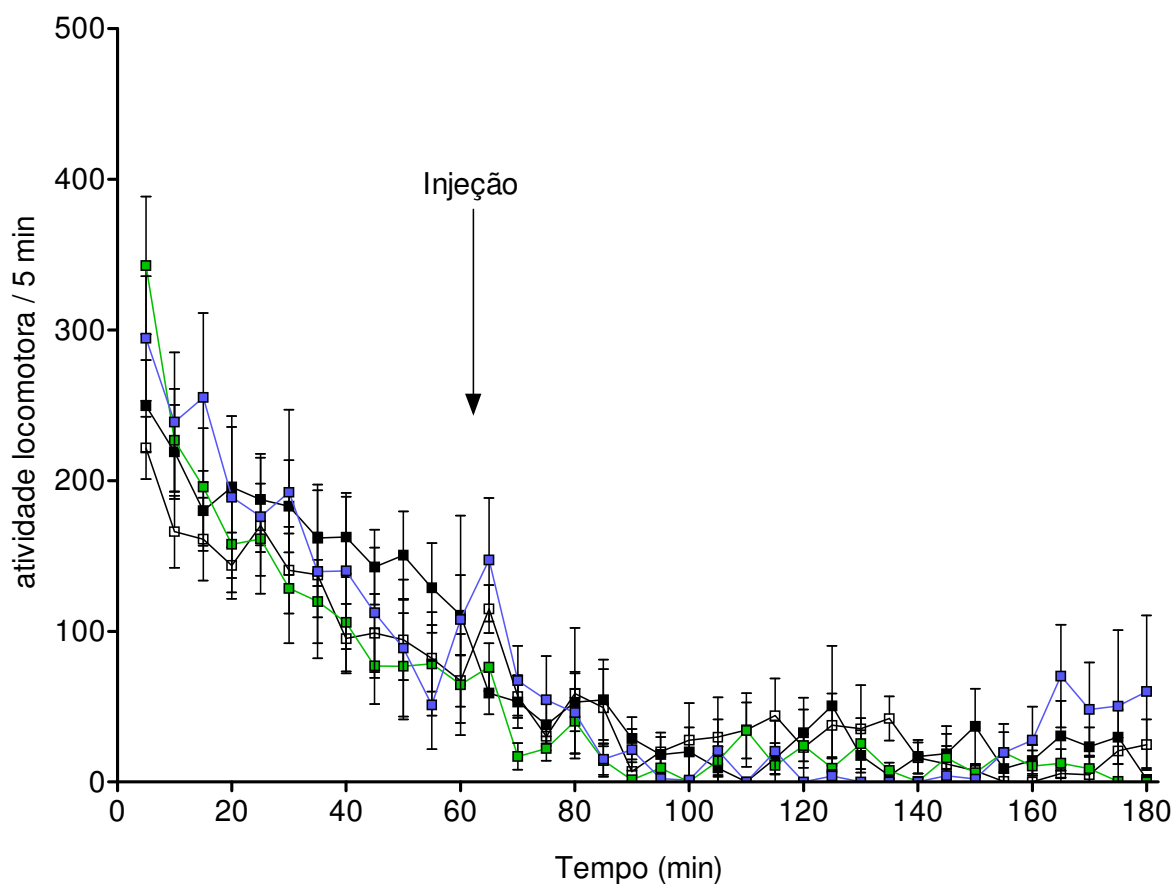
Sabendo que animais com redução colinérgica têm um déficit na identificação de um novo objeto, buscamos agora conhecer mais sobre uma outra propriedade da memória episódica, o componente espacial. Os animais do grupo controle podem identificar um objeto que é movido de seu lugar como visto pelo gráfico da figura 12 (Ennaceur, Neave, e Aggleton, 1997). O mesmo procedimento foi realizado para os animais VACHT KD<sup>HET</sup> (figura 12). A partir deste gráfico podemos perceber que tanto camundongos selvagens quanto animais VACHT KD<sup>HET</sup> exploram mais, após intervalo de 60 minutos, o objeto que foi movido para um novo lugar.



**Figura 12-** Camundongos VACHT KD<sup>HET</sup> não possuem déficit na tarefa de localização espacial do objeto. As barras brancas (WT, n = 7) e cinza (VACHT KD<sup>HET</sup>, n = 8) representam média ± erro padrão da média da porcentagem do tempo de exploração de cada objeto (letras A e A' no interior de cada barra). Durante as sessões de treino (S) todos os genótipos exploraram igualmente os objetos. Na sessão de teste (T), realizada 1h após a sessão de treino, tanto os animais VACHT KD<sup>HET</sup> (em teste de Student, \*p<0.05) quanto animais WT (em teste de Student, \*p<0.05), foram capazes de distinguir a nova localização do objeto A'.

#### 4.1.4- Campo aberto

O campo aberto foi realizado para avaliar os efeitos da galantamina sobre a atividade locomotora. No campo aberto, após uma hora de exploração dos grupos de animais selvagens e VACHT KD<sup>HET</sup>, foi administrada galantamina intraperitoneal na dose de 1,0 mg/kg. A partir da aplicação do fármaco (seta da figura 13), os animais exploraram o campo aberto por um período de 120 minutos, e não houve diferença, estatisticamente significativa, de exploração entre os grupos como mostra a figura 13.



**Figura 13 – Atividade locomotora em resposta a galantamina.** Injeção de galantamina 1,0mg/Kg (i.p.) não afetou a atividade locomotora dos camundongos VACHT KD<sup>HET</sup> no campo aberto. A análise apresenta MÉDIA ± EPM [ ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni post hoc,  $F(35,504) = 18.69$ ]. Linhas brancas (WT - gal. 1,0 mg/kg i.p.); Linhas pretas (VACHT KD<sup>HET</sup> gal.1,0mg/kg i.p.); Linhas verdes (WT Salina i.p. 100µl); Linhas azuis (VACHT KD<sup>HET</sup> Salina i.p. 100µl).

## **5- DISCUSSÃO**

## 5.1- Discussão

O presente estudo revela interações importantes entre o armazenamento vesicular sináptico e o aprendizado na tarefa de reconhecimento de objeto envolvendo memória declarativa tipo episódica em camundongos. Os resultados sugerem que a acetilcolina contribui para a formação dos processos cognitivos relacionados à memória declarativa episódica, e mais, que a habilidade em sustentar um transporte eficiente do neurotransmissor nas vesículas sinápticas colinérgicas é fundamental para este tipo de aprendizado.

A memória episódica é um “frágil” tipo de memória declarativa e que, durante a infância, é o último tipo de memória a ser adquirido, porém na velhice, é o primeiro a ser perdido. Possui um tipo de processamento que se torna muito suscetível à doenças neurodegenerativas tais como esquizofrenia e a doença de Alzheimer (DA) (Griffiths e Clayton, 2001; Clayton e cols., 2007; Achim e cols., 2007). Durante o desenvolvimento da DA, as estruturas cerebrais sofrem mudanças degenerativas tais como atrofia ou disfunção celular comprometendo os mecanismos neurais relacionados à funções cognitivas superiores (McGeer e cols., 1984; DeKosky e cols., 1990; Mann, 1994; revisado por Barnes e cols., 2000). Assim, o declínio funcional dos neurônios colinérgicos pode ser responsável por alguns dos impedimentos cognitivos e progressivos associados à DA. Estes déficits apresentam-se, inicialmente, sobre o aprendizado e a memória declarativa (revisado por Sarter e Bruno, 1997). Especificamente, os neurônios colinérgicos do núcleo basal de Meynert se relacionam com estas alterações, pois são os neurônios que se projetam do prosencéfalo basal para o córtex cerebral e amígdala (McGeer e cols., 1984; Allen e cols., 1988; Rinne e cols., 1987; Vogels e cols., 1990; revisado por Barnes e cols., 2000).

A memória de reconhecimento de objetos é um tipo de memória associada à declarativa episódica. Esta confere a habilidade de distinção entre entidades novas e familiares sem a necessidade de punição ou mesmo privação da alimentação. Além disso, este tipo de memória integra informações baseadas diretamente nos objetos, na localização espacial ou na distinção da ordem temporal destes. Existem associações entre circuitos neuroquímicos e as regiões anatômicas envolvidas na memória de reconhecimento de objeto (Winters e Bussey, 2005; Dere e cols., 2007 - revisão). Os substratos para o

processamento do aprendizado desse mecanismo de memória eram inicialmente focados nas áreas hipocampais (Milner e cols., 1998; Albright e cols., 2000). O hipocampo é relacionado com a evocação da memória episódica (Samsonovich e Ascoli, 2005), porém, o envolvimento das vias neurais diretamente associadas à aquisição nesta estrutura tem sido controverso (Forwood e cols., 2005). O córtex perirrinal tem sido focado como uma possível estrutura envolvida neste tipo de tarefa desde demonstrações por Warbuton e cols., 2003. Atualmente, sabe-se também que, nesta estrutura, a transmissão glutamatérgica atua como a principal via neuromoduladora para a tarefa de reconhecimento de um novo objeto (Barker e cols., 2006). Assim, o papel das vias colinérgicas sobre a estrutura, função e vias de processamento deste tipo de memória declarativa tem sido controverso. Warburton e colaboradores (2003) demonstraram e Boyer e colaboradores (2005) confirmaram a importância da neurotransmissão colinérgica para a memória de reconhecimento associada principalmente ao córtex perirrinal, no lobo temporal. Já Hasselmo e Giocomo (2006), demonstraram que o tônus colinérgico influencia o aprendizado e a plasticidade por múltiplos mecanismos no córtex. (Hasselmo and Giocomo, 2006). Porém, outros estudos contradizem o envolvimento do sistema colinérgico com tarefa de reconhecimento de objeto (Paban e cols., 2005; Ennaceur, 1998).

Prado (2006) e colaboradores demonstraram que camundongos heterozigotos com hipofunção colinérgica, VAcHt KD, apresentam níveis de ACh reduzidos quando comparados aos níveis do grupo controle. Estes níveis foram medidos por microdiálise nas regiões frontal e estriado dos animais VAcHt KD<sup>HET</sup>. Esta redução foi significativa mesmo quando comparados os níveis colinérgicos após exocitose induzida por uma despolarização gerada pela aplicação de 60mM de solução de KCl. Estes animais, além de déficit no reconhecimento de objeto e social (Prado e cols., 2006), possuem déficit no aprendizado de memória de procedimento (de Castro e cols., em anexo). Apesar de conseguirem aprender uma tarefa motora, VAcHt KD demoram mais tempo para alcançar os níveis máximos do que animais WT (de Castro e cols., em anexo). Isto mostra que o tônus colinérgico é importante para facilitar este tipo de memória de procedimento. Assim, nosso trabalho se investiga se estes camundongos teriam algum déficit relacionado à memória declarativa, especificamente, tipo-episódica. Quando testado o componente temporal da memória declarativa, nós encontramos que, diferentemente de camundongos WT, camundongos

VAcHT KD<sup>HET</sup> não fazem distinção do objeto mais recente da tarefa de reconhecimento de objeto quanto ao tempo. Este resultado mostra que o aumento da atividade colinérgica, que demanda armazenamento eficiente de ACh nas vesículas sinápticas, regula a memória reconhecimento de objetos de ordem temporal.

Para verificar se o déficit apresentado nestes animais poderia ser revertido aumentando a disponibilidade colinérgica, utilizamos inibidores da AChE. Em ensaios clínicos, inibidores da AChE mostram uma alternativa para a elevação do tônus colinérgico na tentativa de reduzir os danos em pacientes com doenças neurodegenerativas como a DA. Tanto galantamina quanto donepezil, fármacos anti-AChE com mesmo tipo de neuroação inibitória enzimática, são muito utilizados para combater os déficits cognitivos primários recorrentes na DA (Wilkinson, 1998; Wilcock e cols., 1993; Thomsen e cols., 1990; Dal-Bianco e cols., 1991). Assim, após administração de galantamina i.p. 1mg/kg e 3mg/kg em camundongos VAcHT KD<sup>HET</sup> antes do treino, o déficit apresentado na tarefa de reconhecimento de ordem temporal é revertido. Porém, a administração de galantamina i.p. na dose de 0,5mg/kg não foi suficiente para reverter este deficit. Galantamina também foi administrada i.p. 10mg/kg, porém, tanto animais WT quanto VAcHT KD<sup>HET</sup> apresentaram efeitos colaterais que impediram a exploração dos objetos. Administramos também galantamina trinta minutos antes do teste para avaliar se o déficit apresentado poderia estar relacionado com a evocação. A dose utilizada foi a mesma que reverteu o déficit na aquisição, 1mg/kg. Porém, quando administrada neste intervalo referente à evocação, não foi possível reverter o déficit apresentado nos animais VAcHT KD<sup>HET</sup>. Este resultado mostra que o tônus colinérgico está envolvido com a codificação das informações apresentadas, e não com a evocação destas, e que o aumento da atividade colinérgica, que demanda eficiente armazenamento de ACh nas vesículas sinápticas, é importante na aprendizagem temporal. A ACh é o neurotransmissor responsável pela sinalização química nas junções neuromusculares. Desta forma, a galantamina poderia estar atuando nestes sítios e potencializando a atividade exploratória espontânea dos animais utilizados. A exploração aleatória e espontânea é a base da tarefa de reconhecimento de objetos. Assim, utilizando o campo aberto, aplicamos galantamina i.p. na dose inicial que reverteu o déficit (1mg/kg) após uma hora de habituação à caixa. Esta análise mostrou que a galantamina não altera a exploração dos animais mesmo após duas horas de atividade espontânea.

A galantamina, além sua ação anticolinesterásica, tem potenciação alostérica pós-sináptica de receptores colinérgicos nicotínicos (Gustav Akk, 2005; Wang e cols., 2007), sendo responsável pela inibição de 50% de atividade da colinesterase cerebral (Sweeney e cols., 1989). Donepezil é também um inibidor da AChE, porém, possui maior afinidade pela enzima acetilcolinesterase e não atua alostericamente em receptores pós sinápticos (revisado por Barnes e cols., 2000; Snape e cols., 1999; Murai e cols., 2007). Devido à ação agonista colinérgica da galantamina, utilizamos donepezil como controle experimental. Foi administrada a dose de 0,5 mg/kg de donepezil pré-treino sendo esta capaz de reverter o déficit apresentado por animais VACHT KD<sup>HET</sup>.

Para avaliar o componente novidade da tarefa de reconhecimento de objetos em animais VACHT KD, utilizamos a tarefa de reconhecimento de um novo objeto (Ennaceur e Delacour, 1988). Este tipo de memória também é associado à memória declarativa episódica (Tulving, 2000). Sabe-se que, neste intervalo de tempo, este traço de memória é lábil (STM) e que podem haver, conseqüentemente, alterações na consolidação da informação (Izquierdo e cols., 2000). Animais VACHT KD<sup>HET</sup> apresentam déficit no reconhecimento social e de um novo objeto com intervalo de 1 hora e meia (Prado e cols., 2006). Assim, nossos resultados mostram que, diferente dos animais WT, ambos genótipos de animais VACHT KD apresentaram déficit na tarefa envolvendo o componente novidade do reconhecimento de objeto. A partir desta análise, nossos resultados mostraram que, mesmo em um intervalo de tempo menor (60 min) do que apresentado por Prado e colaboradores (2006), animais não conseguem identificar um novo objeto. Além dos animais VACHT KD<sup>HET</sup>, o grupo VACHT KD<sup>HOM</sup> também apresentou tal déficit no reconhecimento de um novo objeto. Neste intervalo de tempo, não se pode distinguir consolidação em STM, somente picos de PKA após cinco minutos (Izquierdo, 2002). Portanto, para que estas informações se mantenham a longo prazo (LTM), é necessário que ocorra síntese protéica (revisado por Izquierdo e cols., 2002). Quando testamos o mesmo protocolo com intervalo de 24 horas, os animais VACHT KD<sup>HET</sup> ainda não são capazes de reconhecer um novo objeto apresentado. Isto mostra que, como já esperado, o tônus colinérgico é importante para o processamento e armazenamento de um novo objeto tanto em curta, quanto a longa duração.



