

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

Maria Vaitsa Loch Haskel

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS NEUROPROTETORES DA TAURINA EM MODELO ANIMAL DE NEUROINFLAMAÇÃO, E DO PAPEL DO RECEPTOR IONOTRÓPICO GLICINÉRGICO NA RECONSOLIDAÇÃO DE MEMÓRIA ESPACIAL

Porto Alegre

2020

Maria Vaitsa Loch Haskel

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS NEUROPROTETORES DA TAURINA EM MODELO ANIMAL DE NEUROINFLAMAÇÃO, E DO PAPEL DO RECEPTOR IONOTRÓPICO GLICINÉRGICO NA RECONSOLIDAÇÃO DE MEMÓRIA ESPACIAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Weber Cláudio Francisco Nunes da Silva

Porto Alegre

2020

CIP - Catalogação na Publicação

Haskel, Maria Vaitsa Loch

Avaliação dos efeitos neuroprotetores da taurina em modelo animal de neuroinflamação, e do papel do receptor ionotrópico glicinérgico na reconsolidação de memória espacial / Maria Vaitsa Loch Haskel. -- 2020. 89 f.

Orientador: Weber Cláudio Francisco Nunes da Silva.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Sistema Nervoso Central. 2. Doenças Neurodegenerativas. 3. Taurina. 4. Memória Espacial. 5. Neuroinflamação. I. da Silva, Weber Cláudio Francisco Nunes, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Maria Vaitsa Loch Haskel

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS NEUROPROTETORES DA TAURINA EM MODELO ANIMAL DE NEUROINFLAMAÇÃO, E DO PAPEL DO RECEPTOR IONOTRÓPICO GLICINÉRGICO NA RECONSOLIDAÇÃO DE MEMÓRIA ESPACIAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Fisiologia.

Aprovada em 27 de novembro de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Prof. Dr. Cristóforo Scavone – Universidade de São Paulo – USP

Profa. Dra. Jociane de Carvalho Myskiw – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS

Prof. Dr. Weber Cláudio Francisco Nunes da Silva (Orientador)

Aos meus pais, Nirto Pedro Haskel e Silvia Loch Haskel, este título é de vocês!

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que eu alcançasse este título, no entanto, durante minha trajetória algumas pessoas foram essenciais, sem as quais nada teria acontecido!

Início pelos meus pais, Nirto Pedro Haskel e Silvia Loch Haskel, que por mais alto que eu quisesse voar, sempre me deram a segurança de que eu teria para onde voltar e são os responsáveis pela pessoa e profissional que me tornei. Pai e mãe, obrigada por tudo!

Aos meus irmãos, Hudison e Lidiane, e à minha cunhada Rosane, obrigada por darem sentido à palavra alicerce, vocês são os meus!

À professora Juliana, que confiou no meu trabalho e me concedeu as primeiras oportunidades no meio acadêmico e ao meu orientador, professor Weber pelo conhecimento compartilhado ao longo de todos estes anos de convivência.

A todos os alunos de iniciação científica e de extensão dos laboratórios de Neuropsicofarmacologia e de Neurociências e Comportamento da UNICENTRO, seja pelo auxílio durante as longas horas de experimentos ou seja por uma simples conversa ou café durante o intervalo, vocês deixaram tudo mais leve! Em especial, agradeço ao Vinícius e à Letícia, meus “fiéis escudeiros” nos finais de semana, férias e feriados no laboratório.

Aos meus amados amigos, que foram capazes de me compreender e ajudar nos momentos mais difíceis, Giovana Isabel, Felipe Nathanael, Daniele, Priscila, Daiane, Luana, Leandro e especialmente ao Silvio, colega de turma que em tantos momentos pude contar.

Ao PPG-Fisiologia, por todo o crescimento e aprendizado que me proporcionou, tenho muito orgulho de ser “filha” da UFRGS!

Ao CNPq pelo fomento da minha Bolsa de Pesquisa, sem a qual teria sido impossível realizar este trabalho. E por fim, agradeço à melhor companheira de apartamento que eu poderia ter, que trouxe luz aos dias mais escuros e esteve presente durante a escrita da dissertação, Josefa, minha porquinha-da-índia de estimação! Muito obrigada!

Baby, compra o jornal
E vem ver o sol
Ele continua a brilhar
Apesar de tanta barbaridade
Baby, escuta o galo cantar
A aurora dos nossos tempos
Não é hora de chorar
Amanheceu o pensamento
O poeta está vivo
Com seus moinhos de vento
A impulsionar
A grande roda da história
Mas quem tem coragem de ouvir
Amanheceu o pensamento
Que vai mudar o mundo
Com seus moinhos de vento
Se você não pode ser forte
Seja pelo menos humana
Quando o papa e seu rebanho chegar
Não tenha pena
Todo mundo é parecido
Quando sente dor
Mas nu e só ao meio dia
Só quem está pronto pro amor
O poeta não morreu
Foi ao inferno e voltou
Conheceu os Jardins do Éden
E nos contou

(Barão Vermelho – O Poeta Está Vivo –
Escrita por Dulce Quental)

RESUMO

Doenças neurodegenerativas são causas comuns e frequentes de morbidade e mortalidade, afetando milhões de pessoas em todo o mundo, e embora apresentem sintomas, evolução clínica e fisiopatologias diferentes, tais doenças apresentam um mecanismo subjacente em comum, a neuroinflamação. Apesar de a neuroinflamação ser uma resposta inicialmente protetora do sistema nervoso central (SNC), ao tornar-se crônica pode acarretar dano neuronal, uma vez que as citocinas liberadas pela micróglia potencializam a morte celular por excitotoxicidade, e esta, por sua vez, promove a liberação de mediadores pró-inflamatórios, gerando assim, um ciclo autossustentado de resposta neuroinflamatória, que favorece a neurodegeneração. Diante do fato de que até o momento não existem ainda alternativas terapêuticas capazes de interromper a neurodegeneração, o objetivo do presente estudo foi avaliar o possível efeito neuroprotetor da taurina, um agonista parcial do receptor ionotrópico glicinérgico e do receptor gabaérgico GABA_A, em um modelo animal de neuroinflamação. Para isto, os experimentos foram divididos em duas etapas. Na primeira, foram avaliados os efeitos da administração por via oral de taurina sobre o prejuízo mnemônico causado pela neuroinflamação induzida por LPS em ratos Wistar machos. Tais efeitos foram avaliados na memória espacial de longa duração recente e remota e na memória aversiva por meio das tarefas comportamentais do Labirinto Aquático de Morris (LAM) e do medo condicionado ao contexto (MCC), respectivamente. Na segunda etapa, foram avaliados os efeitos da infusão intra-hipocampal de taurina e de glicina na reconsolidação da memória espacial de longa duração recente e remota, avaliados na tarefa comportamental do LAM. Os resultados obtidos demonstraram que a taurina, quando administrada por via oral, pelo período de 30 dias, nas doses de 20 mg/kg e 200 mg/kg, foi capaz de reverter o prejuízo mnemônico causado pela neuroinflamação na memória espacial de longa duração recente e remota, e na dose de 200 mg/kg foi capaz de reverter o prejuízo mnemônico causado pela neuroinflamação na memória aversiva. Já os resultados obtidos a partir da infusão intra-hipocampal de taurina e de glicina demonstraram que a taurina na dose de 100 nmol/lado prejudicou a reconsolidação da memória espacial de longa duração recente e remota, enquanto que na dose de 10 nmol/lado prejudicou apenas a reconsolidação da memória espacial de longa duração remota. Já a glicina prejudicou a reconsolidação da memória espacial de longa duração recente e remota apenas quando infundida na dose de 10 nmol/lado. Concluímos então que a glicina agindo *in loco* na região CA1 hipocampal exerce um efeito farmacológico em U, que pode ser explicado pela sua ação concomitante no sítio co-agonista de receptores NMDA, pelas diferenças de afinidade dela a estes diferentes alvos, e pela diferença de densidade desses receptores nesta região cerebral. Já a taurina, quando administrada por via oral em situações patológicas caracterizadas por quadros neuroinflamatórios, como o induzido neste estudo, pode exercer efeito neuroprotetor dose-dependente por estar agindo em um cenário excitotóxico, justificando estudos posteriores que investiguem o potencial translacional da taurina como uma possível ferramenta terapêutica em doenças que afetam o SNC e que apresentam a neuroinflamação como mecanismo subjacente.

Palavras-chave: Sistema Nervoso Central; Doenças Neurodegenerativas; Taurina; Memória Espacial; Neuroinflamação.

ABSTRACT

Neurodegenerative diseases are common and frequent causes of morbidity and mortality, affecting millions of people worldwide, and although they present different symptoms, clinical evolution and pathophysiology, these diseases have a common underlying mechanism, neuroinflammation. Although neuroinflammation is an initially protective response of the central nervous system (CNS), when it becomes chronic it can cause neuronal damage, since the cytokines released by microglia increase cell death due to excitotoxicity, and this, in turn, promotes the release of pro-inflammatory mediators, thus generating a self-sustained cycle of neuroinflammatory response, which favors neurodegeneration. In view of the fact that so far there are no therapeutic alternatives being able to interrupt neurodegeneration, the objective of the present study was to evaluate the possible neuroprotective effect of taurine, an agonist of the glyceric ionotropic receptor and the GABA_A receptor, in an animal model of neuroinflammation. For this, the experiments were divided into two stages. In the first one, the effects of oral administration of taurine on the mnemonic damage caused by LPS-induced neuroinflammation in male Wistar rats were evaluated. Such effects were assessed in recent and remote long-term spatial memory and aversive memory through the behavioral tasks of the Morris Water Maze (MWM) and context-conditioned fear (CCF), respectively. In the second stage, the effects of intra-hippocampal infusion of taurine and glycine on the reconsolidation of recent and remote long-term spatial memory were evaluated, assessed in the behavioral task of MWM. The results obtained showed that taurine, when administered orally, for a period of 30 days, in doses of 20 mg/kg and 200 mg/kg, was able to reverse the mnemonic damage caused by neuroinflammation in recent long-term spatial memory and remote, and at a dose of 200 mg/kg it was able to reverse the mnemonic damage caused by neuroinflammation in aversive memory. The results obtained from the intra-hippocampal infusion of taurine and glycine demonstrated that taurine at a dose of 100 nmol/side impaired the reconsolidation of recent and remote long-term spatial memory, while at a dose of 10 nmol/side it only affected the reconsolidation of remote long-term spatial memory. Glycine, on the other hand, impaired the reconsolidation of long-term and remote spatial memory only when infused at a dose of 10 nmol / side. We conclude then that glycine acting in situ in the hippocampal CA1 region exerts a pharmacological effect on U, which can be explained by its concomitant action on its NMDA receptor co-agonist site, by the differences in its affinity to these different targets, and by the difference in the density of these receptors in this brain region. Taurine, on the other hand, when administered orally in pathological situations characterized by neuroinflammatory conditions, such as the one induced in this study, can exert a dose-dependent cognitive neuroprotective effect because it is acting in an excitotoxic background, justifying further studies that will investigate the translational potential of taurine as a possible therapeutic tool in diseases that affect the CNS and that present neuroinflammation as an underlying mechanism.