A memória espacial é outra das propriedades intrínsecas da memória episódica e, a partir de análise comportamental, também podemos utilizar o paradigma de reconhecimento espacial de objeto para testá-la (Ennaceur, Neave, e Aggleton, 1997). Animais VACHT KD<sup>HET</sup>, assim como WT, são capazes de perceber as alterações espaciais quando submetidos à tarefa de variação espacial no reconhecimento de objetos, no protocolo de Y-maze (de castro e cols., em anexo) ou mesmo no Labirinto Aquático de Morris (de castro e cols., em anexo). Isto mostra que o reduzido tônus colinérgico observado em VACHT KD<sup>HET</sup> tem pouca influência sobre a memorização espacial com intervalos de 1 hora. Porém, as vias colinérgicas quando bloqueadas farmacologicamente diretamente na região hipocampal, causam prejuízos na realização de tarefas que envolvam memória espacial (Linstow Roloff e cols., 2007; Murai e cols., 2007; Carli e cols., 1997; Farr e cols., 1999; Farr e cols., 2000). Isto nos sugere que, apesar de não ser a principal via de processamento, as vias colinérgicas são necessárias para a eficácia deste tipo de aprendizagem. Todavia, Walsh e colaboradores (1995) mostram que extensivas lesões geradas por injeção i.c.v. de imunotoxina IGg-saporina, alteram a memória espacial. Este resultado talvez tenha sido obtido por utilizar um protocolo que altere outros sistemas neuroquímicos inespecificamente.

Existem sugestões de que o processo atencional depende do tônus colinérgico (Sarter e Parikh, 2005). Os animais VACHT KD não apresentaram déficit quanto à tarefa espacial, e, para esta tarefa ou qualquer outra tarefa comportamental, são necessários componentes atencionais (Muir e cols., 1996). A partir dos nossos resultados, podemos inferir que o processo atencional não está significativamente afetado pela redução do tônus colinérgico.

Squire e Alvarez (1995 - revisão) revisaram a idéia de que danos a estruturas cerebrais podem ter efeitos amnésicos na formação da memória declarativa. Alguns destes danos são associados a vias neuroquímicas colinérgicas lesadas através de imunotoxinas específicas ou mesmo inibidas farmacologicamente (Hammond e cols., 2004; Manns e cols., 2003; Kapur and Brooks, 1999; Kapur, 1993; Squire and Alvarez, 1995 - revisão). As vias colinérgicas também podem atuar na codificação da memória modulando a plasticidade sináptica (Dringenberg e cols., 2007) e facilitando as vias de entradas excitatórias corticais (Gioanni e cols. 1999). O processamento da memória episódica pode

ser realizado ou facilitado pelo envolvimento do sistema colinérgico. Os animais VAcT KD se apresentaram como um bom modelo para estudo de como o tônus colinérgico regula os mecanismos de aprendizagem e memória. Assim, o processo de aprendizagem da memória episódica parece estar diretamente relacionado à quantidade de ACh liberada na fenda sináptica.

## **6- CONCLUSÃO**

## 6.1- CONCLUSÃO

- A elevação do tônus colinérgico na aquisição, mas não na evocação, sugere que as vias colinérgicas são responsáveis principalmente pela fase de aquisição, e não na evocação destas informações.
- Na tarefa que avalia o componente novidade do reconhecimento de objeto, o tônus colinérgico parece influenciar tanto a curto quanto a longo prazo seu processamento.
- O processo de aprendizagem espacial ocorre mesmo com redução dos níveis de ACh. Apesar disso, parece que é necessário um mínimo de acetilcolina para o processamento deste tipo específico de memória.
- A habilidade de sustentar acetilcolina durante a atividade neuronal é importante, e até certo ponto imprescindível, para o aprendizado.

## **7-Referências Bibliográficas**

## 7- Referências Bibliográficas

1. Abe H, Ishida Y, Iwasaki T; **Perirhinal N-methyl-D-aspartate and muscarinic systems participate in object recognition in rats.** *Neuroscience Letters*, 2004, 356:191–194.
2. Achim AM, Marie-Claude B, Sutton H, Montoya A, Czechowska Y, Malla AK, Joobar R, Pruessner JC, Lepage M; **Selective Abnormal Modulation of Hippocampal Activity During Memory Formation in First-Episode Psychosis** *Arch Gen Psychiatry*/vol 64 (no. 9), sep 2007
3. Aggleton JP, Brown MW; **Interleaving brain system for episodic and recognition memory.** *Review, Science*, 2006, 10: 455- 463
4. Aigner TG, Mitchell SJ, Aggleton JP, DeLong MR, Struble RG, Price DL, Wenk GL, Pettigrew KD, Mishkin M; **Transient impairment of recognition memory following ibotenic-acid lesions of the basal forebrain in macaques;** *Experimental Brain Research* 1991; 86:18-26
5. Aigner TG, Mishkin M; **The effects of physostigmine and scopolamine on recognition memory in monkeys;** *Behavioral Neural Biology*, 1986; 45:81-7
6. Akhondzadeh S, Abbasi HS, **Herbal medicine in the treatment of Alzheimer's disease,** *Alzheimers Dis Other Demen* 2006; 21: 113
7. Akhondzadeh S, Noroozian M; **Alzheimer's disease: Pathophysiology and Pharmacotherapy.** *Drugs*. 2002; 4: 1167-1172.
8. Albright TD, Kandel ER, Posner MI; *Cognitive Neuroscience, Curr. Op. Neurobiol.*; 2000; 10, 612–624
9. Allen SJ, Dawbarn D, Wilcock GK; **Morphometric immunochemical analysis of neurons in the nucleus basalis of Meynert in Alzheimer's disease.** *Brain Research*, 1988, 454: 275-281.
10. Araujo DM, Lapchak PA, Robitaille Y, Gauthier S, Quirion R; **Differential alteration of various cholinergic markers in cortical and subcortical regions of human brain in Alzheimer's disease.** *J Neurochem*, 1988, 50:1914–1923
11. Barnes CA, Meltzer J, Houston F, Orr G, McGann K, Wenk GL; **Chronic treatment of old rats with donepezil or galantamine: effects on memory, hippocampal plasticity and nicotinic receptors;** *Neuroscience* 2000, 99: 17-23.
12. Barros DM, Mello e Souza T, de Souza MM, Choi H, DeDavid e Silva T, Lenz G, Medina JH, Izquierdo I; **LY294002, an inhibitor of phosphoinositide 3-kinase given into rat hippocampus impairs acquisition, consolidation and retrieval of**

- memory for one-trial step-down inhibitory avoidance.** Behavior Pharmacology, 2001.
13. Bartolini L, Casamenti F, Pepeu G; **Aniracetam restores object recognition impaired by age, scopolamine, and nucleus basalis lesions,** Pharmacological Biochemistry Behavioral 1996 Feb;53:277-83
  14. Bartus RT, Dean RL III, Beer B, Lippa AS; **The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction.** Science 1982, 217:408–414
  15. Bartus RT, Dean RL, Beer B, Lippa AS; **The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction,** Science, 1982, 217: 408-414.
  16. Bazalakova MH, Wright J, Schneble EJ, McDonald MP, Heilman CJ, Levey AI, Blakely RD; **Deficits in acetylcholine homeostasis, receptors and behaviors in choline transporter heterozygous mice.** Genes Brain Behav. 2007 Jul;6(5):411-24.
  17. Bear MF, Connors BW, Paradiso MA; **Neurociencias: desvendando o sistema nervoso;** coord. trad. Jorge Alberto Quillfeldt – 2 ed. – Porto Alegre: Artmed, 2002, 517: 739-773.
  18. Bensadoun JC, Brooks SP, Dunnett SB; **Free operant and discrete trial performance of mice in the nine-hole box apparatus: validation using amphetamine and scopolamine.** Psychopharmacology, 2004 Jul;174(3):396-405
  19. Brandon EP, Mellott T, Pizzo DP, Coufal N, D'Amour KA, Gobeske K, Lortie M, López-Coviella I, Berse B, Thal LJ, Gage FH, Blusztajn JK; **Choline Transporter 1 Maintains Cholinergic Function In Choline Acetyltransferase Haploinsufficiency;** J Neurosci. 2004 Jun 16;24(24):5459-66.
  20. Brandon EP, Lin W, D'Amour KA, Pizzo DP, Dominguez B, Sugiura Y, Thode S, Ko CP, Thal LJ, Gage FH, Lee KF; **Aberrant patterning of neuromuscular synapses in choline acetyltransferase-deficient mice.** 2003; Journal Neuroscience 23: 539-549.
  21. Brown DA; **Acetylcholine;** British Journal of Farmacology, 2006; 147 Suppl 1:S120-6
  22. Beigneux AP, Kosinski C, Gavino B, Horton JD, Skarnes WC, Young SG; **ATP-citrate lyase deficiency in the mouse.** Journal of Biological Chemistry 2004, 279: 9557-9564.
  23. Birks RI; **The effects of a cardiac glycoside on subcellular structures within nerve cells and their processes in sympathetic ganglia and skeletal muscle;** Can J Biochem Physiol. 1962 Feb; 40:303-15.
  24. Bliss T.V.P., G. L. Collingridge, S. Laroche; **ZAP and ZIP, a Story to Forget;** Neuroscience, 2006 : 313.

25. Buckner RL; **Contributions of specific prefrontal brain areas to long-term memory.** *Psychonom. Bull. Review.* 1996, 3:149–58
26. Bullock R; **New drugs for Alzheimer's disease and other dementias.** *Br JPsychiatry.* 2002; 180: 135-139
27. Carli M, Luschi R; Samani R; **Dose-related impairment of spatial learning by intrahippocampal scopolamine antagonism by ondansetron, a 5-HTreceptor antagonist.** *Behavioral Brain Research,* 1997; 82:185-194
28. Carlson NR; **Fisiologia do comportamento,** Ed. Manole Ltda. Barueri SP, Brasil, 2002.
29. Clayton NS, Dickinson AD, **What, where and when: evidence for episodic-like memory during cache recovery by scrub jays.** *Nature* 1998; 395:272–4.
30. Clayton NS, Dickinson AD. **What, where and when: evidence for episodic-like memory during cache recovery by scrub jays.** *Nature,* 1998; 395:272–4.
31. Cooper JR, Bloom FE, e Roth TH; **The Biochemical basis of Neuropharmacology,** 7<sup>a</sup> ed. New York: Oxford University Press, 1996.
32. Dal-Bianco P, Maly J, Wober C, Lind C, Koch G, Hufgard J, Marschall I, Mraz M, Deecke L; **Galanthamine treatment in Alzheimer's disease.** *J. neural Transm.* 1991, 33: 59-63.
33. DeKosky ST, Scheff SW; **Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity.** *Ann. Neurol.* 1990, 27: 457-464.
34. Dringenberg HC, Hamze B, Wilson A, Speechley W, Kuo MC; **Heterosynaptic facilitation of in vivo thalamocortical long-term potentiation in the adult rat visual cortex by acetylcholine.** *Cereb Cortex;* 2007; 17: 839-848.
35. Dudai Y, **Reconsolidation: the advantage of being refocused;** *Curr. Opin. Neurobiol.* 2006, 16 174–178.
36. Dunnett SB, Fibiger HC; **Role of forebrain cholinergic systems in learning and memory: relevance to the cognitive deficits of aging and Alzheimer's dementia;** *Prog. Brain Res.* 1993; 98: 413-420.
37. Farr SA, Flood JF, Morley JE; **The effect of cholinergic, GABAergic, serotonergic and glutamatergic receptor modulation on postrial memory processing in the hippocampus.** *Neurobiology of Learning Memory,* 2000; 73: 150-167
38. Farr SA, Uezu K, Flood JF, Morley JE; **Seoti-hippocampal drug interactions in post-trial memory processing.** *Brain Research,* 1999; 847: 221-230



39. Fernstrom JD; **Effects of Precursors on Brain Neurotransmitter Synthesis and Brain Functions.** *Diabetology*, 1981, 20: 281-289.
40. Ferguson SM, Bazalakova M, Savchenko V, Tapia JC, Wright J, Blakely; **Lethal impairment of cholinergic neurotransmission in hemicholinium-3-sensitive choline transporter knockout mice.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004; 101:8762-8767.
41. Forwood SE, Winters BD, Bussey TJ; **Hippocampal lesions that abolish spatial maze performance spare object recognition memory at delays of up to 48 hours.** *Hippocampus*; 2005; 15: 347-355.
42. Fulton B, Benfield P; **Galanthamine.** *Drugs Aging* 1996, 9:60–65
43. Gainetdinov RR, Bohn LM, Sotnikova TD, Cyr M, Laakso A, Macrae AD, Torres GE, Kyeong-Man K, Lefkowitz RJ, Caron NG, Premont RT; **Dopaminergic Supersensitivity in G Protein-Coupled Receptor Kinase 6-Deficient Mice;** *Neuron*, 2003, 38: 291–303
44. Geerts H, Guillaumat PO, Granthamc C, Bodec W, Anciaux K, Sachak S; **Brain levels and acetylcholinesterase inhibition with galantamine and donepezil in rats, mice, and rabbits;** *Brain research*, 2005, :186 – 193
45. Gioanni Y, Rougeot C, Clarke PB, Lepouse C, Thierry AM, Vidal C; **Nicotinic receptors in the rat prefrontal cortex: increase in glutamate release and facilitation of mediodorsal thalamo-cortical transmission.** *Eur J Neurosci*; 1999; 11: 18-30.
46. Giacobini E; **Cholinergic foundations of Alzheimer's disease therapy.** *J. Physiol.*, 1998, Paris 92: 283-287
47. Gossell-Williams M, Simon O, Young L, West M; **Choline supplementation facilitates short-term memory consolidation into intermediate long-term memory of young Sprague-Dawley;** rats. *West Indian Med J.* 2006 Jan;55:4-8
48. Greenblatta HM, Krygera G, Lewisb T, Silmanc I, Sussmana JL; **Structure of acetylcholinesterase complexed with (3)-galanthamine at 2.3 Å resolution;** *FEBS Lettv*, 1999
49. Griffiths DP, Clayton NS; **Testing episodic memory in animals: A new approach.** *Physiology & Behavior*, 2001, 73: 755– 762
50. Griffiths DP, Dickinson A, Clayton NS. **Declarative and episodic memory: what can animals remember about their past;** *Trends Cognitive Science* 1999; 3:74– 80.
51. Gustav A, Steinbach JH; **Galantamine Activates Muscle-Type Nicotinic Acetylcholine Receptors without Binding to the Acetylcholine-Binding Site;** *The Journal of Neuroscience*, February 23, 2005.