Keywords: Central Nervous System; Neurodegenerative Diseases; Taurine; Spatial Memory; Neuroinflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 — Circuito sináptico hipocampal envolvido na formação da memória declarativa.....	19
Figura 2— Reconsolidação de Memória	22
Figura 3 — Ativação da micróglia.....	27
Figura 4 — Vias de sinalização intracelular ativadas pelos TLRs envolvidas na neuroinflamação.....	31
Figura 5 — Estrutura e formação da Taurina	34
Figura 6 — Desenho Experimental – Primeira Etapa.....	38
Figura 7 — Desenho Experimental – Segunda Etapa.....	39
Figura 8 — Labirinto Aquático de Morris	44
Figura 9 — Câmara de condicionamento de medo	46
Figura 10 — Infusão de fármacos através de cânulas-guia implantadas por meio de cirurgia estereotáxica	47
Figura 11 — Efeitos da taurina administrada por via oral no prejuízo mnemônico causado pela neuroinflamação na memória espacial de longa duração recente	50
Figura 12 — Efeitos da taurina administrada por via oral no prejuízo mnemônico causado pela neuroinflamação na espacial de longa duração remota.....	53
Figura 13 — Efeitos da taurina, administrada por via oral no prejuízo mnemônico causado pela neuroinflamação na memória aversiva	55
Figura 14 — Efeitos da infusão intra-hipocampal de glicina na reconsolidação da memória espacial de longa duração recente e remota.....	57
Figura 15 — Efeitos da infusão intra-hipocampal de taurina na reconsolidação da memória espacial de longa duração recente e remota.....	60
Figura 16 — Controle Infusão	63
Figura 17 — Controle Reforço.....	66
Figura 18 — Controle Temporal	68
Figura 19 — Controle Estrutura.....	70

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ache – Acetilcolinesterase

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

AP – Ântero-posterior

AP-1 – Proteína ativadora 1

Arg-1 – Arginase-1

AVE – Acidente vascular encefálico

BHE – Barreira hematoencefálica

BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro

CaMKII – Proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina

CD206 – Receptor de manose

CEUA – Comitê de Ética em Uso de Animais

cm – Centímetro

CREB – Proteína ligante ao elemento responsivo ao AMPc

DA – Doença de Alzheimer

DAMPs – moléculas endógenas provenientes de danos teciduais

DFT – Demência frontotemporal

DP – Doença de Parkinson

DV – Dorsoventral

ELA – Esclerose lateral amiotrófica

ELK1 – *Like-1 protein*

EROs – Espécies reativas de oxigênio

ETS – Fator de transcrição *Erythroblast Transformation Specific*

FIZZ -1 – Achada em zona inflamatória-1

GABA – Ácido gama amino-butírico

Glut 4 – Transportador de glicose 4

Gpx – Glutaciona peroxidase

GSH – Glutaciona reduzida

Glyr – Receptor de glicina

h – Hora (s)

IFN- α – Interferon alfa

IFN- β – Interferon beta

IFN- γ - Interferon gama

IGF-1 – Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

IL-1 α – Interleucina-1 α

IL-1 β – Interleucina-1 β

IL-4 – Interleucina-4

IL-5 – Interleucina-5

IL-6 – Interleucina-6

IL-10 – Interleucina-10

IL-13 – Interleucina-13

INCL LL – Inclinação látero-lateral

iNOS – Óxido nítrico sintase induzida

IRF3 – Fator de resposta ao Interferón-3

IRF7 – Fator de resposta ao Interferón-7

KA – Receptor kainato

kg – quilograma

l – litro

LAM – Labirinto Aquático de Morris

LPB – Proteína ligante do LPS

LPS – Lipopolissacarídeo

LTP – Potenciação de Longa Duração

mA – Miliampère

MCC – Medo condicionado ao contexto

MD – Médio-lateral

MD-2 – Proteína mioide diferenciadora 2

mg – miligrama

mm – milímetro

NMDA – N-metil D-aspartato

nmol – nanomol

NO – Óxido nítrico

PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos

PEPSs – Potenciais excitatórios pós-sinápticos

PKC – Proteína quinase C

PRR – Receptores de reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos

RMf – Ressonância Magnética Funcional

RNAm – RNA mensageiro

SHMT – Serina hidroximetiltransferase

SNC – Sistema nervoso central

SOS – Superóxido dismutase

TauT – Transportador de Taurina

TCE – Traumatismo crânio-encefálico

TGF- β – Fator transformador de crescimento β

TLRs – Receptores Toll Like

TLR4 – Receptor Toll Like 4

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

UNICENTRO – Universidade Estadual do Centro-Oeste

vs – versus

Ym1 – Citocina quimiotática de eosinófilo

ZIF 268 – Fator de transcrição “dedos de zinco” 268

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	MEMÓRIA	18
2.1.1	Memória espacial	23
2.1.2	Memória aversiva	24
2.2	NEUROINFLAMAÇÃO E EXCITOTOXICIDADE.....	26
2.3	LPS E RECEPTORES TOLL LIKE	30
2.4	GLICINA E RECEPTOR GLICINÉRGICO.....	32
2.5	TAURINA.....	34
3	OBJETIVOS	37
3.1	OBJETIVO GERAL	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4	METODOLOGIA	38
4.1	DESENHO EXPERIMENTAL.....	38
4.2	ANIMAIS EXPERIMENTAIS E ASPECTOS ÉTICOS	40
4.3	CIRURGIA ESTEREOTÁXICA.....	42
4.4	AVALIAÇÃO DA MEMÓRIA ESPACIAL – LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS	43
4.5	AVALIAÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA – MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO	45
4.6	INFUSÃO INTRA-HIPOCAMPAL DE FÁRMACOS.....	46
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
5	RESULTADOS	49
5.1	EFEITOS DA TAURINA, ADMINISTRADA POR VIA ORAL SOBRE O PREJUÍZO MNEMÔNICO CAUSADO PELA NEUROINFLAMAÇÃO NA MEMÓRIA ESPACIAL DE LONGA DURAÇÃO RECENTE E REMOTA EM RATOS.....	49
5.2	EFEITOS DA TAURINA, ADMINISTRADA POR VIA ORAL SOBRE O PREJUÍZO MNEMÔNICO CAUSADO PELA NEUROINFLAMAÇÃO NA MEMÓRIA AVERSIVA	54

5.3 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRA-HIPOCAMPAL DE GLICINA NA RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA ESPACIAL DE LONGA DURAÇÃO RECENTE E REMOTA.....	56
5.4 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRA-HIPOCAMPAL DE TAURINA NA RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA ESPACIAL DE LONGA DURAÇÃO RECENTE E REMOTA.....	59
5.5 CONTROLES EXPERIMENTAIS	62
5.5.1 Controle Infusão	62
5.5.2 Controle Reforço	65
5.5.3 Controle Temporal.....	68
5.5.4 Controle Estrutura	70
6 DISCUSSÃO.....	73
7 CONCLUSÃO.....	79
8 REFERÊNCIAS	81
9 ANEXOS.....	88
9.1 ANEXO I - APROVAÇÃO CEUA	88

1 INTRODUÇÃO

Doenças neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer (DA), Doença de Parkinson (DP), Demência frontotemporal (DFT) e Doença de Huntington (DH), entre outras, são causas comuns e crescentes de morbidade, prejuízo cognitivo e mortalidade entre idosos. Estima-se que somente a DA, a causa mais frequente de demência afete cerca de 24 milhões de pessoas em todo o mundo (ERKKINEN; KIM; GESCHWIND, 2018).

Além das doenças neurodegenerativas, outras patologias que afetam o sistema nervoso central (SNC), como acidente vascular encefálico (AVE), infecções virais e desordens paraneoplásicas também são caracterizadas pela ocorrência de dano neuronal, que frequentemente é associado com a ativação crônica da resposta imunológica inata do SNC (STEPHENSON et al., 2018).

Diante da ocorrência de uma lesão neuronal, a micróglia, que é composta por células imunológicas residentes no SNC, que participam da imunidade inata, primeira linha de defesa contra um agente agressor, é ativada. Dependendo do estímulo e da magnitude de sua ativação, a micróglia pode secretar citocinas e fatores pró-inflamatórios que aumentam a citotoxicidade ou citocinas anti-inflamatórias, que auxiliam na cicatrização e no reparo tecidual. Desta forma, a ativação microglial excessiva lesiona o tecido neural saudável circundante e a morte neuronal por sua vez, estimula a ativação crônica da micróglia, causando perda neuronal progressiva, conforme acontece em diversas doenças neurodegenerativas (SUBHRAMANYAM et al., 2019).

Nestas doenças, os mecanismos de imunidade inata e adaptativa do SNC não são capazes de combater os fatores que desencadearam a patologia, criando assim um ambiente autossustentável em que a neuroinflamação torna-se crônica (OLMOS; LLADÓ, 2014), de modo que esta torna-se um dos principais fatores que contribui para a progressão da neurodegeneração (RANSOHOFF, 2016).

Tendo em vista que a ativação da micróglia promove a liberação de diversos mediadores inflamatórios, dentre eles o Interferon- γ (IFN- γ), que aumenta a excitotoxicidade glutamatérgica mediada pelos receptores alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e que a própria micróglia quando ativada libera

glutamato, um dos principais fatores neurotóxicos nestas condições (SUZUMURA, 2013), fármacos de ação hiperpolarizante constituem uma possível alternativa terapêutica com potencial efeito neuroprotetor (WALLACE et al., 2011).