52. Guzowski JF, McNaughton BL, Barnes CA, Worley PF; **Environment-specific expression of the immediate-early gene Arc in hippocampal neuronal ensembles** Nature Neuroscience. 1999, 2: 1120-1124.
53. Hammond RS; Tull LE; Stackman RW; **On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory.** Science 2004; 26-34.
54. Hasselmo ME, Giocomo LM; **Cholinergic modulation of cortical function.** J Mol Neurosci; 2006; 30: 133-135.
55. Hoffman BB, Taylor P, Goodman and Gilman's; **The Pharmacological Basis of Therapeutics.** McGraw-Hill, New York; 2001.
56. Huston AE, Aggleton JP; **The effects of cholinergic drugs upon recognition memory in rats;** The Quarterly Journal of experimental psychology 1987; 39(4):297-314.
57. Indian J; **Neural mechanism of rapid eye movement sleep generation with reference to REM-OFF neurons in locus coeruleus** Medical Research, June 2007, 125: 721-739.
58. Izquierdo I, Medina JH; **Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures;** Neurobiology of Learning and Memory; 1997 Nov; 68(3):285-316.
59. Izquierdo I, Medina JH, Izquierdo LA, Barros DM, de Souza MM, Mello e Souza T.; **Short- and long-term memory are differentially regulated by monoaminergic systems in the rat brain.** Neurobiological Learning Memory. 1998; 69:219-24.
60. Izquierdo I, Jorge H. Medina b, Monica R.M. Vianna a, Luciana A. Izquierdo a, Daniela M. Barros; **Separate mechanisms for short- and long-term memory,** Behavioural Brain Research 1999, 103: 1–11.
61. Izquierdo I, McGaugh JL; **Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation;** 2000; 11(7-8):517-34.
62. Izquierdo LA, Barros DM, Medina JH, Izquierdo I.; **Novelty enhances retrieval of one-trial avoidance learning in rats 1 or 31 days after training unless the hippocampus is inactivated by different receptor antagonists and enzyme inhibitors;** Behav Brain Res. 2000 Dec 20;117.
63. Izquierdo, I; **Memória;** Artmed editora SA; 2002; Revisão; p. 9-57.
64. Izquierdo LA, Barros DM, Vianna MRM, Coitinho A, David e Silva T, Choi H, Moletta B, Medina JH, Izquierdo I; **Molecular Pharmacological Dissection of Short- and Long-Term Memory;** Cellular and Molecular Neurobiology, Review; 2002, 22-34

65. Izquierdo I; Lia RM; Bevilaqua; Janine IR; Bonini JS; Medina JH; **Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation** neuroscience, 2006, 9: 29-36.
66. James W; **Origin of Right-handedness**; Science. 1890 Nov 14;16(406):275.
67. Jin-Hee Han, Steven AK, Adelaide PY, Christy JC, Matynia A, Brown RA, Neve RL, Guzowski JF, Silva AJ, Josselyn SA; **Neuronal Competition and Selection During Memory formation** Science 2007, 316: 457-464
68. Jones DN, Higgins GA; Effect of scopolamine on visual attention in rats. Psychopharmacology (Berl.) 1995,120:142–149
69. Kapur N; **Transient epileptic amnesia--a clinical update and a reformulation.** J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1993 Nov;56(11):1184-90.
70. Kapur N, Brooks DJ; **Temporally-specific retrograde amnesia in two cases of discrete bilateral hippocampal pathology**; Hippocampus. 1999;9(3):247-54.
71. Linstow Roloff E V, Harbaran D, Micheau J, Platt B, Riedel G; **Dissociation of cholinergic function in spatial and procedural learning in rats** Neuroscience. 2007; 146:875-89.
72. London ED, Ball MJ, Waller SB; **Nicotinic binding sites in cerebral cortex and hippocampus in Alzheimer's dementia.** Neurochem Res 1989, 14:745–750.
73. Malouf R, Birks J; **Donepezil for vascular cognitive impairment**; ACP J Club. 2004; 141(2):39
74. Mann DMA; **Pathological correlates of dementia in Alzheimer's disease.** Neurobiol. Aging 1994, 15: 357-360.
75. Manns JR, Hopkins RO, Reed JM, Kitchener EG, Squire LR; **Recognition memory and the human hippocampus.** Neuron 2003; 37:1–20.
76. McGaughy J, Sarter TM; **Behavioral vigilance following infusions of 192 IgG-saporin into the basal forebrain: selectivity of the behavioral impairment and relation to cortical AChE-positive fiber density.** Behavior Neuroscience, 1996; 110, 247–265.
77. McGaugh JL, **Memory, a Century of Consolidation**, Science, 2000, 287: 248-253.
78. McGeer PL, McGeer EG, Suzuki J, Dolman CE, Nagai T; **Aging, Alzheimer's disease and the cholinergic system of the basal forebrain.** Neurology, 1984, 34: 741-745.

79. Misgeld T, Burgess RW, Lewis RM, Cunningham JM, Lichtman JW, Sanes JR; **Roles of neurotransmitter in synapse formation: development of neuromuscular junctions lacking choline acetyltransferase**; *Neuron*. 2002 Nov 14; 36(4):635-48
80. Mishkin M, Phillips RR; **Brain Circuits and Functions of the Mind: Essays in Honor of Roger W. Sperry**, ed. Trevarthen, C. (Cambridge Univ. Press, London), 1990 : 196–210.
81. Milner B, Squire LR, Kandel ER; Cognitive Neuroscience and the study of memory. *Neuron* 20, 445-468.
82. Murai T, Okuda S, Tanaka T, Ohta H; **Characteristics of object location memory in mice: Behavioral and pharmacological studies**; *Physiology and Behavior*, 2007,116-124.
83. Muir JL, Bussey TJ, Everitt BJ, Robbins TW; **Dissociable effects of AMPA-induced lesions of the vertical limb diagonal band of Broca on performance of the 5-choice serial reaction time task and on acquisition of a conditional visual discrimination**; *Behav Brain Res*. 1996 Dec;82(1):31-44.
84. Murray EA, Mishkin M; **Severe tactual as well as visual memory deficits follow combined removal of the amygdala and hippocampus in monkeys**; *Journal Neuroscience* 1984, 4: 2565–2580.
85. Nader K, Schafe GE, Le Doux JE, **Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval**. *Nature* 2000, 406: 722–726.
86. Nguyen ML, Cox GD and Parsons SM; **Kinetic Parameters for the Vesicular Acetylcholine Transporter: Two protons are Exchange for one Acetylcholine**. *Biochemistry*, 1998, 37: 13400-13410.
87. Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM; **Triple-Transgenic Model of Alzheimer’s Disease with Plaques and Tangles: Intracellular A<sub>β</sub> and Synaptic Dysfunction**; *Neuron*, Vol. 39, 409–421, July 31, 2003.
88. Oh MM, Wu WW, Power JM, Disterhoft JF; **Galantamine increases excitability of CA1 hippocampal pyramidal neurons**. *Neuroscience*. 2006,137:113-23.
89. Otto T, Eichenbaum H; **Complementary roles of the orbital prefrontal cortex and the perirhinal-entorhinal cortices in an odor-guided delayed-nonmatching-to-sample task**; *Behavioral Neuroscience*, 1992, 106: 762–775.
90. Pastalkova E, Pastalkova E, Serrano P, Pinkhasova D, Wallace E, Fenton AA, Sacktor TC; **Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP**; 2006, 25;313(5790):1141-4 .
91. Penetar DM, McDonough JH Jr; **Effects of cholinergic drugs on delayed match-to-sample performance of rhesus monkeys**; *Pharmacol Biochem Behav*. 1983

Dec;19(6):963-7.

92. Pereira EF, Hilmas C, Santos MD, Alkondon M, Maelicke A, Albuquerque EX; **Unconventional ligands and modulators of nicotinic receptors.** *Journal Neurobiology* 2002, 53:479–500.
93. Pitsikas N, Rigamonti AE, Cella SG, Locatelli V, Sala M, Muller EE; **Effects of molsidomine on scopolamine-induced amnesia and hypermotility in the rat.** *Eur. J. Pharmacology*; 2001, 426, 193–200
94. Prado MAM, Ricardo AMR, Prado VF, de Mello MC, Gómez MV, de Mello FG; **Regulation of acetylcholine synthesis and storage;** *Neurochemistry*, 2002 :291-299.
95. Prado VF, Martins-Silva C, de Castro BM, Lima RF, Barros DM, Amaral E, Ramsey AJ, Sotnikova TD, Ramirez MR, Kim HG, Rossato JI, Koenen J, Quan H, Cota VR, Moraes MF, Gomez MV, Guatimosim C, Wetsel WC, Kushmerick C, Pereira GS, Gainetdinov RR, Izquierdo I, Caron MG, Prado MA (2006) Mice deficient for the vesicular acetylcholine transporter are myasthenic and have deficits in object and social recognition. *Neuron*; 2006; 51: 601-612.
96. Proskurnina NF; Yakovleva AP; **Alkaloids of Galanthus woronowi. II. Isolation of new alkaloid.** *J. gen. Chem.* 1952, 22: 1899-1902.
97. Raskind MA, Peskind ER, Wessel T, Yuan W; **Galantamine in AD: A 6-month randomized, placebo-controlled trial with a 6-month extension. The Galantamine USA-1 Study Group.** *Neurology* 2000, 54:2261–2268.
98. Raskind MA, Peskind ER, Wessel T; **Galantamine in AD: A six month randomized placebo-controlled trial with a six month extension,** *Neurology.* 2000; 54: 2261-2268.
99. Repa JC, Muller J, Apergis J, Desrochers TM, Zhou Y, LeDoux JE; **Two different lateral amygdala cell populations contribute to the initiation and storage of memory;** *Nature Neuroscience*, 2001, 4(7):724-31.
100. Rinne JO, Paljarvi L, Rinne K; **Neuronal size and density in the nucleus basalis of Meynert in Alzheimer's disease;** *Journal of neuronal Science*, 1987, 79: 67-76.
101. Robbins TW, Semple J, Kumar R, Truman MI, Shorter J, Ferraro A, Fox B, McKay G, Matthews K; **Effects of scopolamine on delayed-matching-to-sample and paired associates tests of visual memory and learning in human subjects: comparison with diazepam and implications for dementia;** *Psychopharmacology (Berl).* 1997 Nov; 134(1):95-106.
102. Rumpel S, LeDoux J, Zador A, Malinow R; **Postsynaptic receptor trafficking underlying a form of associative learning.** *Science*, 2005, 308(5718):83-8.

103. Rumpel S, LeDoux J, Zador A, Malinow R; **Postsynaptic receptor trafficking underlying a form of associative learning**; *Science*, 2005, 308(5718):83-8.
104. Sara SJ, **Retrieval and reconsolidation: Toward a neurobiology of remembering**. *Learning Memory*, 2000, 7: 73–84.
105. Sarter M, Bruno JP; **Cognitive functions of cortical acetylcholine: toward a unifying hypothesis**. *Brain Res. Brain Res. Review*, 1997, 23:28–46.
106. Samsonovich AV, Ascoli GA; **A simple neural network model of the hippocampus suggesting its pathfinding role in episodic memory retrieval**; *Learning Memory* 2005 12: 193-208
107. Sarter M, Givens B, Bruno JP; **The cognitive neuroscience of sustained attention: where top-down meets bottom-up**. *Brain Research Review* 2001, 35:146–160.
108. Sarter M, Parikh V; **Choline transporters, cholinergic transmission and cognition**. 2005; *Nature Reviews Neuroscience* 6: 48-56.
109. Schacter D; **Implicit knowledge: new perspectives on unconscious processes**, 1994, *Int Rev Neurobiol.* 1994;37:271-84.
110. Snape MF, Misra A, Murray TK, De Souza RJ, Williams JL, Cross AJ, Green AR; **A comparative study in rats of the in vitro and in vivo pharmacology of the acetylcholinesterase inhibitors tacrine, donepezil and NXX-066**. *Neuropharmacology* 1998; 38, 181-193.
111. Squire LR, Alvarez P; **Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective**; *Curr Opin Neurobiol.* 1995 Apr;5(2):169-77. Review.
112. Stip E; Sepehry AA; Chouinard S; **Add-on therapy with acetylcholinesterase inhibitors for memory dysfunction in schizophrenia: a systematic quantitative review**, part 2. *Clinical Neuropharmacology*, 2007 Jul-Aug;30(4) : 218-29.
113. Suzuki WA, Zola-Morgan S, Squire LR, Amaral DG; **Lesions of the perirhinal and parahippocampal cortices in the monkey produce long-lasting memory impairment in the visual and tactual modalities**; *Journal of Neuroscience*, 1993, 13: 2430–2451.
114. Sweeney JE, Puttfachken PS, Coyle JT; **Galantamine, an acetylcholinesterase inhibitor: a time course of the effects on performance and neurochemical parameters in mice**. *Pharmac. Biochem. Behav.* 1989, 34, 603-605.
115. Tang Y, Mishkin M, Aigner TG; **Effects of muscarinic blockade in perirhinal cortex during visual recognition** *PNAS*, November 1997, 94: 12667–12669.
116. Tariot PN, Solomon PR, Morris JC, Kershaw P, Lilienfeld S, Ding C; **A 5-month, randomized, placebo-controlled trial of galantamine in AD. The Galantamine**

- USA-10 Study Group.** *Neurology*, 2000, 54:2269–2276.
117. Thakkar M, Portas C, McCarley RW; **Chronic low- amplitude electrical stimulation of the laterodorsal tegmental nucleus of freely moving cats increases REM sleep.** *Brain Res* 1996; 723 : 223-7.
  118. Thomsen T, Bickel U, Fischer JP, Kewitz H; **Galanthamine hydrobromide in a long-term treatment of Alzheimer's disease.** *Dementia* 1, 1990; 46-51.
  119. Tulving E, Markowitsch HJ. **Episodic and declarative memory: role of the hippocampus.** *Hippocampus* 1998; 8:198– 204.
  120. Tulving E.; **Episodic and semantic memory.** In: Tulving E, Donaldson W, editors. *Organisation of memory.* New York: Academic Press, 1972. :381– 403.
  121. Tulving E; **Elements of episodic memory.** Oxford: Clarendon Press, 1983.
  122. Usdin TB, Eiden LE, Bonner TI and Erickson JD; **Molecular biology of the vesicular ACh transporter.** *Trends Neuroscience*, 1995, 18: 218-224.
  123. Valtorta F, Fesce R, Grohovaz F, Haimann C, Hurlbut WP, Iezzi N, Torri Tarelli F, Villa A, Ceccarelli B; **Neurotransmitter release and synaptic vesicle recycling.** *Neuroscience.* 1990; 35:477-89. Review.
  124. Vannucchi MG, Scali C, Kopf SR, Pepeu G, Casamenti F; **Selective muscarinic antagonists differentially affect in vivo acetylcholine release and memory performances of young and aged rats;** *Neuroscience.* 1997; 79(3):837-46.
  125. Vianna MRM, Izquierdo LA, Barros DM, Medina JH, Izquierdo I; **Intrahippocampal infusion of an inhibitor of protein kinase A separates short-from long-term memory;** *Behav Pharmacol* 1999, 10(2):223-7.
  126. Vogels OJM, Broere CAJ, Ter Laak HJ, ten Donkelaar HJ, Nieuwenhuys R, Schulte BP; **Cell loss and shrinkage in the nucleus basalis Meynert complex in Alzheimer's disease.** *Neurobiol. Aging;* 1990; 11: 3-13.
  127. Warburton EC, Koder T, Cho K, Massey PV, Duguid G, Barker GR, Aggleton JP, Bashir ZI, Brown MW; **Cholinergic neurotransmission is essential for perirhinal cortical plasticity and recognition memory.** *Neuron*, 2003, 38: 987–996.
  128. Webster HH, Jones BE. **Neurotoxic lesions of the dorsolateral pontomesencephalic tegmentum-cholinergic cell area in the cat II. Effects upon sleep-waking states.** *Brain Research*, 1988; 458 : 285-302.
  129. Weible AP, Oh MM, Lee G, Disterhoft JF; **Galantamine facilitates acquisition of hippocampus-dependent trace eyeblink conditioning in aged rabbits.** *Learning and Memory*, 2004, 11:108–115.

130. Wezenberg E, Verkes RJ, Sabbe BG, Ruigt GS, Hulstijn W, **Modulation of memory and visuospatial processes by biperiden and rivastigmine in elderly healthy subjects**, *Psychopharmacology (Berl)*. 2005 Sep;181:582-94.
131. Whitehouse PJ, Price DL, Clark AW, Coyle JT, DeLong MR; **Alzheimer disease: evidence for selective loss of cholinergic neurons in the nucleus basalis**. *Ann Neurology* 1981, 10:122–126.
132. Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF, **Learning induces long-term potentiation in the hippocampus**; *Science* 2006, 313: 1093.
133. Wilcock GK, Scott M, Pearsall T, Neubauer K, Boyle M, Razay G; **Galanthamine and the treatment of Alzheimer's disease**. *Int. J. geriatr. Psychiat.* 1993; 8, 781-782.
134. Wilkinson D; **Clinical experience with Donepezil**, UK. *Journal of neural Transmission*, 1998, 54: 311-315.
135. Wilson MA, McNaughton BL; **Dynamics of the hippocampal ensemble code for space**, *Science* 1993, 261- 1055.
136. Winters BD, Bussey TJ (2005) Transient inactivation of perirhinal cortex disrupts encoding, retrieval, and consolidation of object recognition memory. *J Neurosci* 25: 52-61.
137. Wolf, NJ; **Global and serial neurons form a hierarchically arranged interface proposed to underlie memory and cognition**. *Neuroscience*, 1996,74, :625–651.
138. Woodruff-Pak DS, Vogel RW, Wenk GL; **Galantamine: Effect on nicotinic receptor binding, acetylcholinesterase inhibition, and learning**. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 98:2089–2094.
139. Young JW, Crawford N, Kelly JS, Kerr LE, Marston HM, Spratt C, Finlayson K, Sharkey J; **Impaired attention is central to the cognitive deficits observed in alpha 7 deficient mice**; *European Neuropsychopharmacology* 2006.
140. Yuede CM, Dong H, Csernansky JG **Anti-dementia drugs and hippocampal-dependent memory in rodents**. *Behavioral Pharmacology*. 2007 Sep; 18 : 347-63.





## 8- ANEXO

*Deficient storage of acetylcholine in synaptic vesicles compromises procedural and declarative learning in mice.*

**Short title: Cholinergic tone and learning**

**Bráulio M. de Castro<sup>1,\*</sup>; Grace S. Pereira<sup>2,\*</sup>; Vinicius Magalhães<sup>1,\*</sup>; Janine I. Rossato<sup>3</sup>; Xavier de Jaeger<sup>1</sup>; Cristina Martins-Silva<sup>1</sup>; Bruno Leles<sup>1</sup>; Patricia Lima<sup>1</sup>; Marcus V. Gomez<sup>1</sup>; Raul Gainetdinov<sup>4</sup>; Marc G. Caron<sup>4</sup>; Ivan Izquierdo<sup>3</sup>; Martin Cammarota<sup>3</sup>; Vania F. Prado<sup>5</sup>; Marco A.M. Prado<sup>1,#</sup>.**

<sup>1</sup>Program in Molecular Pharmacology, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG; <sup>2</sup>Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade Federal de Minas Gerais; <sup>3</sup>Centro de Memória, Instituto de Pesquisas Biomedicas, Pontificia Universidade Católica de Rio Grande do Sul (PUC-RS), Brazil; <sup>4</sup>Departments of Cell Biology, Duke University Medical Center, Durham, NC, USA <sup>5</sup>Departamento de Bioquímica-Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais.

\*These authors contributed equally for this work

\*To whom correspondence should be addressed:

Marco Antonio Maximo Prado, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antonio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG, 30270-910, Brasil Tel: 55 31 34092718; Fax: 55 31 34092695 E-mail [mprado@icb.ufmg.br](mailto:mprado@icb.ufmg.br)

**Number of Figures: 6**

**Number of supplemental figures: 1**

**Number of Pages: 30**

**Number of words: Abstract- 246 / Introduction-498/ Discussion-1480**

**Key words cholinergic tone, synaptic vesicle, acetylcholine, mutant mice**

## **Abstract**

Storage of acetylcholine in synaptic vesicles plays a key role in maintaining cholinergic function. To investigate the role of cholinergic tone in physiological functions we have previously developed mice with a targeted mutation in the vesicular acetylcholine transporter (VACHT) gene. Here we tested whether procedural and non-procedural learning and memory are affected in these mutants. VACHT immunoreactivity in nerve terminals is reduced in heterozygous and homozygous VACHT knockdown (KD) mice respectively by 40 and 70% compared to wild-type mice. Motor skill learning assessed using the rotarod revealed that VACHT KD mice take longer periods of training to reach maximum performance, but once they learned they presented similar motor performance as wild-type mice. Interestingly, motor skill memory consolidation and retrieval were unaffected in these mutant mice with reduced cholinergic tone. In non-procedural tasks we found that VACHT KD mice present a deficit in the temporal order version of the object recognition task, but not in spatial or working memory. The recency memory deficit in object recognition observed in VACHT KD mice could be readily reversed by galantamine and donepezil, cholinesterase inhibitors used to treat cognitive symptoms in Alzheimer's disease. However, cholinesterase inhibitors were effective to reverse this cognitive phenotype only when injected prior to acquisition of the memory trace, and showed no effect when injected just before retrieval. These experiments established a key role for cholinergic tone to facilitate learning in procedural and non-procedural tasks. We suggest that cholinergic tone can facilitate distinct forms of learning.

## Introduction

Maintenance of cholinergic tone is directly linked to the capacity of nerve endings to effectively synthesize and release ACh (Ribeiro et al., 2006). Synthesis of ACh depends on the activity of a high affinity choline transporter (CHT1) that is necessary to supply choline for ACh synthesis. Choline provided by CHT1 is used to generate ACh in the cytosol, in a step catalyzed by the enzyme choline acetyl transferase (ChAT) (Dobransky and Rylett, 2005). ChAT is likely to be in kinetic excess, therefore moderate changes on its activity or expression may not affect ACh output (Brandon et al., 2004). The final key player in presynaptic cholinergic nerve-endings is the vesicular acetylcholine transporter (VACHT), a protein that takes up cytosolic ACh into synaptic vesicles providing the means for exocytotic release of neurotransmitter in response to calcium influx (Parsons, 2000;Edwards, 2007).

Genetic targeting of components of neurotransmitter systems provides an alternative and complementary approach to lesions and pharmacological tools used to investigate neurochemical circuits and their functions. Mice with deletion of the genes for ChAT (Brandon et al., 2003;Misgeld et al., 2002), CHT1 (Ferguson et al., 2004) have been generated, however homozygous null mutants for these genes do not survive after birth due to inability to breath. Heterozygous deletion mutants for ChAT (Brandon et al., 2004) and CHT1 (Bazalakova et al., 2007) have been recently used to investigate cognitive functions, however these mutant mice have only mild behavioral alterations.

In contrast to ChAT and CHT1, it appears that VACHT activity seems to play a rate-limiting role in ACh release (Prado et al., 2006). As might be expected, VACHT KO mice do not survive (Prado et al., unpublished), however mice with reduced levels of this transporter (VACHT KD mice) are viable and were instrumental to demonstrate a role for the transporter “in vivo”. VACHT controls the vesicular concentration of ACh that is critical for maintaining prolonged release of neurotransmitter. In addition, behavioral investigation in these mice unveiled altered motor learning and performance as well as disruption in object and social recognition memory (Prado et al., 2006).

Acetylcholine has been suggested to facilitate learning by distinct cellular and system mechanisms (Hasselmo, 2006) and both declarative and procedural memory may be affected by neurotoxins that kill cholinergic neurons (Winters and Bussey, 2005a; Conner et al., 2003). Here we investigated whether efficient synaptic vesicle storage and release is required for these specific types of memory encoding. Motor skill in the rotarod was used to investigate procedural memory. We established that reduced cholinergic tone in VACHT KD mice alters the rate of motor skill learning, but not procedural memory consolidation or performance maintenance. Declarative memory was investigated with the temporal order version of the object recognition task. We also found that recency memory for objects is also affected in these mutants, with a clear deficit in encoding, but not retrieval of recognition memory. These data provide compelling evidence that efficient storage of ACh in synaptic vesicles is required to maintain cholinergic tone necessary for encoding recognition and motor memory in mice.

## **Material and Methods**

### **Animals.**

VACHT mutant mice were previously described (Prado et al., 2006). All VACHT knock-down mice used in this study were males that have been backcrossed to C57/Bl6 (N3). Littermate wild-type mice of the same sex were used as controls for all experiments. Animals were housed in groups of three to five per cage in a temperature-controlled room with a 12:12 light-dark cycles. Food and water were provided ad libitum. Mouse colonies were maintained at the Federal University of Minas Gerais, Brazil in accordance with NIH guidelines for the care and use of animals. Experiments were performed accordingly to approved animal protocols from the Institutional Animal Care and Use Committees at the Federal University of Minas Gerais.

### **Immunofluorescence**

Adult VACHT KD and control mice were anesthetized with ketamine/xilazine (70/10 mg/kg) i.p. and transcardially perfused with ice-cold PBS pH 7.4 for 10 minutes, followed by ice-cold 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS for 10 minutes. Perfused brains

and spinal cords were immediately postfixed in 4% PFA in PBS overnight at 4°C. Following cryoprotection in 4% PFA with 10% sucrose, tissues were rapidly frozen in isopentane over dry ice and kept at -80 °C. Serial sections (40 µm thick) were cut on a Cryostat (Micron) and immersed in ice cold PBS. Sections from control and test mice were processed simultaneously for all experiments.

Brain and spinal cord slices were permeabilized in 1.2% Triton/PBS and rinsed in PBS. Tissues were blocked for 1 hour in 10% normal goat serum/PBS and immunostained with primary antibodies VAcHT (rabbit polyclonal, 1:250, Sigma Chem. Co., São Paulo, Brazil), CHT1 (rabbit polyclonal 1:250, kindly provided by R. Jane Rylett, University of Western Ontario, London, Canada) in incubation buffer (2% NGS; 0.2% Triton; PBS) for 48 hours at 4°C. After washing 3 times with PBS for 20 minutes each, tissues were incubated with Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit (1:500, Molecular Probes) in incubation buffer for 1 hour. Slices were rinsed again and incubated with DAPI (1:1000) for 10 minutes at RT. Tissue sections were then mounted and coverslipped using ProLong® Gold antifade reagent (Invitrogen, SP, Brazil). Images were acquired using an Axiovert 200M using the ApoTome system to obtain optical sections of the tissue. Objectives used were 20x dry, 40X water immersion (1.2 NA) and a 63x oil immersion (1.4 NA). Fluorescence intensity analyses were carried out with the NIH image tool (Image J). Images from immunostaining were obtained in grayscale and a threshold was applied based on the mean value of threshold automatically obtained using Image J for each image. The total fluorescence intensity in the field of view was detected automatically by the software and normalized for the fluorescence intensity of a sequential Cryostat section stained with anti-CHT1 antibody. The normalized fluorescence was divided by the area of the image. ANOVA with Bonferroni post-hoc was used to determine statistical significance.

### **Behavioral Procedures**

All experiments were conducted during the light phase of the cycle. All efforts were made to minimize any suffering and the number of animals used.

#### *Temporal order task.*

All animals were given a single 10 min habituation session, with no objects in the open-field arena (50cm x 30cm). Twenty four hours later, in the first sample phase (S1), the animals were allowed to explore two copies of an identical object for a total of 10 min. In the second sample phase (S2), with a delay of 1h, other two copies of an identical object were used and animals were let to explore these objects for 10min. One hour after S2, in the test session (T), animals were allowed to explore, during 10 min, one object identical from S1 and another identical from S2. If temporal order memory is intact, the subjects will spend more time exploring the object from S1 compared with the object from S2. The results are expressed as percentage of exploration for each object. Comparisons among groups were performed using one-way ANOVA with Bonferroni's post-hoc. Comparisons among the percentage of exploration in each object were performed using Student's two-tailed t-test.

#### *Morris water maze (MWM)*

The water maze was a black circular pool (120-cm in diameter) conceptually divided in four equal imaginary quadrants for the purpose of data analysis. The water was opaque and the temperature was 21–23°C. One centimeter beneath the surface of the water and hidden from the mouse's view was a circular platform (9 cm in diameter), with a rough surface, which allowed mice to climb onto it easily. The swimming path of the animals was recorded using a video camera mounted above the center of the pool and analyzed using a in house video tracking and analysis system. The water maze was located in a well-lit white room with several posters and other distal visual stimuli hanging on the walls to provide spatial cues. A curtain separated the water maze room from the room where the computer was set up and where the animals were temporarily housed during the behavioral sessions. Training in the hidden platform (spatial) version of the MWM was carried out during five consecutive days as previously described (Rossato et al., 2006). On each day, mice received six consecutive training trials during which the hidden platform was kept in a constant location. A different starting location was used on each trial, which consisted of a swim followed by a 30-sec platform sit. Any mouse that did not find the platform within 60 sec was guided to it by the experimenter. The intertrial interval (ITI) was 30 sec. During the ITI, mice were carefully dried with a towel by the experimenter. Memory retention was

evaluated in a 60-sec probe trial carried out in the absence of the escape platform 24 h after the last training session. Student's *t*-test was used to analyze the data.

### *Y maze*

Immediate working memory performance was assessed by recording spontaneous alternation behavior during a single session in a Y-maze (Hughes, 2004; Pych et al., 2006). Each mouse, new to the maze (30 cm long by 6 cm wide by 20 cm high), was placed at the end of one arm and allowed to move freely through the maze during an 8-min session. The series of arm entries was recorded visually. Alternation was defined if mice entered different arms three times in succession from the results of consecutive arm entering. The number of overlapping entrance sequences (e.g., ABC, BCA) was defined as the number of alternations. The effect was calculated as percentage alternation according to the following formula:  $[\text{total alternation}/(\text{total arms entered} - 2)] * 100$ .

### *One trial step-down inhibitory avoidance*

Mice were trained in a one-trial, step-down inhibitory avoidance task, a widely used model of fear-motivated, hippocampal-dependent learning, as previously described (Bevilaqua et al., 2005). The training apparatus was a 30 X 25 X 25-cm Plexiglas box with a 2.5 -cm-high, 8-cm-wide, and 25-cm-long platform on the left end of a series of bronze bars that made up the floor of the box. For training, animals were gently placed on the platform facing the left rear corner of the training box. When they stepped down and placed their four paws on the grid, they received a 2-sec, 0.2-mA scrambled footshock. Memory retention was evaluated in a non-reinforced test session carried out at 180 min (to analyze short-term memory) or 24 h after the training (to evaluate long-term memory). Data were analyzed using the Mann-Whitney U-test.

### *Locomotor activity.*

Locomotor activity was measured using an activity monitor under bright illumination (Accuscan Instruments, Inc. Columbus, OH) (Sotnikova et al., 2004). Mice were allowed to explore the locomotor activity chamber for 1 hour. After that, they



received either saline or Galantamine (1 mg/kg, i.p.) and locomotor activity was monitored for additional 2h.

### *Rotarod*

To assess procedural learning we used an accelerating rotarod and investigated motor skill learning during several days. The rotarod apparatus was made of gray plastic (rotating cylinder diameter: 5 cm, width: 8 cm, height: 20 cm) with an automatic fall recorder (Insight Equipaments, Ribeirão Preto, Brazil). To characterize improvement in rotarod performance, mice were trained during eight consecutive days. In order to evaluate retained performance, mice were re-exposed to the same task ten days later. Before daily training, mice were allowed to accommodate on the rod for 5 min. The animals were placed on the rotating roller and the rotation was increased from 5 to 35 rpm over a 5-min period. For each day, mice were subjected to ten trials with a 30 second interval between trials.

### **Pharmacological Procedures.**

In the pre-training galantamine dose-response study, either saline or galantamine (0.5, 1 and 3 mg/kg, i.p.) was injected 30 min prior to S1. In the second study, saline or galantamine (1 mg/kg i.p.) was injected 30 min before test session (T). The dose of galantamine (1 mg/kg) was based on the findings from the dose-response study: results were the most robust and do not affect locomotor activity. In addition, in a previous study we demonstrated that this dose is able to reverse social deficits in VACHT KD mice (Prado et al., 2006). In some experiments we injected saline or donepezil (0.5 mg/kg, i.p.) 30 min before S1.