Diante disto, considerando que até o momento não existem tratamentos eficazes contra doenças neurodegenerativas como a DA, DFT, DP, DH, esclerose lateral amiotrófica (ELA) e outras patologias que afetam o SNC gerando quadros neurinflatórios subjacentes (ERKKINEN; KIM; GESCHWIND, 2018), (RALLI et al., 2019) e que nenhuma alternativa terapêutica é capaz de interromper a neurodegeneração (RANSOHOFF, 2016), o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos neuroprotetores da taurina em um modelo animal de neuroinflamação e o papel do receptor ionotrópico glicinérgico na reconsolidação da memória espacial de longa duração.

Para isto, avaliamos inicialmente os efeitos da administração por via oral de taurina, um agonista parcial endógeno do receptor de glicina e do receptor GABA_A (LE-CORRONC et al., 2011) sobre o prejuízo mnemônico causado pela neuroinflamação induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em ratos e em seguida, avaliamos os efeitos da administração intra-hipocampal bilateral de taurina e de glicina na memória espacial de longa duração recente e remota em ratos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MEMÓRIA

A memória é um dos mais importantes processos cognitivos, uma vez que é responsável pela nossa individualidade e apresenta uma íntima relação com outras funções cognitivas importantes, como o aprendizado (ALBERTO; JÚNIOR; FARIA, 2015). Pode ser definida como o processo pelo qual algo que foi aprendido é codificado, armazenado e posteriormente evocado. Já o aprendizado refere-se à aquisição de conhecimentos acerca do mundo, que resulta em mudanças de comportamento (KANDEL et al., 2014). Existem diversos tipos de memória, com envolvimento de áreas cerebrais e mecanismos subjacentes distintos, podendo as memórias serem classificadas de acordo com o curso temporal de armazenamento em memórias de curto e de longo prazo, e, de acordo com a natureza das informações armazenadas, em memórias declarativas e não declarativas (KANDEL et al., 2014), (FERNÁNDEZ; MORRIS, 2018).

Existe também a memória de trabalho, que mantém representações atuais e transitórias de conhecimentos importantes para a realização de certos objetivos, e o seu tempo de duração é de poucos segundos. A memória de curta duração (curto prazo), por sua vez, tem duração em torno de 30 minutos a 6 horas, e a memória de longa duração (longo prazo) pode perdurar por longas horas, dias ou anos (IZQUIERDO et al., 2013).

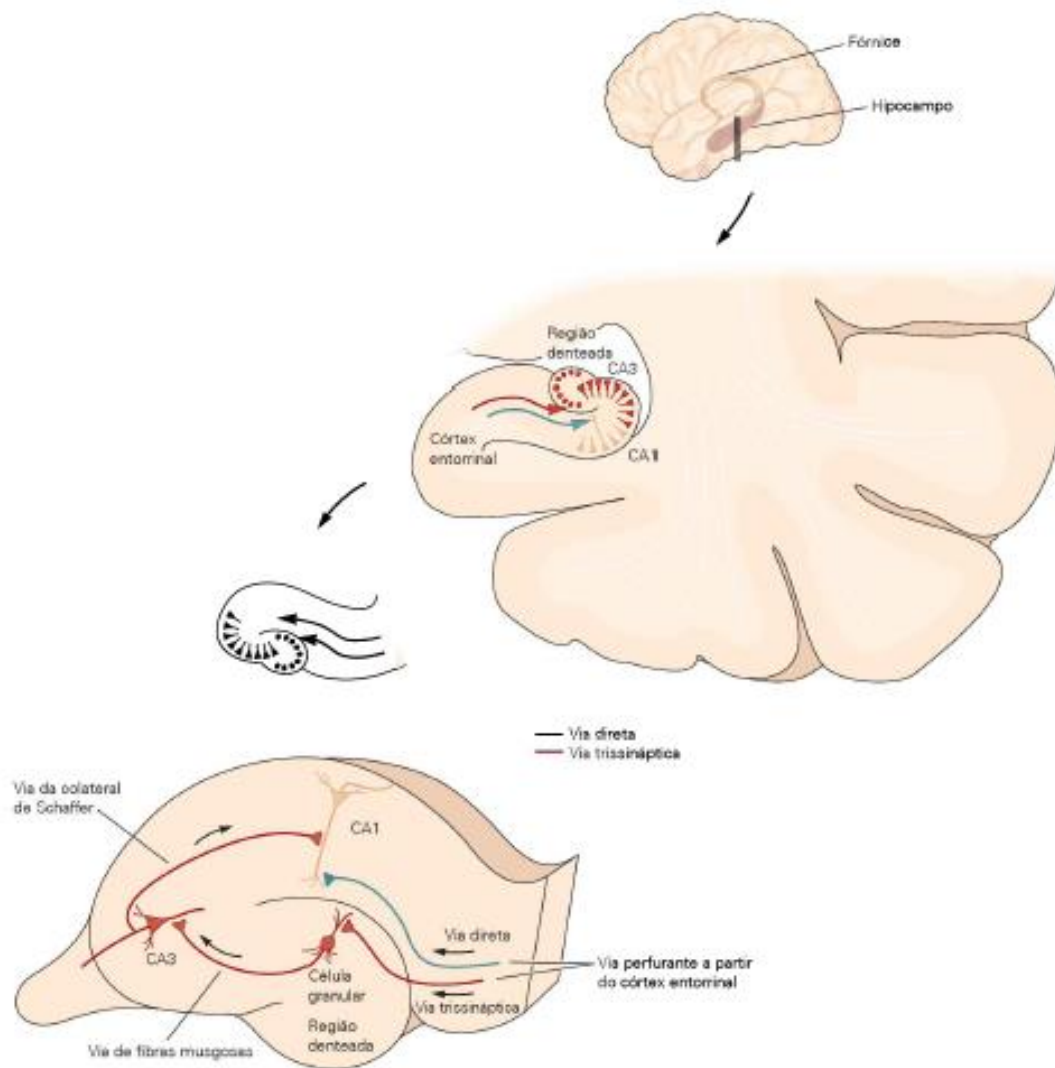
A memória de longo prazo pode ser subdividida em memória não declarativa (implícita ou de procedimentos), caracterizada por manifestar-se de maneira automática, com pouco processamento consciente por parte do indivíduo, e em memória declarativa (explícita), caracterizada pela evocação consciente de experiências prévias. A memória declarativa pode ser classificada ainda em episódica (memória de experiências pessoais) e em memória semântica (memória para fatos e conceitos) (KANDEL et al., 2014).

A memória declarativa, de evocação consciente, é o que as pessoas normalmente entendem por memória quando se fala sobre, e sua formação é

mediada por pelo menos quatro processos distintos: codificação, armazenamento, consolidação e evocação (KANDEL et al., 2014).

Várias regiões cerebrais distintas estão envolvidas na formação dos diferentes tipos de memória, e o hipocampo é uma estrutura crítica para a codificação e o armazenamento da memória declarativa. O hipocampo recebe sinais sensoriais multimodais e informações espaciais do córtex entorrinal por meio de duas vias excitatórias, chamadas vias perfurantes. A primeira via, chamada via direta, projeta seus axônios diretamente da camada III do córtex entorrinal para neurônios piramidais da região CA1, principal via eferente do hipocampo. Já a segunda via, via indireta ou via trissináptica, tem origem na camada II do córtex entorrinal e seus axônios se projetam por meio da via perfurante para as células granulares do giro denteado e daí para a região CA3 do hipocampo por meio da via das fibras musgosas. Da região CA3, os neurônios, por meio da via das colaterais de Schaffer, finalmente fazem sinapses com a região CA1 (KANDEL et al., 2014). A figura 1 ilustra o circuito sináptico hipocampal, envolvido na formação da memória declarativa.

Figura 1 — Circuito sináptico hipocampal envolvido na formação da memória declarativa



Fonte: Kandel et al. (2014). As informações vindas do córtex entorrinal chegam aos neurônios piramidais de CA1, principal via eferente do hipocampo, através da via perfurante por meio de sinais de entrada diretos e indiretos. Na via direta, neurônios da camada III do córtex entorrinal fazem sinapses excitatórias diretamente com neurônios piramidais de CA1. Na via indireta (trissináptica), neurônios da camada II do córtex entorrinal excitam células granulares do giro dentado e estas, por sua vez, fazem sinapses excitatórias com células da região CA3 do hipocampo. Da região CA3, neurônios projetam-se fazendo sinapses excitatórias com células piramidais de CA1.

A consolidação é o processo pelo qual uma memória temporária e lábil é transformada em uma memória estável e duradoura (TONEGAWA; MORRISSEY; KITAMURA, 2018) e envolve a participação de regiões cerebrais distintas (ALBERINI, 2005). É um fenômeno tempo-dependente, que ocorre após a aquisição (NADER; HARDT, 2009) e que depende do aumento da eficiência sináptica, que possibilita o fortalecimento de conexões entre neurônios específicos (LYNCH, 2004b).

A consolidação de memórias declarativas requer alterações bioquímicas que envolvem a ativação de enzimas específicas, a transcrição gênica e a síntese de proteínas que se incorporam às sinapses intra-hipocâmpais e entre o hipocampo e outras regiões, alterando o seu funcionamento. Dentre tais proteínas reguladoras, destaca-se o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), que atua na formação de memórias e determina seu tempo de duração, através de estímulos dopaminérgicos (IZQUIERDO et al., 2013). Assim, a plasticidade sináptica, que pode ser definida como mudanças físicas nas conexões ou morfologia neuronal em decorrência de estímulos externos (LEE, 2009) tem papel central na consolidação de memórias (LYNCH, 2004b).

Um dos mecanismos de plasticidade sináptica mais estudados é a potenciação de longa duração (LTP) (LYNCH, 2004b). A LTP é um aumento de longa duração na amplitude dos potenciais excitatórios pós-sinápticos (PEPSs) e acontece em diferentes formas em todas as vias sinápticas hipocâmpais, bem como em outras regiões corticais e está intimamente envolvida com a formação da memória de longa duração (KANDEL et al., 2014), (LYNCH, 2004b), (BEVILAQUA et al., 2008).

Na região CA1 do hipocampo, a indução da LTP requer inicialmente a ativação dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos do tipo alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e N-metil D-aspartato (NMDA), e também dos receptores metabotrópicos, nas sinapses das células piramidais. A ativação dos receptores AMPA despolariza a membrana celular, o que leva ao desbloqueio dos sítios de ligação de glutamato nos receptores NMDA, que ao serem ativados ocasionam a entrada de Ca^{2+} para o meio intracelular. Este aumento da $[Ca^{2+}]_i$ próximo a membrana sináptica estimula a fosforilação dos receptores AMPA e de outros receptores de glutamato por meio da atividade da proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina (CaMKII) (BEVILAQUA et al., 2008).

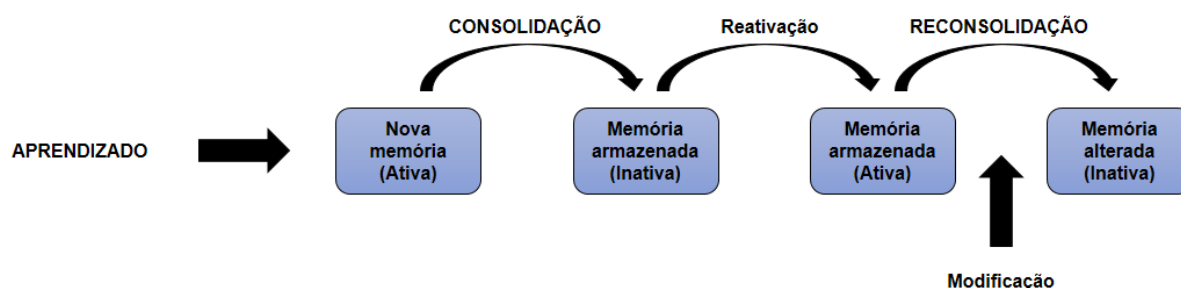
Além disso, a transmissão glutamatérgica também é aumentada pela atividade da proteína quinase C (PKC) estimulada pelo aumento da $[Ca^{2+}]_i$ pré-sináptica, que leva a fosforilação da proteína GAP-43 e estimula a mobilização de vesículas sinápticas. Ainda, a PKC pós-sináptica medeia a fosforilação de receptores de glutamato e da proteína ligante ao elemento responsivo ao AMPc

(CREB), um fator de transcrição constitutivo responsável pela síntese de mRNA e de proteínas necessárias para a plasticidade sináptica (BEVILAQUA et al., 2008) e envolvido na formação da memória de longa duração (KANDEL et al., 2014), (NADER; HARDT, 2009).

Uma vez consolidadas, as memórias tornam-se estáveis. No entanto, quando reativadas, podem tornar-se lábeis novamente e suscetíveis a modificações, em um processo conhecido como reconsolidação. A reconsolidação permite que memórias sejam fortalecidas, enfraquecidas ou atualizadas, e é de extrema importância clínica, uma vez que a habilidade de modificar memórias emocionais já estabilizadas tem demonstrado importantes implicações no tratamento de várias doenças mentais, como a síndrome do estresse pós-traumático, ansiedade e uso de drogas (SCHWABE; NADER; PRUESSNER, 2014).

Assim como acontece durante a consolidação, após a reativação, para que uma memória seja reconsolidada, é necessário que ocorram mudanças sinápticas e nova síntese proteica. Desta forma, tanto a consolidação como a reconsolidação são períodos transitórios de instabilidade na formação de uma memória, sendo que a consolidação ocorre após a aquisição de uma nova informação e a reconsolidação após a reativação de uma memória já consolidada (NADER; HARDT, 2009). A figura 2 ilustra brevemente o conceito de reconsolidação.

Figura 2— Reconsolidação de Memória



Fonte: Adaptado de Schwabe, Nader e Pruessner (2014). Após o aprendizado, a memória permanece em um estado ativo e lábil até ser consolidada. Após consolidada, a memória é armazenada em um estado inativo e ao ser reativada, passa novamente por um estado lábil, sujeito a modificações e é reconsolidada, retornando assim a um estado inativo.

Em modelos animais, a reconsolidação é estudada a partir de intervenções após a reativação da memória, e as evidências indicam que embora a consolidação

e a reconsolidação envolvam mecanismos moleculares parecidos, estes processos não são idênticos. Assim como no processo de consolidação, a síntese de mRNA e de proteínas é necessária após a reativação para que a memória possa ser estabilizada novamente na reconsolidação (DA SILVA et al., 2008), (TRONSON; TAYLOR, 2007).

Outra semelhança entre os mecanismos de consolidação e de reconsolidação é a ativação de fatores de transcrição que levam a síntese proteica, dentre eles a proteína ligante ao elemento responsivo ao AMPc (CREB), o fator de transcrição *Erythroblast Transformation Specific (ETS) Like-1 protein* (ELK1) e o fator nuclear kappa B (NF-kB) (TRONSON; TAYLOR, 2007). No entanto, a distinção molecular entre os processos se dá principalmente pela ativação do fator de transcrição “dedos de zinco” 268 (ZIF 268) e de genes precoces imediatos que estão seletivamente envolvidos na reconsolidação (LEE, 2009), (TRONSON; TAYLOR, 2007).

2.1.1 Memória espacial

A informação espacial representa um desafio singular para a memória, visto que pessoas e animais precisam constantemente atualizar informações acerca de sua percepção espacial para localizar objetos e elaborar rotas (GIBSON; MAIR, 2016). Assim, a memória espacial é uma memória declarativa que requer alta demanda de capacidade, uma vez que as memórias precisam ser distintas para serem evocadas sem interferência e a codificação deve ser rápida (MOSER; ROWLAND; MOSER, 2015).

O hipocampo participa ativamente na formação da memória espacial e uma das principais tarefas comportamentais utilizadas para avaliar este tipo de aprendizado é o Labirinto Aquático de Morris (LAM) (LYNCH, 2004b), utilizado no presente estudo. No LAM, roedores são treinados para localizar, através de dicas espaciais, uma plataforma invisível e submersa em água durante vários dias de treinos de aprendizagem (LEE, 2009).

Em estudos realizados com animais acordados e em livre movimento, foi demonstrado que no hipocampo existem células de localização, que disparam

seletivamente em um ou mais ambientes, e expressam localizações atuais, passadas ou futuras. A combinação de células de localização disparadas em cada ambiente é única e as mesmas células que respondem a estímulos não espaciais respondem também a estímulos espaciais quando o animal se move no espaço, sugerindo que a localização do animal é expressa através das informações obtidas pelas células de localização juntamente com informações de acontecimentos daquele local (MOSER; ROWLAND; MOSER, 2015).

Em humanos, estudos utilizando imagens de ressonância magnética funcional (RMf), verificaram que, além do hipocampo, regiões do córtex para-hipocampal e da região parietal medial também são fortemente ativadas durante a visualização passiva de locais como edifícios, paisagens naturais e paisagens urbanas. Além disso, durante tarefas de navegação ativa, verificou-se também que regiões do lobo frontal são fortemente ativadas, demonstrando seu papel no planejamento (EPSTEIN et al., 2017).

Desta forma, evidências indicam que no hipocampo humano, assim como acontece em roedores, ocorre o processamento de informações espaciais em códigos, semelhantes a um mapa, e que tal mapa preserva as relações de distância, como por exemplo, elementos que no mundo real estão próximos são representados de maneira próxima no mapa cognitivo e elementos que estão longe, são também representados de maneira distante (EPSTEIN et al., 2017).

Além disso, no córtex entorrinal, também acontece a formação de mapas cognitivos de localização espacial, que se dá através do disparo das células de grade, neurônios com atividade similar à das células de localização no hipocampo, que sinalizam mudanças de posição dos animais e que podem ser ativados em diversos pontos de uma localização. Desta forma, a interação entre as células de grade e as células de localização são fundamentais para a capacidade do hipocampo de organizar e armazenar informações (MOSER; KROPFF; MOSER, 2008).

2.1.2 Memória aversiva

O medo é uma emoção humana muito prevalente, que muitas vezes causa sofrimento físico ou psicológico. No entanto, o medo tem um forte valor de sobrevivência e tem sido a forma de aprendizado e a memória mais estudada. O termo memória aversiva é geralmente utilizado para designar a aquisição, armazenamento e reativação de comportamentos animais que em humanos causariam ou reduziriam o medo (IZQUIERDO; FURINI; MYSKIW, 2016).

Várias tarefas comportamentais são utilizadas no estudo da memória aversiva. Dentre elas, destacamos a tarefa do medo condicionado ao contexto (MCC), utilizada no presente estudo. Nesta tarefa há o envolvimento do hipocampo, e avalia-se o medo adquirido pelo contexto ambiental (LEE, 2009), uma vez que o animal é exposto a determinado contexto e em seguida recebe um leve choque em suas patas.

O hipocampo e a amígdala basolateral são estruturas consideradas centrais na aquisição e na consolidação da memória aversiva adquirida através do MCC, uma vez que diversos estudos com lesões nestas áreas tem evidenciado a participação de ambas neste tipo de aprendizado. Na amígdala tem sido observado que, após a consolidação da memória aversiva através do MCC, ocorre um aumento no número de neurônios, e que embora este tipo de aprendizado possa ocorrer em animais com o hipocampo lesionado, quando isto ocorre, estas memórias tendem a enfraquecer ao longo do tempo, demonstrando o papel do hipocampo na transformação da memória aversiva de curta duração em memória aversiva de longa duração (ZELIKOWSKY; BISSIERE; FANSELOW, 2012), (ZELIKOWSKY et al., 2013), (CHAAYA; BATTLE; JOHNSON, 2018).

Existem evidências de que a plasticidade sináptica, necessária para a consolidação de memórias, pode ser estimulada por diversos fatores, como, por exemplo, o estresse, que pode ativar marcadores relacionados à plasticidade na amígdala, no hipocampo e em outras regiões cerebrais, o que sugere que no MCC o estresse causado pelo choque nas patas pode induzir mudanças na estrutura e função neuronal (CHAAYA; BATTLE; JOHNSON, 2018).

Desta forma, sabe-se que o contexto influencia o comportamento dos animais e acredita-se que existe um circuito neural envolvendo o hipocampo, a amígdala e o córtex medial pré-frontal responsável pelo aprendizado e pela formação da memória

do medo condicionado ao contexto, e que alterações neste circuito, em humanos, podem estar relacionadas a patologias psiquiátricas, como a síndrome do estresse pós traumático, a depressão e o uso de drogas (MAREN; PHAN; LIBERZON, 2016).