## **Results**

### **Expression of VACHT in nerve terminals is reduced in VACHT KD mice**

To visualize how decreased VACHT expression influences transporter levels in nerve terminals, we used indirect immunofluorescence in cryostat sections obtained from cortex, hippocampus, striatum and spinal cord. Wild-type mice sections present robust and

widespread punctated labeling of nerve endings detected with a VAcHT antibody and this labeling is similar to that obtained with other integral synaptic vesicle proteins (Fig. 1). Staining with this VAcHT antibody is specific, as it is suppressed in cryostat sections from VAcHT KO mice (not shown). The punctated labeling was decreased both in heterozygous and homozygous VAcHT KD mice in different areas of the brain and also in the spinal cord (Fig. 1 A-C). Quantification of immunofluorescence labeling in hippocampal sections indicates that immunoreactivity in heterozygous mice is decreased by 40%, whereas VAcHT KD<sup>HOM</sup> mice presented even further reduction (70 %). No decrease in immunoreactivity was detected in sequential cryostat sections from hippocampus stained with an antibody against CHT1 (Fig. 1 D) (Ribeiro et al., 2005). These results show that CHT1 levels are not altered in VAcHT KD mice, and suggest that cholinergic synapses are normally formed in mutant mice.

### **Motor skill learning is affect in VAcHT KD mice**

To investigate whether altered transport of ACh into synaptic vesicles modifies learning of a procedural task, we investigated motor skill learning. In order to do that, we used a protocol for the accelerating rotarod (Fig. 2) that allowed maximum motor skill acquisition over the period of days. VAcHT KD<sup>HOM</sup> mice are unable to spend prolonged amounts of time on the rotarod due to its decreased physical capacity (Prado et al., 2006), therefore we used VAcHT KD<sup>HET</sup> mice in these experiments. Using this protocol, wild-type mice and VAcHT KD<sup>HET</sup> mice present an improvement in performance both within sessions (intrasession performance) and between sessions (intersession performance, Fig. 2), indicating that both genotypes are able to learn the motor skill. Analysis of the performance for each day shows a significant effect of genotype on days 2, 3 and 4 [F(1,270)= 5.109; 8.049; 4.735], demonstrating that VAcHT KD<sup>HET</sup> mice performed worse than wild-type mice on these days (Fig. 2B). VAcHT KD<sup>HET</sup> mice were able to perform as well as wild-type mice after five days of practice, suggesting that although mutant mice are able to learn the task, they needed more training to reach maximum performance. In agreement with this observation, analysis of performance by averaging the total time that animals spent on the rod during the 10 trials of each day (Fig.3A) reveals that maximum performance is achieved on the 3<sup>rd</sup> day for wild-type mice, whereas VAcHT KD<sup>HET</sup> achieved their maximum performance around the 4<sup>th</sup> day. Exponential fitting of curves

generated for each individual mouse for the time spent on the rod in a given day (plotted similar to the average shown on Fig. 2B) reveals that maximum performance is identical for the two genotypes (Fig. 3B). Moreover, time constants ( $\tau$ ) for the learning curve indicated a  $\tau$  of 2 days for WT mice, whereas VAcHT KD<sup>HET</sup> mice had a  $\tau$  of 3 days to achieve maximum learning (Fig. 3C). These values are in line with the average performance, but this difference just fail statistical significance (Fig. 3C,  $p=0.07$ ). The fact that both genotypes achieved similar maximum performance suggests that the change in the rate of acquisition for motor learning cannot be explained by alterations in physical performance. In addition, gait analysis (Supplemental Fig. 1A to C) indicates that VAcHT KD<sup>HET</sup> mice present no alteration in stride length, although VAcHT KD<sup>HOM</sup> mice did show a decrease in this parameter.

To test whether mutant mice present any change in their ability to retrieve information necessary to perform this procedural test, we compared performance of the two genotypes in the last trial of a given day with the first trial of the next day. We found no significant difference between the two genotypes (Fig. 3D), revealing that in the day to day basis they were both able to retrieve the necessary information to perform successfully in the rotarod. We also tested procedural memory retention 10 days after the 8<sup>th</sup> trial (day 18<sup>th</sup>) by comparing the last trial of day 8<sup>th</sup> with the performance in the first trial of day 18<sup>th</sup>. VAcHT KD<sup>HET</sup> and wild-type mice show no significant difference in performance in the first trial on day 18<sup>th</sup>, suggesting that memory retention was equivalent between genotypes (Fig. 3E,  $p=0,6999$ ). On day 18<sup>th</sup>, VAcHT KD<sup>HET</sup> and WT mice reach a similar maximum performance, although KD<sup>HET</sup> needed more trials to do so (Fig. 2C). Overall, the data indicate that retrieval of procedural memory is not affected in VAcHT KD<sup>HET</sup> mice, whereas memory encoding is less efficient than in WT animals.

### **VAcHT KD mice have specific alterations in recency memory**

Having established that mice with reduced capacity to transport ACh into vesicles present deficits in procedural learning, we went to evaluate whether explicit learning was also compromised. Object recognition learning tasks have been suggested to provide an assessment of declarative-like memory processes in rodents (Dere et al., 2005;Dere et al., 2007). There have been several studies indicating that cholinergic tone participates in novel

object recognition, however much less is known of whether the cholinergic system can control recency memory for objects. Mice can be tested for recency recognition memory using matching-to-sample tasks to obtain information on temporal order of object presentation (Dere et al., 2005;Bevins and Besheer, 2006). In this task rodents need to remember the order in which two distinct objects were presented what is shown by increased exploration of the first object presented in a sequence (the less familiar object).

In agreement with published data, during the test phase of this task wild-type mice preferred the object presented less recently, as shown by increase exploration of object A (Fig. 4A, clear bars) over object B [ $F(5,42)=20.43$ ,  $p<0.001$ ]. In contrast, mutant mice [both heterozygous  $F(5,42)=0.8969$   $p=0.4921$  and homozygous  $F(5,42)=0.9633$   $p=0.4511$ ] were unable to distinguish between the more and less recently presented object (Fig. 4A), suggesting that VAcHT mutants are unable to remember the order in which the objects were presented. These results are consistent with previous observations suggesting a recognition memory deficit in VAcHT KD mice (Prado et al., 2006).

To test if reduction of VAcHT expression affects other forms of memory we investigated spatial memory. In order to do that we utilized the hidden platform version of the MWM and VAcHT KD<sup>HET</sup> mice, since VAcHT KD<sup>HOM</sup> mice are incapable of prolonged swimming due to neuromuscular fatigue (our unpublished results). There was no effect of genotype in escape latency during training sessions (Fig.4B  $p<0.05$ ) and both VAcHT KD<sup>HET</sup> and WT control littermates spent similar amount of time in the target quadrant during a probe trial carried out 24 h after the last training session (Fig.4C  $p<0.05$ ). These results indicate that reduced capacity to store ACh in vesicles, at least to the extent found in this mutant, does not affect spatial memory acquisition or retention. In agreement with these results, VAcHT KD<sup>HET</sup> mice performed similarly to wild-type mice in the novel location version of the object recognition task, although VAcHT KD<sup>HOM</sup> mice do present a deficit (not shown). We also investigated whether mutant VAcHT mice present deficits in spatial working memory. Spontaneous alternation in the Y maze shows no effect of genotype in the percent alternation scores [Fig. 4D,  $F(2,38)=0.3032$ ] or in the number of arms entered (Fig.4E  $F(2,38)=0.3378$ ). Moreover, in the one trial step down inhibitory avoidance task both mutants performed as well as WT mice (not shown). Taken together,

these results suggest that reduction of cholinergic tone in VAcHT KD mice affects selectively a form of explicit memory, without affecting spatial, working or fear memory.

### **Increased cholinergic tone improves memory encoding in VAcHT KD mice**

The above experiments establish that VAcHT KD mice appear to have a deficit in the temporal order task of recognition memory. Since both genotypes show equal deficits, we chose to investigate only VAcHT KD<sup>HET</sup> as they are less prone for muscular deficits and social recognition memory deficits in these mice can be readily reversible with cholinesterase inhibitors (Prado et al., 2006). Injection of saline prior to the trial sessions or the test session did not alter the behavior of wild-type (control littermates) or of VAcHT KD<sup>HET</sup> mice (not shown). Galantamine (0.5, 1.0 and 3 mg/kg) was injected 30 min prior to the first sample session (Fig. 5A to C respectively, clear bars). Wild-type control mice were able to discriminate against an object presented less recently [ $F(5,42)=8.538$ ,  $p<0.001$ ], and galantamine did not alter their performance. At 0.5 mg/kg galantamine did not affect VAcHT KD<sup>HET</sup> performance [Fig. 5A,  $F(5,36)=0.2597$ ]. However, as can be seen in Fig 5B and 5C, treatment with 1 and 3 mg/kg of galantamine significantly improved temporal order memory in VAcHT KD<sup>HET</sup> mice, [ $F(5,60)=26.19$ ,  $p<0.001$  and  $F(5,48)=16.36$ ,  $p<0.001$ , respectively for 1 and 3 mg/kg] making their performance during the test session indistinguishable from that of wild-type mice.

Besides its well-known action as an acetylcholinesterase inhibitor, galantamine is also able to modulate nicotinic receptors (Pereira et al., 1994). Therefore, to test whether the reversal of recognition memory deficit of VAcHT KD<sup>HET</sup> can also be elicited by a more selective cholinesterase inhibitor, we investigated the action of donepezil (Cummings, 2003). Donepezil did not alter the performance of wild-type control littermates in the temporal order recognition memory task, but in agreement with the results obtained with galantamine, it was also able to reverse the deficit of mutant VAcHT mice [ $F(5,30)=2.625$ ,  $p<0.05$ , Fig. 5D). Taken together, these results indicate that preserving ACh during memory acquisition can reverse the deficit in the object recognition temporal order task observed in VAcHT KD<sup>HET</sup> mice.

It is possible that increased cholinergic tone in VAcHT KD<sup>HET</sup> mice might also facilitate retrieval. To test for this possibility, we analyzed the effect of the pre-test administration of on memory retention. To do that, we injected galantamine (1 mg/kg) 30 min prior to the test session. We chose this dose because it was the minimum effective dose that showed no signs of undesired cholinergic overactivation (manifested as increased salivation, which appeared in some control mice with 3 mg/kg). Wild-type control mice presented no alteration in performance when injected with galantamine prior to the test session (Fig. 6A). Moreover, VAcHT KD<sup>HET</sup> mice showed no sign of improvement in recognition memory when injected with galantamine prior to the test session; mice were unable to discriminate against the more recent and less recently presented object [Fig. 6A  $F(5,42)=0.8969$ ]. Although in the experiments with cholinesterase inhibitors we did not detected any alteration in initial exploration of objects in the sample trial (not shown), we further tested whether cholinesterase inhibition were able to alter VAcHT KD<sup>HET</sup> behavior in a more general way. For this test, we analyzed locomotor activity of wild-type and VAcHT KD<sup>HET</sup> mice. There was no difference in spontaneous locomotor activity between control littermates (wild-type) and VAcHT KD<sup>HET</sup> mice (Fig. 6B)]. Galantamine (1 mg/kg) did not alter locomotor activity in any of these two genotypes [Fig. 6B and C,  $F(105,972)=0.8235$ ]. Taken together, these experiments indicate that cholinesterase inhibition specifically improves acquisition but not retrieval of object recognition memory in VAcHT KD<sup>HET</sup> mice.

## Discussion

The present experiments reveal a key role for synaptic vesicle storage to fine tune learning in procedural and non-procedural tasks in mice. These results provide novel insights on the contribution of acetylcholine to facilitate cognitive processing and suggest that the ability to sustain efficient transport of neurotransmitter into synaptic vesicles is of fundamental importance for learning.

VAcHT KD mice present reduced capacity to sustain ACh release in response to strong stimulation (Prado et al., 2006), a consequence of having reduced expression of this transporter. In fact, immunofluorescence analysis indicates that VAcHT levels in synaptic terminals are decreased by the extension previously observed in immunoblot analysis. All

the CNS areas that are relevant for behaviors studied herein showed the same levels of decrease in VAcHT immunoreactivity. In contrast, immunoreactivity for CHT1, another cholinergic transporter present in synaptic vesicles (Ribeiro et al., 2006) appears preserved supporting the notion that the alteration in VAcHT expression does not alter other pre-synaptic cholinergic proteins.

Motor learning depends on improvement of accuracy, speed and general ability, and it is accepted that this is accompanied by substantial plasticity of cortical representations (Nudo et al., 1996). Rats treated with IgG-192 saporin, a toxin that targets and eliminates basal forebrain cholinergic neurons, have deficits to learn a forelimb reaching task used to assess motor skill learning and exhibit alterations in cortical map representation (Conner et al., 2003), suggesting that cholinergic tone might be of importance for this type of learning. Our experiments evaluating motor learning reveal that ACh is a key determinant to modulate the rate of learning. Interestingly, memory consolidation and performance maintenance in the rotarod do not depend on mice having normal levels of transporter and by extension cholinergic tone. These results provide evidence for a role of pre-synaptic cholinergic activity and efficient transport of ACh into vesicles to facilitate procedural learning. The fact that cholinergic tone is required mainly for acquisition is in line with the observation that rats that had previously learned a forelimb reaching task show no deficit in this task after lesions of basal cholinergic neuron with the toxin 192-IgG saporin (Conner et al., 2005; Conner et al., 2003) .

Motor learning in the rotarod is accompanied by substantial cortical and striatal plasticity. Learning a novel motor skill requires novel protein synthesis, suggesting that the rules governing procedural learning are similar to those found for tasks that reflect declarative memory (Luft et al., 2004a; Luft et al., 2004b). Changes in neuronal firing, recruitment of neurons and neuronal circuitry have been detected by recordings using multi-electrode arrays that correspond to the fast and slow phases of motor skill learning in the rotarod (Costa et al., 2004). In the cortex, cholinergic tone influences learning and plasticity by multiple mechanisms (Hasselmo and Giocomo, 2006). There is rich cholinergic innervation in the striatum and cholinergic tone has been shown to influence corticostriatal forms of plasticity such as long-term depression (LTD) in medium spine Gabaergic neurons (Wang et al., 2006). It would be interesting to test, using multi-electrode

arrays, whether neuronal assemblies in corticostriatal circuitry might be affected in VACHT mutant mice.

There has been substantial controversy of whether rats treated with the cholinergic toxin IgG-192 saporin present deficits in hippocampal-dependent tasks, and particularly in spatial memory (Parent and Baxter, 2004). It seems that when selective cholinergic degeneration is achieved by more localized injections of the toxin, without affecting other neurochemical systems, spatial memory is spared (Baxter et al., 1995; Parent and Baxter, 2004; Frielingsdorf et al., 2006). In contrast, more extensive lesions (i.e. by certain i.c.v. injection protocols) clearly alter spatial memory, perhaps by affecting other neurochemical systems non-specifically (Walsh et al., 1995). The present data reveal that reduced cholinergic tone observed in VACHT KD<sup>HET</sup> has little effect on acquisition or retrieval of the spatial memory associated with training in the MWM.

Several recent studies started to address neurochemical circuits and anatomical regions involved in novel object recognition memory (Winters and Bussey, 2005a; Dere et al., 2007). Object recognition memory provides a relatively pure assessment of declarative memory function in animals without the need to change food intake or punishment. This kind of memory requires judgment of the previous occurrence of stimuli made on the basis of the relative familiarity of individual objects, or by integrating information concerning objects and location, or by using recency information. Many studies have demonstrated that distinct neural network are recruited during learning the novel, spatial and recency components of recognition memory (Barker et al., 2007; revised by Dere et al., 2007).

It is clear that glutamatergic transmission in the perirhinal cortex is a key player in novel object recognition (Barker et al., 2006; Winters and Bussey, 2005b), whereas the involvement of synaptic transmission in the hippocampus is controversial (Forwood et al., 2005) but see also (Dere et al., 2007). There has been also controversy on the role of cholinergic system in novel object recognition based on lesion studies or studies with the p75 neurotrophic receptor selective immunotoxin 192-IgG saporin. Some studies show that the basal forebrain cholinergic system is important for object recognition with cholinergic terminals in the perirhinal cortex having a major role (Warburton et al., 2003; Winters and Bussey, 2005a); however others failed to find an effect with electrolytic lesions in the



medial septum (Ennaceur, 1998) or found effects of 192-saporin only long after the lesions were induced (Paban et al., 2005), suggesting that the period of testing after cholinergic lesion is critical.