2.2 NEUROINFLAMAÇÃO E EXCITOTOXICIDADE

O SNC é dito privilegiado em termos de imunidade, uma vez que dispõe de barreiras, como a barreira hematoencefálica (BHE), que controla fortemente a entrada de células e moléculas e na qual disfunções são observadas em patologias como a DA, DP, acidente vascular encefálico (AVE), epilepsia e lesões cerebrais traumáticas, sendo este um fenômeno associado a ativação de células endoteliais que exibem um fenótipo alterado e à redução das proteínas de junção (STEPHENSON et al., 2018).

A neuroinflamação refere-se à resposta do SNC desenvolvida frente a agentes danosos, como patógenos, traumas, agregação e modificação proteica, visando inativar os agentes nocivos, inibir e reverter seus efeitos prejudiciais. Tal resposta se dá por meio da ativação da micróglia, astrócitos e oligodendrócitos, sendo a ativação das células da glia considerada o mecanismo de imunidade inata do SNC (OLMOS; LLADÓ, 2014), (RANSOHOFF, 2016).

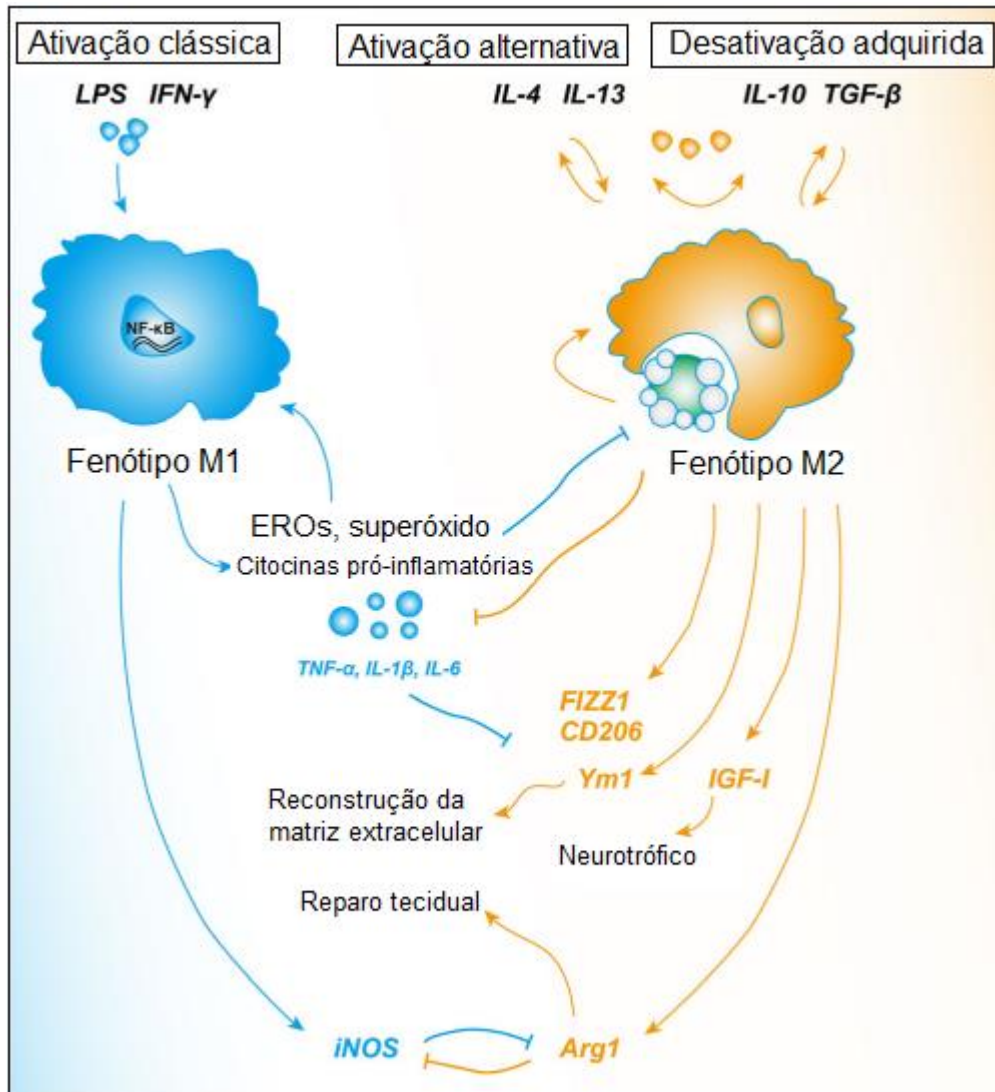
A imunidade inata constitui a primeira linha de defesa frente a uma infecção e a micróglia, principal célula imunológica residente do SNC, tem diversas funções, participando desde a poda sináptica durante o desenvolvimento até a regulação da morte celular e remoção de resíduos durante processos neuroinflamatórios (STEPHENSON et al., 2018). A ativação da micróglia constitui o principal componente da neuroinflamação, que por sua vez pode desempenhar efeitos benéficos e prejudiciais sobre os neurônios (TANG; LE, 2016).

Em situações normais, a resposta imunológica é regulada com precisão, de modo a combater o agente agressor e manter a homeostase tecidual, no entanto, em situações patológicas, tal equilíbrio é perdido e as respostas são desreguladas, causando por vezes, dano celular. A ativação da micróglia se dá através de dois fenótipos: M1 e M2, conforme ilustra a figura 3. O fenótipo M1, constitui a ativação

clássica da micróglia, no qual ocorre a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), superóxido, óxido nítrico (NO), espécies reativas de oxigênio (EROs) e proteases (TANG; LE, 2016), (SUBHRAMANYAM et al., 2019).

Já o fenótipo M2, é constituído pelos estados de ativação alternativa e desativação adquirida. Na ativação alternativa, ocorre a secreção de citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina-4 (IL-4) e a interleucina-13 (IL-13), visando reparo tecidual e restauração da matriz extracelular. No estado de desativação adquirida, por sua vez, ocorre a absorção de células apoptóticas e a secreção de interleucinas anti-inflamatórias, como a interleucina-10 (IL-10) e o fator transformador de crescimento β (TGF- β), visando reduzir a inflamação aguda. Ambos os fenótipos podem ser ativados em diferentes contextos e contribuir para a neuroinflamação patogênica que ocorre em doenças neurodegenerativas (TANG; LE, 2016), (SUBHRAMANYAM et al., 2019).

Figura 3 — Ativação da micróglia



Fonte: Adaptado de Tang; Le, (2016). A micróglia possui 2 fenótipos de ativação: M1 e M2. O fenótipo M1, ou ativação clássica, induz a ativação das vias de sinalização da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e do Fator Nuclear Kappa B (NF-κB), produzindo citocinas pró-inflamatórias como TNF-α, IL-1β, IL-6, EROs, superóxido e NO. O fenótipo M2 é constituído pelo estado de ativação alternativa, que induz a secreção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-4 e a IL-13 e pela desativação adquirida, que induz a produção de IL-10 e TGF-β. A ativação do fenótipo M2 promove ainda a expressão de outras citocinas anti-inflamatórias, como a Citocina quimiotática de eosinófilo (Ym1), Arginase-1 (Arg1), Achada em zona inflamatória-1 (Fizz-1), bem como do Receptor de Manose (CD206) e do Fator de crescimento semelhante à Insulina 1 (IGF-1). Sua ativação facilita a fagocitose de restos celulares e fragmentos proteicos, promovendo reparo tecidual e reconstrução da matriz extracelular, estimulando assim a sobrevivência neuronal por meio de fatores neurotróficos; antagonizando os estímulos pró-inflamatórios de M1, resultando assim em imunossupressão e proteção neuronal.

Embora a ativação do fenótipo M1 constitua a primeira linha de defesa contra danos e agressões, este também pode promover a neurotoxicidade, devido a

liberação de citocinas pró-inflamatórias e mediadores neurotóxicos, que podem configurar um ciclo vicioso entre a morte neuronal e a neuroinflamação aguda. Desta forma, logo após o início da ativação clássica, uma fase anti-inflamatória e de reparo tecidual é iniciada, com a ativação do fenótipo M2 (TANG; LE, 2016).

Várias evidências tem apontado a neuroinflamação como um dos principais fatores que contribui para a progressão de doenças neurodegenerativas, nas quais além da ativação da micróglia, o processo neuroinflamatório é caracterizada também pela ativação dos astrócitos, presença de mediadores inflamatórios no parênquima e por vezes, por alterações na BHE, que tornam o SNC susceptível à estímulos imunológicos periféricos, como a infiltração de macrófagos e células T e B (RANSOHOFF, 2016), (CHEN; ZHANG; HUANG, 2016), (VIVIANI et al., 2014).

Semelhante a ativação polarizada que acontece na micróglia, os astrócitos também são caracterizados pela ativação em 2 fenótipos: A1, responsável pela liberação de mediadores pró-inflamatórios, como interleucina-1 α (IL-1 α) e TNF- α e A2, que exerce atividade neuroprotetora, promovendo crescimento neuronal e reparo sináptico (STEPHENSON et al., 2018).

Além disso, a IL-1 β e o TNF- α , liberados em quadros neuroinflamatórios podem interagir com o sistema glutamatérgico e induzir um estado de excitotoxicidade (VIVIANI et al., 2014). A excitotoxicidade pode ser definida como o mecanismo de neurodegeneração e morte neuronal causado por aminoácidos excitatórios devido à ativação prolongada de seus receptores (RUGGIERO et al., 2011) e está envolvida em diversas patologias, dentre elas DA, DP, ELA e doenças isquêmicas (OLMOS; LLADÓ, 2014).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório e possui dois tipos de receptores: metabotrópicos, e ionotrópicos. Os receptores metabotrópicos são acoplados à proteína G e participam de mecanismos de respostas intracelulares através da ativação de segundos mensageiros. Os receptores ionotrópicos são subdivididos em 3 grupos: AMPA (alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico), NMDA (N-metil D-aspartato) e receptores de cainato (KA), sendo que os receptores NMDA são os mais estudados, devido ao seu envolvimento em processos de plasticidade sináptica e de excitotoxicidade (VYKLYCKY et al., 2014), (RUGGIERO et al., 2011).

O glutamato é essencial em diversas funções corticais importantes, como aprendizado e memória. No entanto, em quantidades elevadas, leva a morte celular por excitotoxicidade, devido a entrada excessiva de Ca^{2+} na célula, liberação de radicais livres, ácido araquidônico e NO. (VIVIANI et al., 2014), (LAU; TYMIANSKI, 2010). Os receptores NMDA apresentam maior sensibilidade ao Ca^{2+} do que os receptores AMPA e KA e são ativados após despolarização da membrana pós sináptica, uma vez que em repouso seu sítio de ligação é bloqueado por um íon Mg^{2+} (RUGGIERO et al., 2011).

A excitotoxicidade induzida pelo glutamato leva a morte neuronal tanto em doenças neurodegenerativas quanto em condições agudas, como AVE e traumatismo crânio-encefálico (TCE) (LAU; TYMIANSKI, 2010), e da mesma forma que citocinas pró-inflamatórias como $\text{IL-1}\beta$ e $\text{TNF-}\alpha$ podem estimular a toxicidade glutamatérgica, esta por sua vez causa a liberação de mais mediadores inflamatórios (VIVIANI et al., 2014), favorecendo assim, a neuroinflamação crônica e desregulada.

2.3 LPS E RECEPTORES TOLL LIKE

O lipopolissacarídeo (LPS), ou endotoxina como também é conhecido, é um componente da parede celular de bactérias gram-negativas, de ação extremamente tóxica e indutora de respostas imunológicas. É liberado quando a bactéria se multiplica ou quando é degradada e fagocitada pelas células de defesa (CRUZ-MACHADO, 2010) e tem sido amplamente utilizado em modelos experimentais como agente indutor de inflamação (WANG et al., 2006), (DICKSON; LEHMANN, 2019), (SEEMANN; ZOHLES; LUPP, 2017), (QIN et al., 2007). Seus efeitos são decorrentes da ativação de cascatas intracelulares por meio de sua ligação a receptores celulares específicos, sendo o principal deles o receptor *Toll Like 4* (TLR4) (CRUZ-MACHADO, 2010).

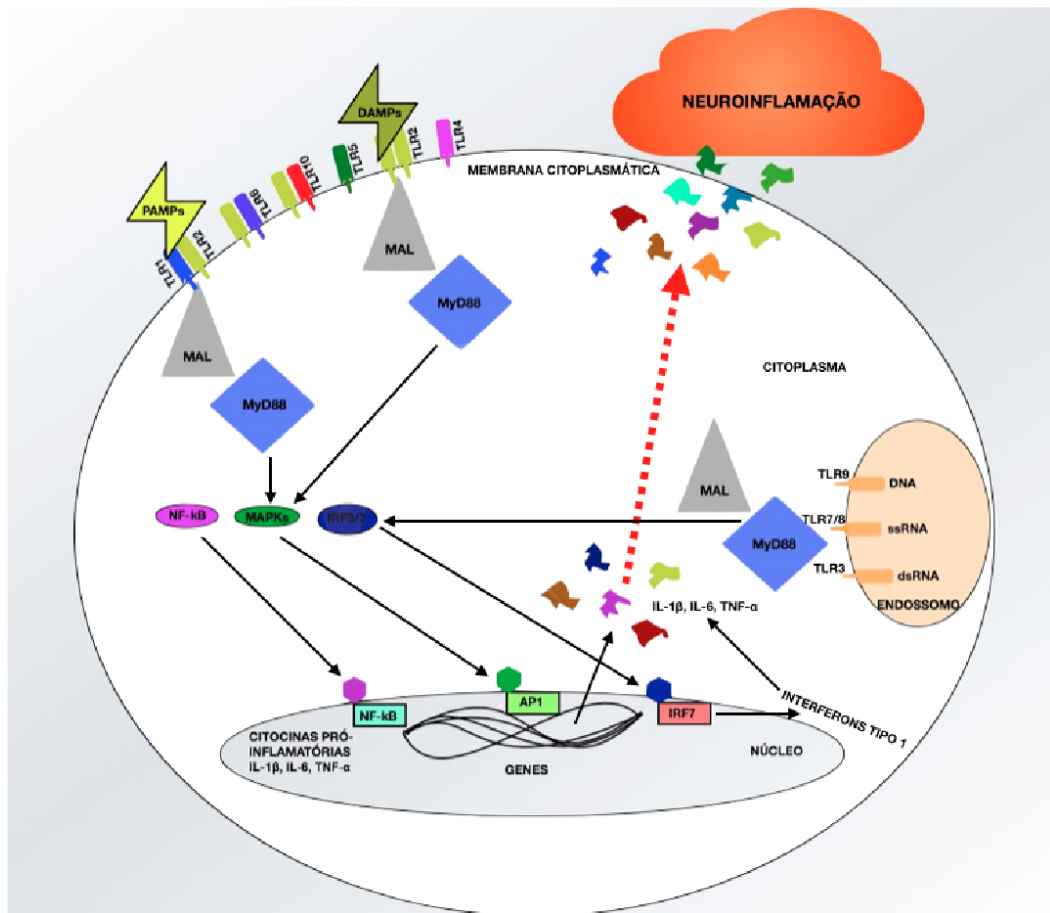
Os receptores *Toll Like* (*Toll Like Receptors* – TLRs) constituem uma família de receptores de reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PRR) e são expressos principalmente por células do sistema imune inato. Reconhecem diversos padrões moleculares relacionados a patógenos (*pathogenem-*

associated molecular pattern molecules – PAMPs) e moléculas endógenas provenientes de danos teciduais (*molecular pattern associated tissue damage* – DAMPs), ativando vias bioquímicas intracelulares, que ativam fatores de transcrição e nucleares relacionadas à produção de citocinas pró-inflamatórias (DE SOUSA; BRAGA; DA ROCHA SOBRINHO, 2016).

No sistema nervoso central, os TLRs são expressos em neurônios e em células da glia e quando ativados, são responsáveis pelo início de uma resposta imune pró-inflamatória, levando a uma neuroinflamação, que pode ocasionar o desenvolvimento de uma neurodegeneração (KUMAR, 2019).

O reconhecimento do LPS é mediado por moléculas como a proteína ligante de LPS (LPB), a proteína CD14 e a proteína mieloide diferenciadora 2 (MD-2), que atuam como proteínas auxiliares, responsáveis por carrear o LPS para o receptor TLR4 (CRUZ-MACHADO, 2010), (DICKSON; LEHMANN, 2019). Em seres humanos, são conhecidos 10 TLRs, que ao interagir com PAMPs e DAMPs, incluindo o LPS no caso do TLR4 dimerizam as proteínas TLR, que recruta proteínas adaptadoras, geralmente a My88 que ativa diversas proteínas cinases, levando à ativação de fatores de transcrição, como o fator nuclear (NF- κ B), a proteína ativadora 1 (AP-1), o fator de resposta ao interferon 3 (IRF3) e ao interferon 7 (IRF7). O NF- κ B e o AP-1 são fatores de transcrição nucleares que induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 5 (IL-5) e TNF- α . O IRF3 e o IRF7, por sua vez, induzem a produção de interferon alfa (IFN- α) e interferon beta (IFN- β), citocinas envolvidas nas respostas antivirais (DE SOUSA; BRAGA; DA ROCHA SOBRINHO, 2016). A figura 4 ilustra as vias de sinalização intracelulares mediadas pelos TLRs envolvidas na neuroinflamação.

Figura 4 — Vias de sinalização intracelular ativadas pelos TLRs envolvidas na neuroinflamação



Fonte: Adaptado de de Sousa, Braga, da Rocha Sobrinho (2016). O reconhecimento dos PAMPs e DAMPs se dá por meio de sua ligação aos receptores TLR, que são expressos na membrana celular ou em vesículas citoplasmáticas e levam a ativação de cascatas intracelulares, que ativam fatores de transcrição nucleares, responsáveis pela transcrição de genes que expressam citocinas, moléculas importantes para o desenvolvimento de uma resposta inflamatória.

2.4 GLICINA E RECEPTOR GLICINÉRGICO

A glicina é um aminoácido não essencial, constituído de uma molécula de carbono ligada a uma amina e a um grupamento carboxila, que devido à sua pequena estrutura participa de diversas funções celulares (HALL, 1998).

No sistema nervoso central, a glicina atua como neurotransmissor e é conhecida por mediar sinapses inibitórias na medula e tronco encefálico, modulando principalmente a transmissão sináptica entre neurônios motores e interneurônios em reflexos na medula espinhal (LYNCH, 2009). No entanto, sabe-se também que interneurônios glicinérgicos são encontrados na retina e em diversas regiões

corticais, incluindo o hipocampo, estando envolvidos também no processamento de informações sensoriais (LYNCH, 2009), (BRADY et al., 2012).

Apesar de ser conhecida classicamente como um neurotransmissor de ação inibitória ao se ligar ao seu receptor, a glicina também pode desempenhar ações excitatórias ao atuar como co-agonista do receptor glutamatérgico NMDA (BRADY et al., 2012), (VYKLICKY et al., 2014).

O receptor de glicina (GlyR) é um canal iônico ligante dependente, que se abre mediante a ligação de um agonista. Quando aberto, permite a entrada de íons Cl^- na célula, hiperpolarizando a membrana e impedindo a despolarização e o disparo neuronal induzidos por neurotransmissores excitatórios (KIRSCH, 2006). É formado por 5 subunidades proteicas: α -1, α -2, α -3, α -4 e β , que podem se combinar em diversos subtipos, homoméricos e heteroméricos. No entanto, não existem agonistas específicos para cada subtipo do receptor glicinérgico, de modo que todos os subtipos apresentam a mesma sensibilidade à glicina e seus agonistas (LYNCH, 2004a).