Lesion studies (Barker et al., 2007) and infusion of lidocaine (Hannesson et al., 2004) have implicated prefrontal cortex-perirhinal cortex circuitry in recency memory for objects. However, neurochemical circuits that provide regulation for recency memory are unknown. We consistently found that wild-type mice show preference for less familiar objects, whereas VAcHT KD mice do not. These results indicate that increased cholinergic activity, which demands efficient ACh storage in synaptic vesicles, regulates temporal order object recognition memory.

Here we also addressed the question of whether increased cholinergic tone is important during encoding or retrieval of temporal order object memory. The ability of cholinesterase inhibitors to reverse temporal order object recognition memory impairment in VAcHT KD mice was strictly dependent on improving cholinergic tone during encoding of information. Indeed, mice treated with cholinesterase inhibitors only before memory retrieval performed as bad as untreated VAcHT KD mice. The data suggest that cognitive alterations responsible for the failure of VAcHT KD mice in recency recognition are related to learning deficits. It is important to note that these cholinesterase inhibitors did not increase the exploration time during the sample phase of the task, or change exploration in the open field, suggesting that increased cholinergic tone indeed facilitated encoding information more effectively.

Synaptic vesicles are filled with thousand molecules of ACh, however the turnover rate for mammalian VAcHT to take up ACh into vesicles is slow (approximately 1/s (Varoqui and Erickson, 1996). Estimates of synaptic vesicle recycling both at the neuromuscular junction and small nerve-endings in the brain using vital dyes indicate that reuse of vesicles occurs fast after exocytosis, in the order of 15-30 seconds (Betz and Bewick, 1992; Ryan et al., 1993). These observations suggest that synaptic vesicle filling in cholinergic terminals may not reach electrochemical equilibrium. In agreement with these observations, overexpression of VAcHT in cultured neurons increases the packing of ACh in vesicles (Song et al., 1997), whereas decreased expression *in vivo* does the inverse

(Prado et al., 2006). Central nervous system synapses, with their small pool of synaptic vesicles, might be particularly sensitive to reductions in VAcHT expression levels and this should preferentially affect functions that depend on bursts of pre-synaptic activity demanding effective recycling of vesicles and ACh to maintain cholinergic tone.

Attentional processes have been suggested to depend on cholinergic tone (Sarter and Parikh, 2005). Therefore, one possibility is that attention is affected in VAcHT KD mice. Although the weight that attentional processes have for successful completion of behavioral tasks may differ, we perceive that it is unlikely that a general deficit in attention in VAcHT KD mice would affect only recognition memory, but not MWM or Y maze performance.

A second possibility is that ACh may facilitate encoding of memory traces. Cholinergic tone may assist memory encoding by either facilitating excitatory input to the cortex (Gioanni et al., 1999) and modulating synaptic plasticity (Dringenberg et al., 2007). Alternatively, cholinergic activity may decrease excitatory feedback circuitry and thus interference that can affect encoding (Hasselmo et al., 1992;Hasselmo and Bower, 1992;Hasselmo, 2006). Finally, cholinergic tone may regulate electrical properties of individual cortical cells (Klink and Alonso, 1997;Fransen et al., 2002). All of these mechanisms can be envisioned to help recruiting neuronal assemblies to encode information. VAcHT KD mice therefore provide the means to probe how cholinergic tone regulates cellular mechanisms of learning. Our experiments suggest that the ability to sustain ACh release during neuronal activity is important for learning and raise the possibility for a conserved role of cholinergic tone in facilitating explicit and implicit memory encoding.

**Acknowledgments:** We appreciate the technical assistance and outstanding care for mouse colonies from Diogo Souza, Danuza M. Diniz and Wendy Roberts. This work was supported by grants from the Fogarty Center TWR03 TW007025-01 and TWR21 TW007800-01 (M.A.M.P., V.F.P., I.I., R.G. and M.G.C.), CNPq (Mental Health and Aging programs to I.I., M.C. and M.A.M.P), MCT-Millennium Institute (M.V.G.), PRONEX-MG, (FAPEMIG for M.A.M.P and V.F.P.) and fellowships from CAPES, FAPEMIG and CNPq.

## Reference List

1. Barker GR, Bird F, Alexander V, Warburton EC (2007) Recognition memory for objects, place, and temporal order: a disconnection analysis of the role of the medial prefrontal cortex and perirhinal cortex. *J Neurosci* 27: 2948-2957.
2. Barker GR, Warburton EC, Koder T, Dolman NP, More JC, Aggleton JP, Bashir ZI, Auberson YP, Jane DE, Brown MW (2006) The different effects on recognition memory of perirhinal kainate and NMDA glutamate receptor antagonism: implications for underlying plasticity mechanisms. *J Neurosci* 26: 3561-3566.
3. Baxter MG, Bucci DJ, Gorman LK, Wiley RG, Gallagher M (1995) Selective immunotoxic lesions of basal forebrain cholinergic cells: effects on learning and memory in rats. *Behav Neurosci* 109: 714-722.
4. Bazalakova MH, Wright J, Schneble EJ, McDonald MP, Heilman CJ, Levey AI, Blakely RD (2007) Deficits in acetylcholine homeostasis, receptors and behaviors in choline transporter heterozygous mice. *Genes Brain Behav* 6: 411-424.
5. Betz WJ, Bewick GS (1992) Optical analysis of synaptic vesicle recycling at the frog neuromuscular junction. *Science* 255: 200-203.
6. Bevilacqua LR, da Silva WN, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M (2005) Extinction and reacquisition of a fear-motivated memory require activity of the Src family of tyrosine kinases in the CA1 region of the hippocampus. *Pharmacol Biochem Behav* 81: 139-145.
7. Bevins RA, Besheer J (2006) Object recognition in rats and mice: a one-trial nonmatching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nat Protoc* 1:1306-1311.
8. Brandon EP, Lin W, D'Amour KA, Pizzo DP, Dominguez B, Sugiura Y, Thode S, Ko CP, Thal LJ, Gage FH, Lee KF (2003) Aberrant patterning of neuromuscular synapses in choline acetyltransferase-deficient mice. *J Neurosci* 23: 539-549.
9. Brandon EP, Mellott T, Pizzo DP, Coufal N, D'Amour KA, Gobeske K, Lortie M, Lopez-Coviella I, Berse B, Thal LJ, Gage FH, Blusztajn JK (2004) Choline transporter 1

maintains cholinergic function in choline acetyltransferase haploinsufficiency. *J Neurosci* 24: 5459-5466.

10. Conner JM, Chiba AA, Tuszynski MH (2005) The basal forebrain cholinergic system is essential for cortical plasticity and functional recovery following brain injury. *Neuron* 46: 173-179.

11. Conner JM, Culberson A, Packowski C, Chiba AA, Tuszynski MH (2003) Lesions of the Basal forebrain cholinergic system impair task acquisition and abolish cortical plasticity associated with motor skill learning. *Neuron* 38: 819-829.

12. Costa RM, Cohen D, Nicolelis MA (2004) Differential corticostriatal plasticity during fast and slow motor skill learning in mice. *Curr Biol* 14: 1124-1134.

13. Cummings JL (2003) Use of cholinesterase inhibitors in clinical practice: evidence-based recommendations. *Am J Geriatr Psychiatry* 11: 131-145.

14. Dere E, Huston JP, Souza Silva MA (2005) Episodic-like memory in mice: simultaneous assessment of object, place and temporal order memory. *Brain Res Brain Res Protoc* 16: 10-19.

15. Dere E, Huston JP, Souza Silva MA (2007) The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 31: 673-704.

16. Dobransky T, Rylett RJ (2005) A model for dynamic regulation of choline acetyltransferase by phosphorylation. *J Neurochem* 95: 305-313.

17. Dringenberg HC, Hamze B, Wilson A, Speechley W, Kuo MC (2007) Heterosynaptic facilitation of in vivo thalamocortical long-term potentiation in the adult rat visual cortex by acetylcholine. *Cereb Cortex* 17: 839-848.

18. Edwards RH (2007) The neurotransmitter cycle and quantal size. *Neuron* 55: 835-858.

19. Efanog SM, Garland EM, Staley JK, Khare AB, Mash DC (1997) Vesicular acetylcholine transporter density and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 18: 407-413.
20. Ennaceur A (1998) Effects of lesions of the Substantia Innominata/Ventral Pallidum, globus pallidus and medial septum on rat's performance in object recognition and radial-maze tasks: physostigmine and amphetamine treatments. *Pharmacol Res* 38: 251-263.
21. Ferguson SM, Bazalakova M, Savchenko V, Tapia JC, Wright J, Blakely RD (2004) Lethal impairment of cholinergic neurotransmission in hemicholinium-3-sensitive choline transporter knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 8762-8767.
22. Forwood SE, Winters BD, Bussey TJ (2005) Hippocampal lesions that abolish spatial maze performance spare object recognition memory at delays of up to 48 hours. *Hippocampus* 15: 347-355.
23. Fransen E, Alonso AA, Hasselmo ME (2002) Simulations of the role of the muscarinic-activated calcium-sensitive nonspecific cation current INCM in entorhinal neuronal activity during delayed matching tasks. *J Neurosci* 22: 1081-1097.
24. Frielingsdorf H, Thal LJ, Pizzo DP (2006) The septohippocampal cholinergic system and spatial working memory in the Morris water maze. *Behav Brain Res* 168: 37-46.
25. Gioanni Y, Rougeot C, Clarke PB, Lepouse C, Thierry AM, Vidal C (1999) Nicotinic receptors in the rat prefrontal cortex: increase in glutamate release and facilitation of mediodorsal thalamo-cortical transmission. *Eur J Neurosci* 11: 18-30.
26. Hannesson DK, Howland JG, Phillips AG (2004) Interaction between perirhinal and medial prefrontal cortex is required for temporal order but not recognition memory for objects in rats. *J Neurosci* 24: 4596-4604.
27. Hasselmo ME (2006) The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr Opin Neurobiol* 16: 710-715.
28. Hasselmo ME, Anderson BP, Bower JM (1992) Cholinergic modulation of cortical associative memory function. *J Neurophysiol* 67: 1230-1246.

29. Hasselmo ME, Bower JM (1992) Cholinergic suppression specific to intrinsic not afferent fiber synapses in rat piriform (olfactory) cortex. *J Neurophysiol* 67: 1222-1229.
30. Hasselmo ME, Giocomo LM (2006) Cholinergic modulation of cortical function. *J Mol Neurosci* 30: 133-135.
31. Hughes RN (2004) The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. *Neurosci Biobehav Rev* 28: 497-505.
32. Klink R, Alonso A (1997) Muscarinic modulation of the oscillatory and repetitive firing properties of entorhinal cortex layer II neurons. *J Neurophysiol* 77: 1813-1828.
33. Luft AR, Buitrago MM, Kaelin-Lang A, Dichgans J, Schulz JB (2004a) Protein synthesis inhibition blocks consolidation of an acrobatic motor skill. *Learn Mem* 11: 379-382.
34. Luft AR, Buitrago MM, Ringer T, Dichgans J, Schulz JB (2004b) Motor skill learning depends on protein synthesis in motor cortex after training. *J Neurosci* 24: 6515-6520.
35. Misgeld T, Burgess RW, Lewis RM, Cunningham JM, Lichtman JW, Sanes JR (2002) Roles of neurotransmitter in synapse formation: development of neuromuscular junctions lacking choline acetyltransferase. *Neuron* 36: 635-648.
36. Nudo RJ, Milliken GW, Jenkins WM, Merzenich MM (1996) Use-dependent alterations of movement representations in primary motor cortex of adult squirrel monkeys. *J Neurosci* 16: 785-807.
37. Paban V, Jaffard M, Chambon C, Malafosse M, Alescio-Lautier B (2005) Time course of behavioral changes following basal forebrain cholinergic damage in rats: Environmental enrichment as a therapeutic intervention. *Neuroscience* 132: 13-32.
38. Parent MB, Baxter MG (2004) Septohippocampal acetylcholine: involved in but not necessary for learning and memory? *Learn Mem* 11: 9-20.

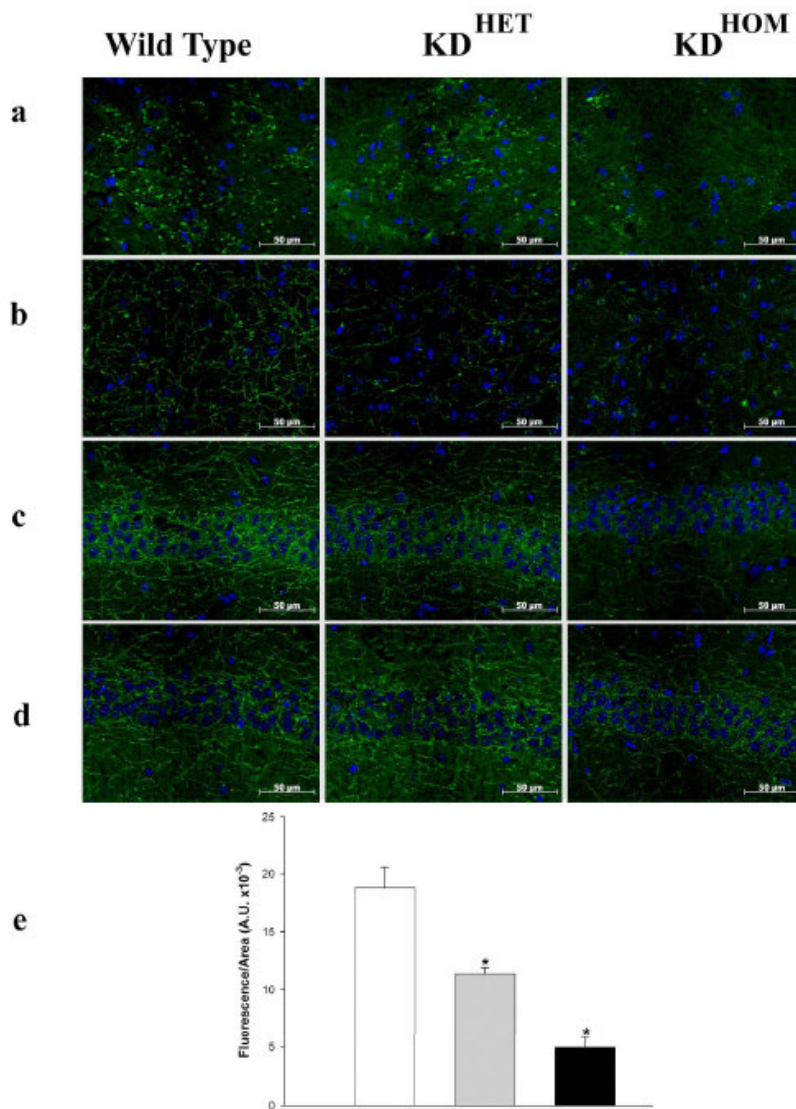
39. Parsons SM (2000) Transport mechanisms in acetylcholine and monoamine storage. *FASEB J* 14: 2423-2434.
40. Pereira EF, Alkondon M, Reinhardt S, Maelicke A, Peng X, Lindstrom J, Whiting P, Albuquerque EX (1994) Physostigmine and galanthamine: probes for a novel binding site on the alpha 4 beta 2 subtype of neuronal nicotinic acetylcholine receptors stably expressed in fibroblast cells. *J Pharmacol Exp Ther* 270: 768-778.
41. Prado VF, Martins-Silva C, de Castro BM, Lima RF, Barros DM, Amaral E, Ramsey AJ, Sotnikova TD, Ramirez MR, Kim HG, Rossato JI, Koenen J, Quan H, Cota VR, Moraes MF, Gomez MV, Guatimosim C, Wetsel WC, Kushmerick C, Pereira GS, Gainetdinov RR, Izquierdo I, Caron MG, Prado MA (2006) Mice deficient for the vesicular acetylcholine transporter are myasthenic and have deficits in object and social recognition. *Neuron* 51: 601-612.
42. Pych JC, Kim M, Gold PE (2006) Effects of injections of glucose into the dorsal striatum on learning of place and response mazes. *Behav Brain Res* 167: 373-378.
43. Ribeiro FM, Black SA, Cregan SP, Prado VF, Prado MA, Rylett RJ, Ferguson SS (2005) Constitutive high-affinity choline transporter endocytosis is determined by a carboxyl-terminal tail dileucine motif. *J Neurochem* 94: 86-96.
44. Ribeiro FM, Black SA, Prado VF, Rylett RJ, Ferguson SS, Prado MA (2006) The "ins" and "outs" of the high-affinity choline transporter CHT1. *J Neurochem* 97:1-12.
45. Rossato JI, Bevilaqua LR, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M (2006) Retrieval induces hippocampal-dependent reconsolidation of spatial memory. *Learn Mem* 13: 431-440.
46. Ryan TA, Reuter H, Wendland B, Schweizer FE, Tsien RW, Smith SJ (1993) The kinetics of synaptic vesicle recycling measured at single presynaptic boutons. *Neuron* 11: 713-724.

47. Sarter M, Parikh V (2005) Choline transporters, cholinergic transmission and cognition. *Nat Rev Neurosci* 6: 48-56.
48. Semmler A, Frisch C, Debeir T, Ramanathan M, Okulla T, Klockgether T, Heneka MT (2007) Long-term cognitive impairment, neuronal loss and reduced cortical cholinergic innervation after recovery from sepsis in a rodent model. *Exp Neurol* 204: 733-740.
49. Smith R, Chung H, Rundquist S, Maat-Schieman ML, Colgan L, Englund E, Liu YJ, Roos RA, Faull RL, Brundin P, Li JY (2006) Cholinergic neuronal defect without cell loss in Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 15: 3119-3131.
50. Song H, Ming G, Fon E, Bellocchio E, Edwards RH, Poo M (1997) Expression of a putative vesicular acetylcholine transporter facilitates quantal transmitter packaging. *Neuron* 18: 815-826.
51. Sotnikova TD, Budygin EA, Jones SR, Dykstra LA, Caron MG, Gainetdinov RR (2004) Dopamine transporter-dependent and -independent actions of trace amine beta-phenylethylamine. *J Neurochem* 91: 362-373.
52. Terry AV, Jr., Gearhart DA, Warner SE, Zhang G, Bartlett MG, Middlemore ML, Beck WD, Jr., Mahadik SP, Waller JL (2007) Oral haloperidol or risperidone treatment in rats: temporal effects on nerve growth factor receptors, cholinergic neurons, and memory performance. *Neuroscience* 146: 1316-1332.
53. Varoqui H, Erickson JD (1996) Active transport of acetylcholine by the human vesicular acetylcholine transporter. *J Biol Chem* 271: 27229-27232.
54. Walsh TJ, Kelly RM, Dougherty KD, Stackman RW, Wiley RG, Kutscher CL (1995) Behavioral and neurobiological alterations induced by the immunotoxin 192-IgG-saporin: cholinergic and non-cholinergic effects following i.c.v. injection. *Brain Res* 702: 233-245.
55. Wang Z, Kai L, Day M, Ronesi J, Yin HH, Ding J, Tkatch T, Lovinger DM, Surmeier DJ (2006) Dopaminergic control of corticostriatal long-term synaptic depression in medium spiny neurons is mediated by cholinergic interneurons. *Neuron* 50: 443-452.



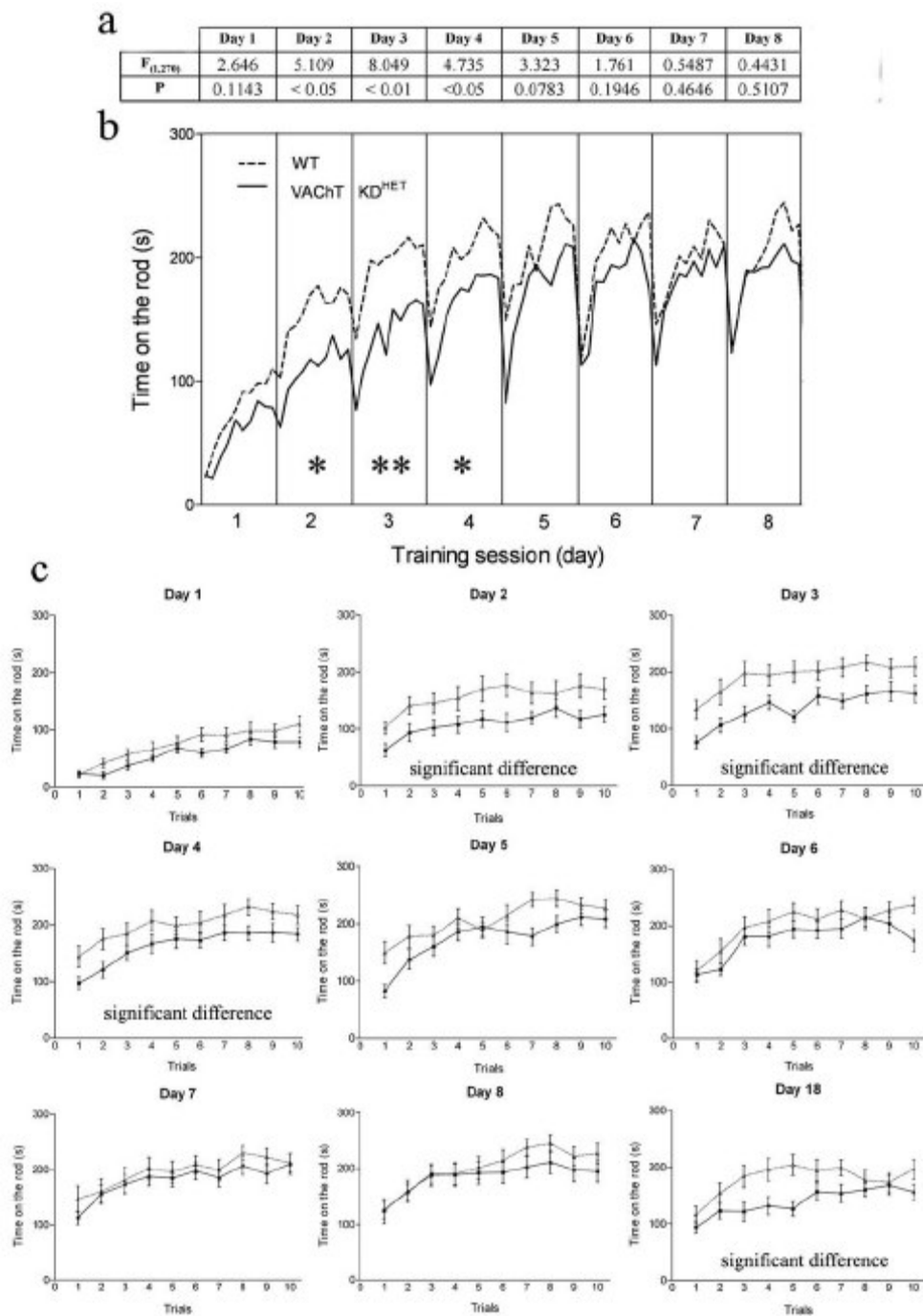
56. Warburton EC, Koder T, Cho K, Massey PV, Duguid G, Barker GR, Aggleton JP, Bashir ZI, Brown MW (2003) Cholinergic neurotransmission is essential for perirhinal cortical plasticity and recognition memory. *Neuron* 38: 987-996.
57. Winters BD, Bussey TJ (2005a) Removal of cholinergic input to perirhinal cortex disrupts object recognition but not spatial working memory in the rat. *Eur J Neurosci* 21: 2263-2270.
58. Winters BD, Bussey TJ (2005b) Transient inactivation of perirhinal cortex disrupts encoding, retrieval, and consolidation of object recognition memory. *J Neurosci* 25: 52-61.

## Legend of figures



**Figure 1: VACHT-immunoreactivity is decreased in nerve-endings.**

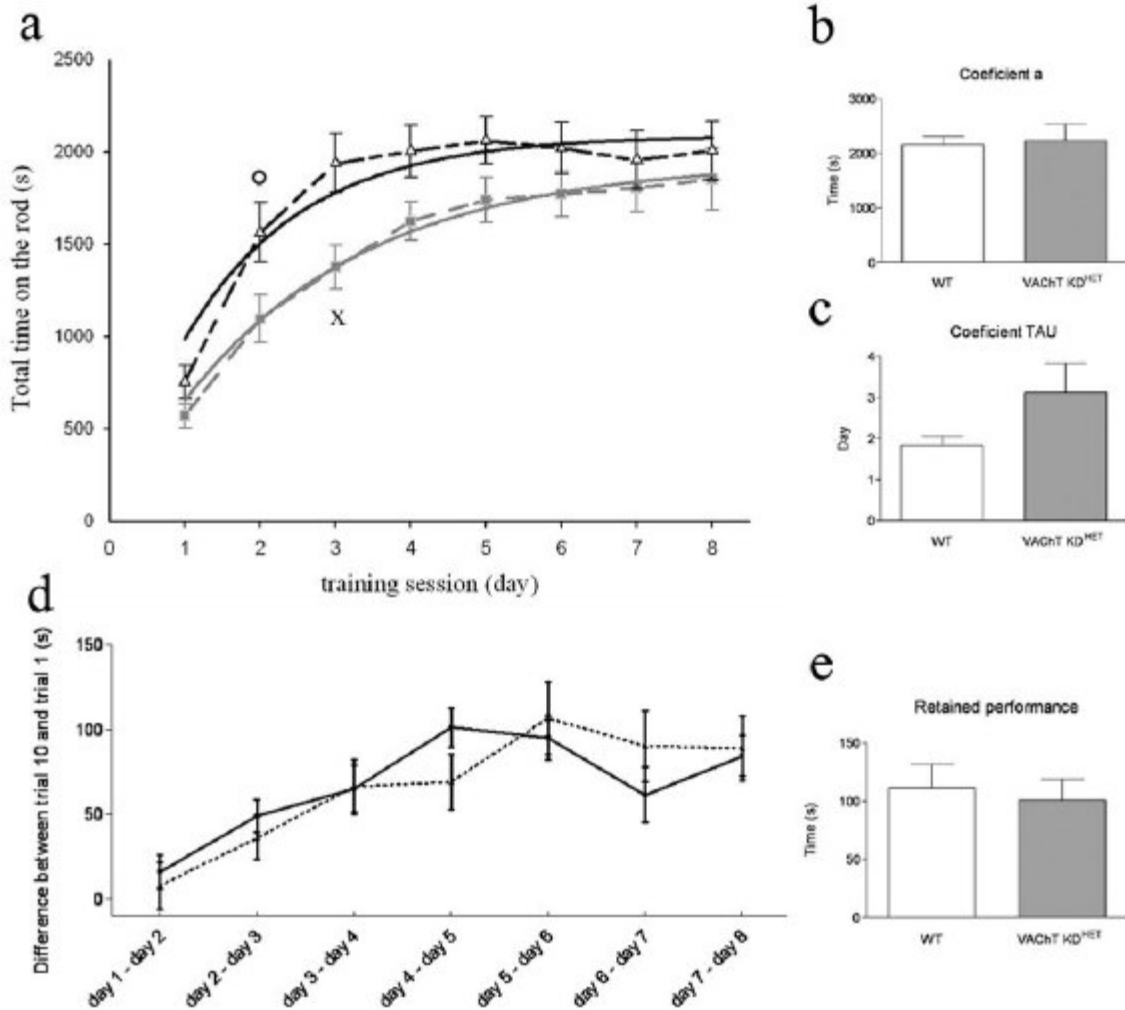
Representative optical sections of central nervous system regions stained with a VACHT (A-D) or CHT1 (D) antibodies (green). (A) Spinal cord, (B) Motor cortex-M1 region, (C) hippocampus-CA1 region and (D) CHT1 immunoreactivity in hippocampus. Blue labeling corresponds to nuclei stained with DAPI. (E) Quantification of fluorescence. Fluorescence of CHT1 was used for normalization (see Material and Methods). The results were expressed as mean  $\pm$  SEM. (\*) indicates statistical significant difference (One-way ANOVA, with Bonferroni post hoc;  $F(2,12)=33.19$ ,  $p<0.0001$ )



**Figure 2: Motor skill learning in mice with reduced cholinergic tone. (a)**

Result of a two-way repeated measures ANOVA for each day reveals a genotype effect on the second, third and fourth days during motor skill learning. **(b)** Cumulative performance on the rod during training. The lines represent mean time on the rod for each genotype in days 1-8 (\*)  $p < 0.05$ ; (\*\*)  $P < 0.01$ . **(c)**. Lines represent the mean  $\pm$  SEM for performance of WT

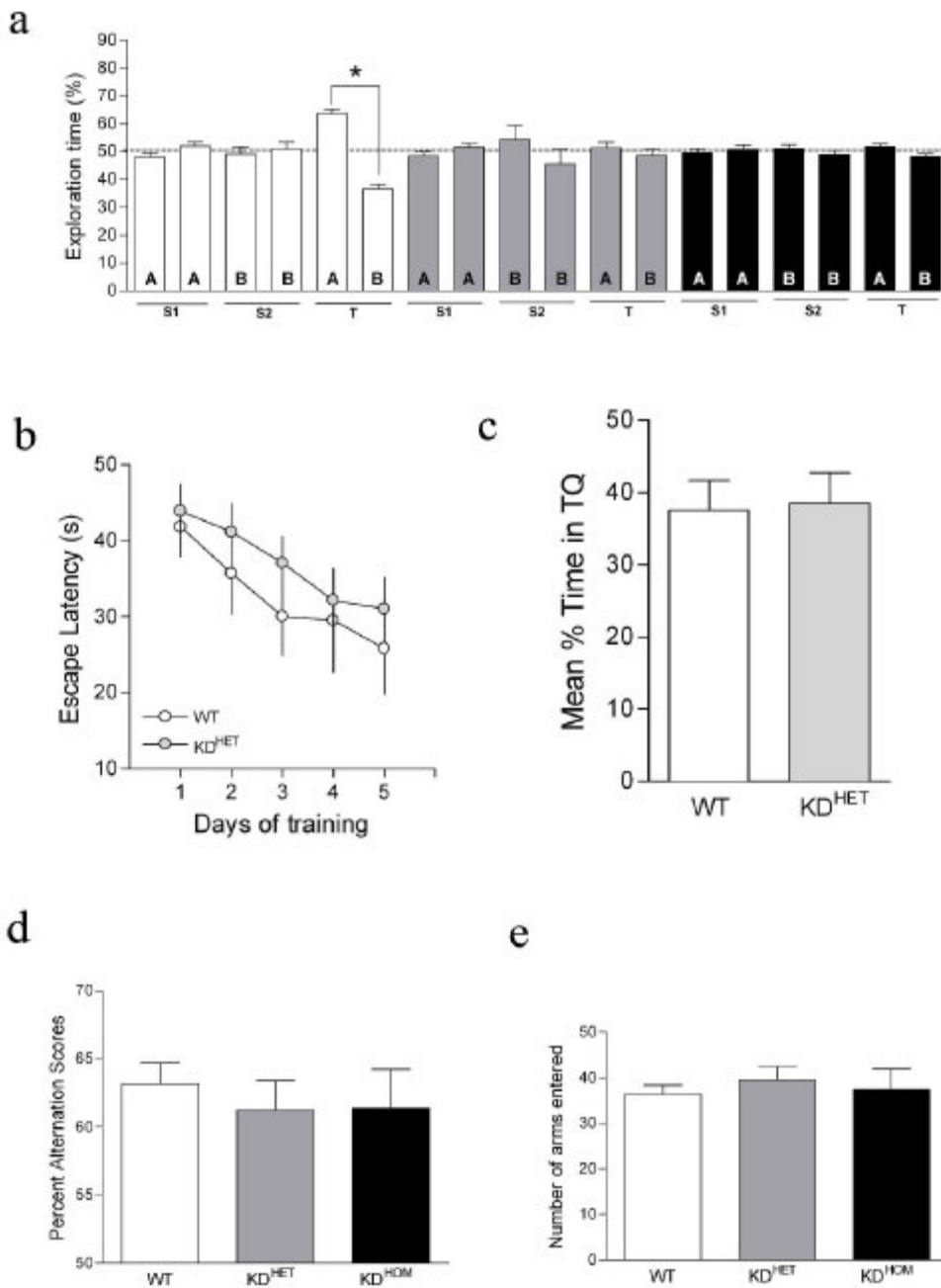
(open symbols) and VACHT KD<sup>HET</sup> (closed symbols) on the rotarod for each day. A two-way repeated measures ANOVA for each day reveals a genotype effect on the 2nd, 3rd, 4th and 18th days.