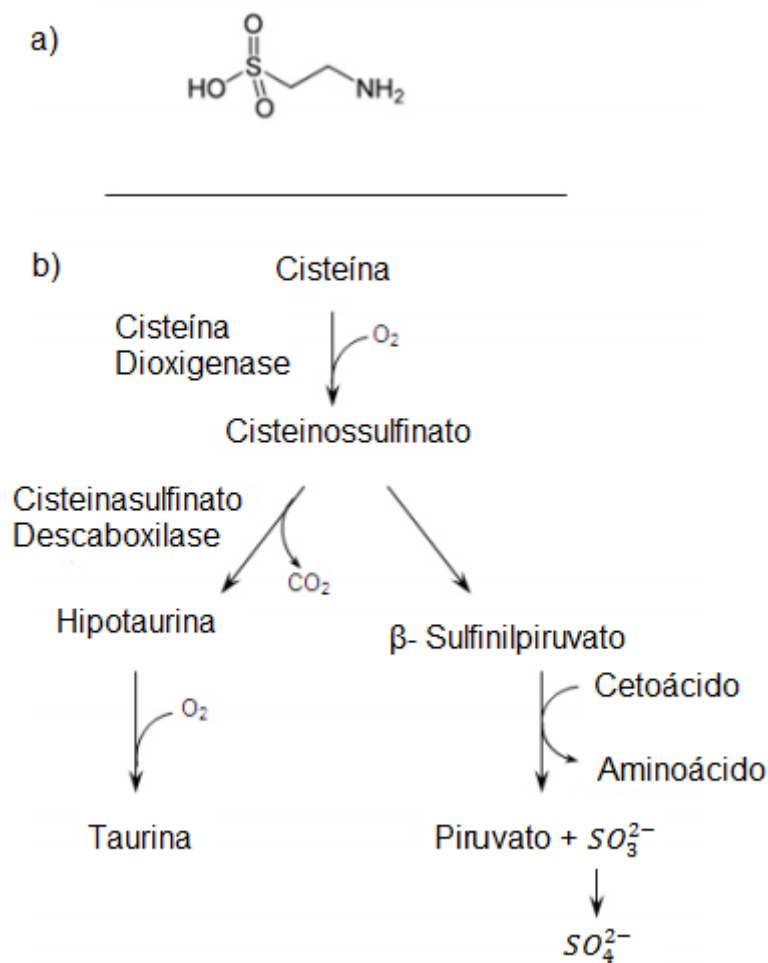
A glicina é sintetizada no citoplasma a partir da serina pela ação da enzima serina hidroximetiltransferase (SHMT) e estocada em vesículas por meio de um transportador vesicular dependente de H^+ . Sua ação pós-sináptica é finalizada pela recaptação por meio dos transportadores de alta afinidade à glicina: GlyT-1 e GlyT-2. O GlyT-1 é amplamente expresso em astrócitos em todo o SNC e remove a glicina dos receptores pós-sinápticos enquanto o GlyT-2 é expresso em terminais axonais na medula e no tronco encefálico e faz o processo reverso, sendo fundamental para a manutenção das concentrações intracelulares de glicina. Além disso, o GlyT-1 pode auxiliar na regulação dos níveis de glicina nos receptores NMDA. No meio intracelular, a glicina é degradada pela ação de um complexo enzimático de 4 proteínas localizadas principalmente nos astrócitos (BRADY et al., 2012).

O receptor de glicina tem como antagonista seletivo a estricnina e como agonistas, por ordem de afinidade os aminoácidos glicina, β -alanina e taurina (LYNCH, 2004a).

2.5 TAURINA

A taurina (ácido 2-aminoetanosulfônico) é o aminoácido livre mais abundante em tecidos excitáveis e seus níveis são mantidos através da absorção por meio da dieta e pela biossíntese endógena a partir de outros aminoácidos como a cisteína e a metionina (WEN et al., 2019). A taurina obtida através da dieta é absorvida no intestino delgado e transportada na veia porta até o fígado, onde exerce ação regulando o metabolismo hepático e é transportada para a corrente sanguínea (BALIOU et al., 2020). Sua estrutura química contém um grupamento sulfonato, mas difere de outros aminoácidos típicos pela ausência do grupamento carboxila (RIPPS; SHEN, 2012), conforme mostra a figura 5.

Figura 5 — Estrutura e formação da Taurina



Fonte: Adaptado de Ripps e Shen (2012). A: Fórmula química da taurina: $C_2H_7NO_3S$. B: Diagrama simplificado mostrando as principais etapas na conversão de L-cisteína para taurina. A enzima

cisteína dioxigenase catalisa a conversão de L-cisteína em sulfinato de cisteína e a oxidação da hipotaurina (sulfinato de 2-aminoetano) resulta em taurina.

A taurina desempenha importantes funções no organismo, uma vez que fornece substrato para a formação de sais biliares e está envolvida na regulação do volume celular, através da modulação da concentração de cálcio livre intracelular. Além disso, tem ações citoprotetoras em diversos tecidos, e na retina, além de ser importante para o desenvolvimento de fotorreceptores, tem sido apontada como um agente protetor endógeno contra danos celulares causados por níveis tóxicos de glutamato (RIPPS; SHEN, 2012).

No SNC, a taurina tem sido associada à ações neuroprotetoras (RIPPS; SHEN, 2012), (IDRISSI, 2019) e como um possível agente regulador neuroendócrino. Em camundongos, tratados com suplementação de taurina, foi observado um aumento na produção e secreção de insulina e na expressão de receptores de insulina no pâncreas e no cérebro, bem como aumento de transportadores de glicose 4 (Glut 4), calbindina e Na,K-ATPase no hipocampo. Além disso, verificou-se também que no hipocampo houve uma redução da expressão de canais de cálcio dependentes de voltagem e de transportadores de taurina (TauT), o que sugere que a hipoexcitabilidade induzida pela suplementação de taurina estimulou adaptações funcionais na expressão proteica do hipocampo e que tais alterações podem atenuar a excitotoxicidade glutamatérgica (IDRISSI, 2019).

Além disso, embora a taurina participe da neurotransmissão, esta não é considerada um neurotransmissor, pois sua liberação não é dependente de Ca^{2+} e a mesma não possui um receptor específico. No entanto, a taurina atua como agonista parcial do receptor $GABA_A$ do ácido gama amino-butírico (GABA), principal neurotransmissor inibitório, que possui dois receptores: $GABA_A$ (ionotrópico) e $GABA_B$ (metabotrópico) (PAZ et al., 2019), (OLMO et al., 2000). Os receptores $GABA_A$ são expressos em diversas regiões do encéfalo, incluindo o hipocampo e além de suas ações nestes receptores, a taurina atua também como agonista parcial do receptor de glicina (ALBRECHT; SCHOUSBOE, 2005), conforme descrito anteriormente.

A taurina não atravessa facilmente BHE e sua principal proteína transportadora é o transportador TauT, pertencente à família dos transportadores de neurotransmissores, que inclui os transportadores de serotonina e do GABA (RIPPS; SHEN, 2012). Existem 2 tipos de transportadores de taurina, que a transportam do fígado para diferentes tecidos: o TauT, codificado pelo gene *SLC6A6*, caracterizado por ser dependente de Na⁺ e Cl⁻, saturável e de alta afinidade e o PAT1, codificado pelo gene *SLC36A1*, pH-dependente, de alta capacidade e baixa afinidade (BALIOU et al., 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a possível atividade neuroprotetora da taurina, um agonista parcial endógeno dos receptores inotrópicos de glicina e GABA_A em um modelo de neuroinflamação em ratos, bem como o papel do receptor ionotrópico glicinérgico na reconsolidação recente da memória espacial de longa duração recente e remota.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

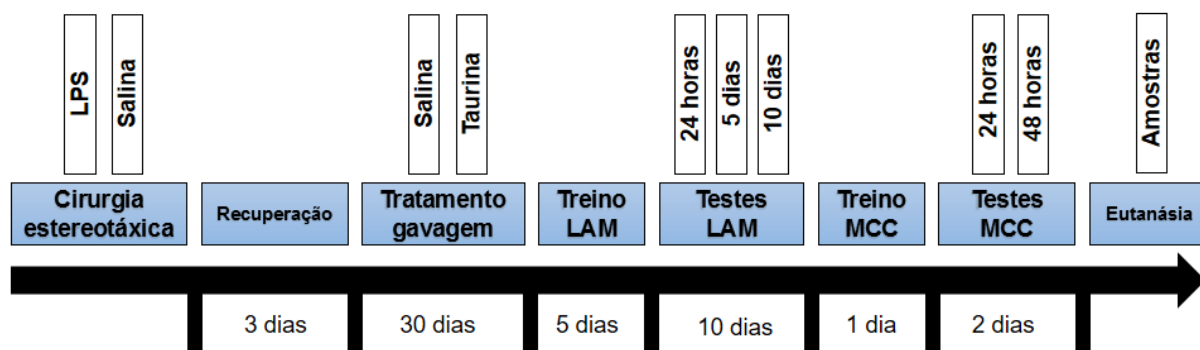
- Avaliar se, e em que dose a taurina administrada cronicamente por via oral, por 30 dias, é capaz de reverter o prejuízo mnemônico causado pela infusão bilateral de LPS na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos na memória espacial de longa duração recente e remota, avaliadas por meio da tarefa comportamental do Labirinto Aquático de Morris;
- Avaliar se, e em que dose a taurina administrada cronicamente por via oral, por 30 dias, é capaz de reverter o prejuízo mnemônico causado pela infusão bilateral de LPS na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos na memória aversiva de longa duração, avaliada por meio da tarefa comportamental do Medo Condicionado ao Contexto;
- Avaliar se, e em que dose a glicina infundida bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos é capaz de desempenhar efeitos na reconsolidação da memória espacial de longa duração recente e remota;
- Avaliar se, e em que dose a taurina infundida bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos é capaz de desempenhar efeitos na reconsolidação da memória espacial de longa duração recente e remota.

4 METODOLOGIA

4.1 DESENHO EXPERIMENTAL

Para a realização deste estudo, os experimentos foram divididos em duas etapas. Na primeira etapa, avaliamos o efeito da administração por via oral de taurina sobre o prejuízo mnemônico causado pela neuroinflamação, induzida através da infusão intra-hipocampal de LPS em ratos. Para isto, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para infusão intra-hipocampal de LPS e salina. Após 3 dias de recuperação, foi realizado o tratamento com salina e com taurina nas doses de 2 mg/kg, 20 mg/kg e 200 mg/kg por 30 dias, sendo que neste período os animais foram pesados a cada 7 dias e suas respectivas doses ajustadas de acordo com o peso corporal. No dia seguinte ao término do tratamento, os animais foram submetidos ao treino no Labirinto Aquático de Morris (LAM) por 5 dias e testados 24 horas, 5 dias e 10 dias após o último dia de treino. Um dia após o último teste no LAM, foram submetidos ao treino no equipamento do medo condicionado ao contexto (MCC), realizado em um único dia e testados 24 horas e 48 horas depois. Após a realização de todas as tarefas comportamentais, foram eutanasiados e amostras do tecido cerebral foram retiradas e armazenadas para posteriores análises histológicas e bioquímicas. A figura 6 ilustra o desenho experimental da primeira etapa de experimentos do estudo.