**Figure 3: VACHT KD<sup>HET</sup> mice learn slower than WT mice a procedural task. (a)**

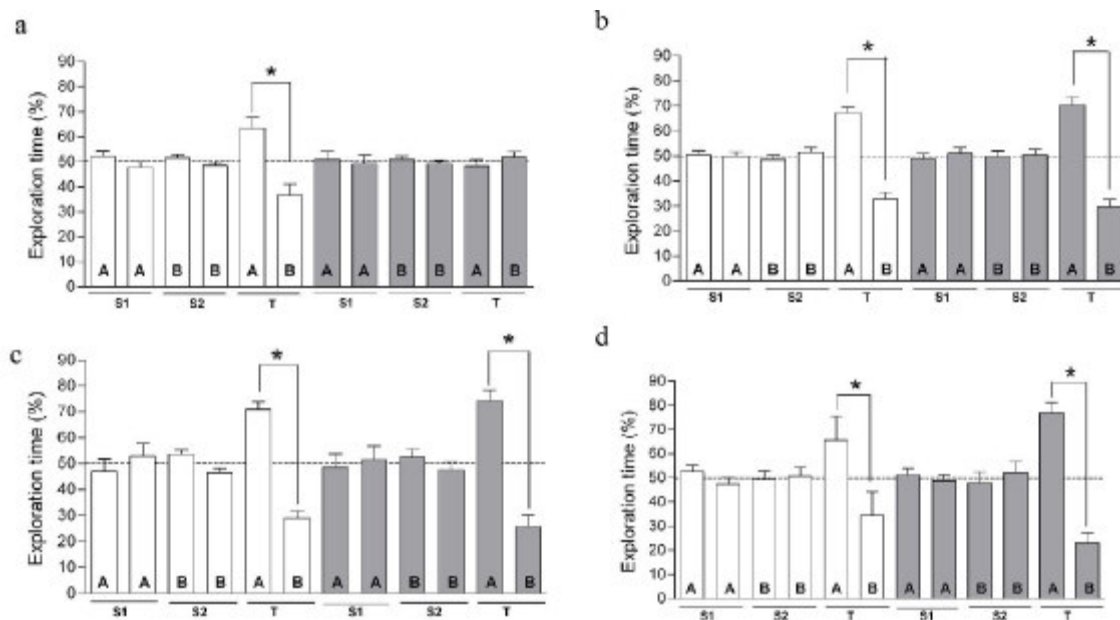
Dashed lines are the mean  $\pm$  SEM of the cumulative time mice spent on the rod for each day of training (10 trials per day) for WT (open symbols) and VACHT KD<sup>HET</sup> mice (closed symbols). The data can be fitted well (solid lines) with the equation  $y = a(1 - e^{-bx})$ . A one-way repeated measures ANOVA show a significant difference between the first day and all the other days in both genotypes ( $p < 0.05$ ) indicating that they both are able to learn. To evaluate in which day the distinct genotypes reached maximum performance on the accelerating rotarod we also compared the 8th day of trial with all the other days. (°)

indicates the last time point in which the performance is statistically different from the 8th day for wild-type mice (post hoc,  $p < 0.05$ ) and (x) indicates the last time point in which the performance is statistically different from the 8th day for VACHT KD<sup>HET</sup> mice (post hoc,  $p < 0.05$ ). **(b)** Identical curves as shown in A were generated to evaluate the performance of each individual animal and the curves were fitted with the exponential equation ( $y = a(1 - e^{-bx})$ ) to obtain the values for a, which indicate the asymptote for both genotypes. The results represent the mean  $\pm$  SEM values of asymptote performance for WT (white bars) and VACHT KD<sup>HET</sup> mice (gray bars). Statistical analysis shows that there is no difference between the maximum performance for the two genotypes ( $t=0.1997$   $df=30$   $p=0.8431$ ). **(c)** In order to evaluate how fast WT and VACHT KD<sup>HET</sup> learn, we calculated the time constant **(l)** for motor skill learning. Results represent the mean  $\pm$  SEM of the values obtained for WT (white bars) and VACHT KD<sup>HET</sup> mice (gray bars). A Mann-Whitney test shows a trend for difference between the two time constants ( $p= 0.0735$ ). **(d)** Consolidation of learning on the rotarod was evaluated by plotting the difference between the performance in the last trial of each day and the performance in the first trial of the next day. There is no difference in consolidation for the two genotypes **(e)** The retention of performance for WT (white bars) and VACHT KD<sup>HET</sup> mice (gray bars) on the rotarod was evaluated by plotting the difference between the last trial of the 8th day and the first trial of the 18th. Statistical analysis shows no difference in performance retention for the two genotypes ( $t=0.3891$   $df=30$   $p=0.6999$ ).



**Figure 4: Memory deficits in VACHT KD mice are selective to recency memory.** (a) VACHT KD<sup>HET</sup> (gray bars) and VACHT KD<sup>HOM</sup> mice (black bars) present impairments in the object temporal order memory (one-way Anova comparing exploration of objects A and B on the trial  $F(5,42)=0.8969$ ,  $p=0.4921$ ,  $n=8$ ;  $F(5,42)=0.9633$ ,  $p=0.4511$ ,  $n=8$  respectively for VACHT KD<sup>HET</sup> and VACHT KD<sup>HOM</sup>), whereas WT mice (white bars) show no deficit in the temporal order version of object recognition ( $F(5,42)=20.43$ ,  $*p<0.001$ ,  $n=8$ .) (b) In the Morris Water maze task, WT mice and VACHT KD<sup>HET</sup> are able to learn the location of the

platform after five days or training. Data represent mean  $\pm$  SEM, WT, n=8, VACHT KD<sup>HET</sup>, n=13, p<0.05. **(d)** In the probe test of the Morris Water maze, we find no difference between WT (n=8) and VACHT KD<sup>HET</sup> (n=13) performance, which was evaluated by the time spent in the target quadrant (p=0.88). **(f)** VACHT KD mice have intact spatial working memory, measured by percent alternation in Y maze. Data represent mean  $\pm$  SEM of alternation (WT, n=18; KD<sup>HET</sup>, n=14; KD<sup>HOM</sup>, n=9; F(2,38)=0.3032). **(g)** There is no difference in the number of arms entered in the Y maze, between WT and VACHT KD mice, F(2,38)=0.3378.

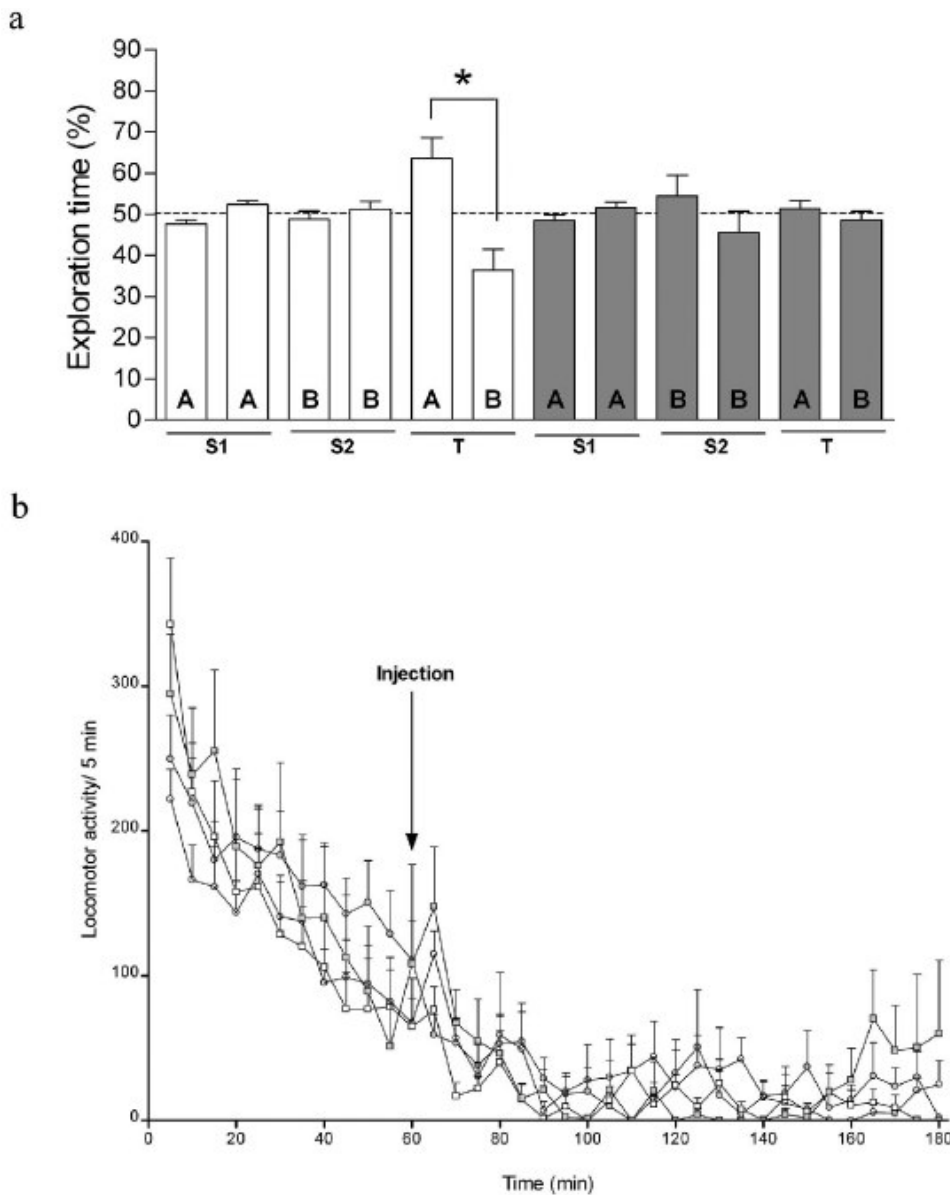


**Figure 5: Increased cholinergic tone prior to encoding reverses deficit in**

**recognition memory in VACHT KD mice.** In all sets, data represent mean  $\pm$  SEM of exploration time; letters A and B represent the object; S1, S2 and T represent sample 1, sample 2 and test session, respectively. A dose response effect of galantamine was obtained. **(a)** At 0.5mg/kg, galantamine has no effect on the performance of WT (white bars, F(5,42)=8.538, \*p<0.001, n= 8) neither in VACHT KD<sup>HET</sup> (gray bars, F(5,36)=0.2597, n=7) exploration times in the trial session as these results are identical to experiments performed after saline injection (not shown). **(b)** Galantamine at 1mg/kg does not alter the performance of WT mice (white bars, F(5,60)=27.90, \*p<0.001, n=11) but the drug improved the performance VACHT KD<sup>HET</sup> (gray bars, F(5,60)=26.19, \*p<0.001, n=11) on

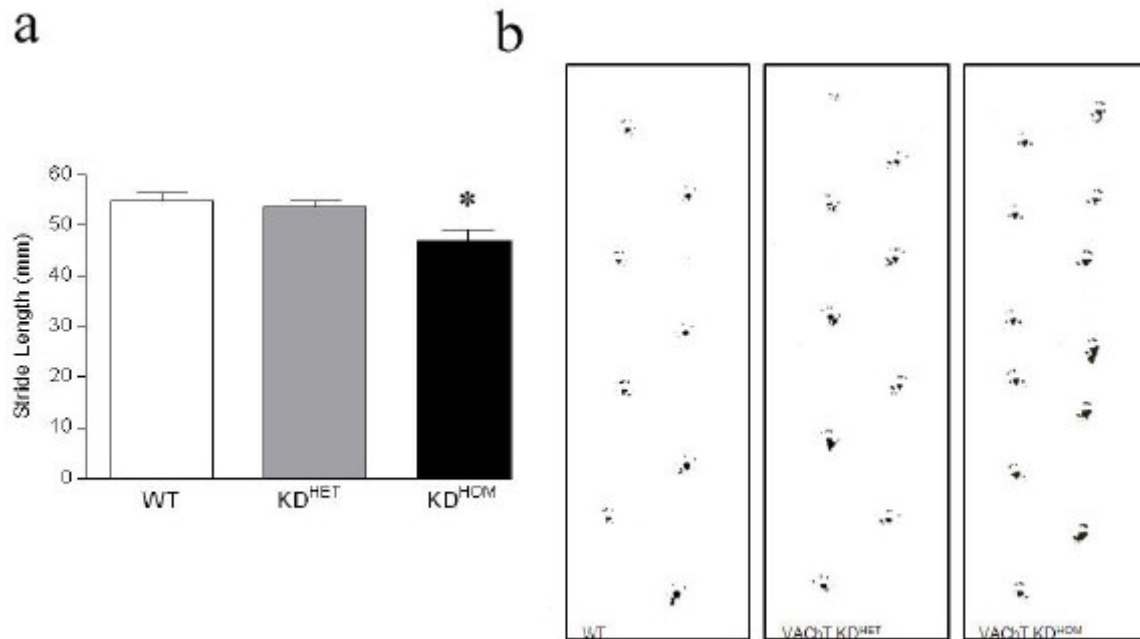
the trial session **(c)** At 3mg/kg, galantamine had a similar effect and enhanced old object exploration time of VChT KD<sup>HET</sup> mice (gray bars,  $F(5,48)=16.36$ ,  $*p<0.001$ ,  $n=9$ ) and does not modify the performance of WT mice (white bars,  $F(5,54)=12.62$ ,  $*p<0.001$ ,  $n=10$ ). **(d)** Donepezil, at 0.5mg/kg, improved temporal object order memory of VChT KD<sup>HET</sup> mice (gray bars,  $F(5,30)=2.625$ ,  $*p<0.05$ ,  $n=6$ ), but does not alter performance of WT mice (white bars,  $F(5,30)=19.73$ ,  $*p<0.001$ ,  $n=6$ ). Saline injection prior to encoding also does not affect recognition memory in both genotypes when compared to non-injected animals (not shown).





**Figure 6: Increased cholinergic tone during retrieval does not facilitate object recognition memory in VChT KD mice. (a)** Galantamine, 1mg/kg, administered 30 min before test (T), i.e. just after retrieval of memory trace, has no effect on the recognition memory of WT or VChT KD<sup>HET</sup> mice in temporal object order memory task. Data represent mean  $\pm$  SEM of exploration times; letters A and B represent the object; S1, S2 and T represent sample 1, sample 2 and test session, respectively. WT (white bars,  $F(5,42)=7.408$ ,  $*p<0.001$ ,  $n= 8$ ) and KD<sup>HET</sup> (gray bars,  $F(5,42)=0.8969$ ,  $n=8$ ) **(b)** Exploratory activity of WT and VChT KD<sup>HET</sup> mice is not different and galantamine at

1mg/kg does not alter spontaneous locomotor activity of WT (white bars, n=8) or VACHT KD<sup>HET</sup> mice (gray bars, n=8) [F(105,972)=0.8235].



**Supplemental Figure 1. Gait analysis of VACHT KD mice.** (a) Stride length (mean  $\pm$  SEM) for WT (white bar), VACHT KD<sup>HET</sup> (gray bar) and VACHT KD<sup>HOM</sup> (dark bar) was measured between two steps from the same leg. VACHT KD<sup>HOM</sup> mice have significant shorter steps. (b) Representative examples of foot prints for WT, VACHT KD<sup>HET</sup> and VACHT KD<sup>HOM</sup> mice.

# 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](#)