Figura 6 — Desenho Experimental – Primeira Etapa



Fonte: Elaborada pela autora. LAM: Labirinto Aquático de Morris; MCC: Medo Condicionado ao Contexto.

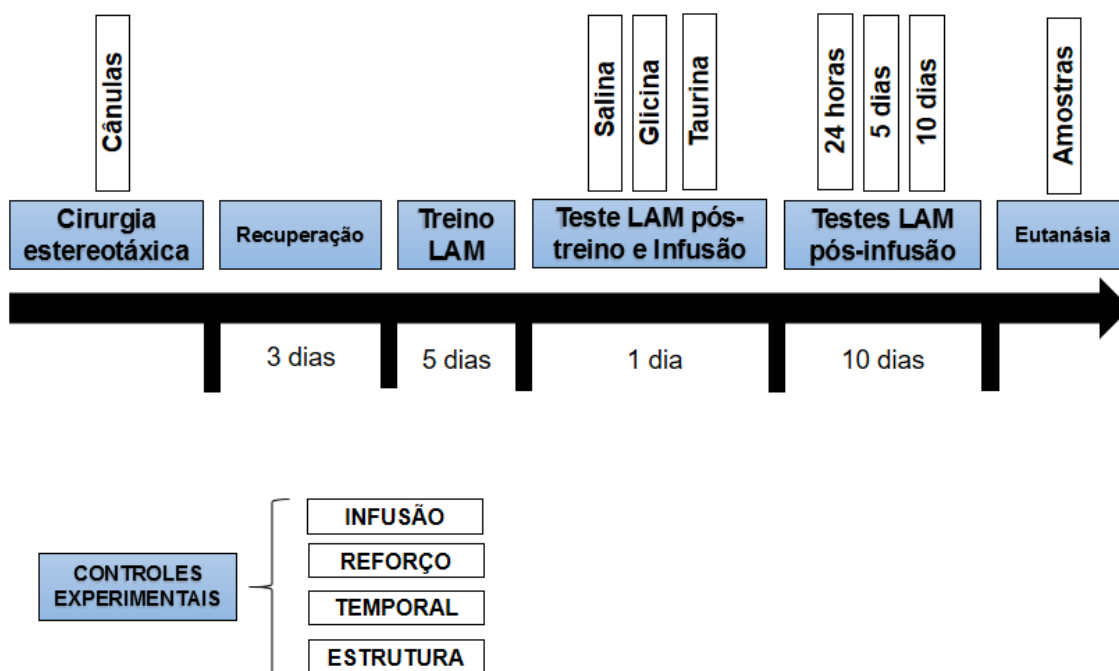
Na segunda etapa, avaliamos o efeito da infusão intra-hipocampal de glicina e de taurina na reconsolidação da memória espacial de longa duração recente e remota em ratos. Os animais passaram por cirurgia estereotáxica para a implantação de cânulas-guia e após 3 dias de recuperação foram submetidos ao treino no LAM por 5 dias consecutivos e testados 24 horas após o último treino.

Imediatamente após o teste de 24 horas pós-treino, os animais foram divididos em 7 grupos experimentais aleatorizados e receberam infusão intra-hipocampal de salina, glicina nas doses de 1 nmol/lado, 10 nmol/lado e 100 nmol/lado e de taurina nas doses de 1 nmol/lado, 10 nmol/lado e 100 nmol/lado.

Para avaliar os efeitos da glicina e da taurina na reconsolidação da memória espacial de longa duração recente, os animais foram testados 24 horas após a infusão e para avaliar o mesmo efeito na reconsolidação da memória espacial de longa duração remota, os mesmos foram testados 5 dias e 10 dias após a infusão.

Após obtidas as curvas de dose-resposta para tais efeitos da glicina e da taurina, foram realizados 4 grupos de controles experimentais, conforme descritos a seguir. A figura 7 ilustra a segunda etapa dos experimentos.

Figura 7 — Desenho Experimental – Segunda Etapa



Fonte: Elaborada pela autora. LAM: Labirinto Aquático de Morris.

4.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS E ASPECTOS ÉTICOS

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Neuropsicofarmacologia da Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da mesma instituição, sob os ofícios nº 029/2018 e nº 018/2019 (Anexo I).

Foram utilizados ratos Wistar machos, adultos, pesando entre 225 e 350 gramas, provenientes do Biotério da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE. Os animais foram mantidos em caixas apropriadas com capacidade para 5 ratos cada, forradas com maravalha. Receberam água e comida em livre demanda e foram submetidos a ciclos de claro-escuro de 12 horas, a uma temperatura ambiente mantida em torno de 22° C. As caixas foram limpas e a maravalha trocada a cada 3 dias.

Na primeira etapa de experimentos, para a avaliação dos efeitos da administração por via oral de taurina sobre os prejuízos mnemônicos causados pela neuroinflamação, foram utilizados 108 ratos alocados em 9 grupos experimentais, com 8 a 12 ratos cada grupo, conforme descrito a seguir:

- Grupo Naive: ratos que não passaram por procedimento cirúrgico nem por tratamento farmacológico;
- Grupo Salina + Salina: ratos que receberam infusão intra-hipocampal de salina e salina via gavagem;
- Grupo Salina + Taurina 2 mg/kg: ratos que receberam infusão intra-hipocampal de salina e taurina na dose de 2 mg/kg via gavagem;
- Grupo Salina + Taurina 20 mg/kg: ratos que receberam infusão intra-hipocampal de salina e taurina na dose de 20 mg/kg via gavagem;
- Grupo Salina + Taurina 200 mg/kg: ratos que receberam infusão intra-hipocampal de salina e taurina na dose de 200 mg/kg via gavagem;
- Grupo LPS + Salina: ratos que receberam infusão intra-hipocampal de LPS e salina via gavagem;
- Grupo LPS + Taurina 2 mg/kg: ratos que receberam infusão intra-hipocampal de LPS e taurina na dose de 2 mg/kg via gavagem;

- Grupo LPS + Taurina 20 mg/kg: ratos que receberam infusão intra-hipocampal de LPS e taurina na dose de 20 mg/kg via gavagem;
- Grupo LPS + Taurina 200 mg/kg: ratos que receberam infusão intra-hipocampal de LPS e taurina na dose de 200 mg/kg via gavagem.

Na segunda etapa de experimentos, para identificação das curvas de dose-resposta para os efeitos da glicina e da taurina na reconsolidação de memória espacial de longa duração recente e remota, foram utilizados 84 ratos, divididos em 7 grupos experimentais, com 8 a 12 ratos cada:

- Grupo Salina: ratos que receberam bilateralmente infusão intra-hipocampal de 1 μ L de solução salina.
- Grupo glicina 1 nmol: ratos que receberam bilateralmente infusão intra-hipocampal de 1 μ L de glicina na dose de 1 nmol/lado;
- Grupo glicina 10 nmol: ratos que receberam bilateralmente infusão intra-hipocampal de 1 μ L de glicina na dose de 10 nmol/lado;
- Grupo glicina 100 nmol: ratos que receberam bilateralmente infusão intra-hipocampal de 1 μ L de glicina na dose de 100 nmol/lado;
- Grupo taurina 1 nmol: ratos que receberam bilateralmente infusão intra-hipocampal de 1 μ L de taurina na dose de 1 nmol/lado;
- Grupo taurina 10 nmol: ratos que receberam bilateralmente infusão intra-hipocampal de 1 μ L de taurina na dose de 10 nmol/lado;
- Grupo taurina 100 nmol: ratos que receberam bilateralmente infusão intra-hipocampal de 1 μ L de taurina na dose de 100 nmol/lado;

Ainda na segunda etapa de experimentos, após identificadas as menores doses de glicina e de taurina capazes de desempenhar algum efeito sobre a reconsolidação da memória espacial de longa duração recente e remota, tais doses foram utilizadas na infusão intra-hipocampal de glicina e de taurina dos grupos controle referentes à tarefa do LAM, que foram realizados a fim de controlar possíveis fatores que podem interferir na avaliação mnemônica através do LAM e a fim de demonstrar que os efeitos notados só ocorrem se a infusão for realizada imediatamente após a reativação do traço mnemônico. Para isso, foram utilizados 120 ratos, divididos em 4 grupos experimentais, subdivididos em 3 grupos experimentais cada:

- Grupo controle infusão: ratos que receberam infusão intra-hipocampal de glicina, taurina ou salina (6 a 10 ratos cada subgrupo), 24 horas após o último treino no LAM e que não foram testados previamente, a fim de assegurar que os efeitos observados se devem a infusão intra-hipocampal do fármaco quando esta ocorre apenas imediatamente após a sessão de reativação não-reforçada do traço mnemônico;
- Grupo controle reforço: ratos que receberam infusão intra-hipocampal de glicina, taurina ou salina (6 a 10 ratos cada subgrupo), e que no teste de 24 horas após o último treino no LAM foram testados com a plataforma presente, a fim de assegurar que os efeitos observados ocorrem devido a reativação não-reforçada do traço mnemônico;
- Grupo controle temporal: ratos que receberam infusão intra-hipocampal de glicina, taurina ou salina (6 a 10 ratos cada subgrupo), 3 horas após o teste de 24 horas após o último treino, a fim de assegurar que os efeitos da infusão dos fármacos após a reativação não-reforçada do traço mnemônico são tempo-dependentes;
- Grupo controle estrutura: ratos que receberam infusão de glicina, taurina ou salina (6 a 10 ratos cada subgrupo) 1 mm acima da região do hipocampo, na região do córtex occipital médio-lateral, a fim de assegurar que os efeitos da infusão dos fármacos após a reativação não-reforçada do traço mnemônico no teste de 24 horas após o último treino no LAM é estrutura-dependente.

4.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Na primeira etapa dos experimentos, para a indução da neuroinflamação, foi utilizado LPS (oriundo de *Escherichia coli* 055:B5; Sigma) dissolvido em salina na concentração de 2,5 mg/ml e administrado região CA1 do hipocampo, bilateralmente em ratos, na dose de 10 µg / lado, através da infusão de 4 µl durante 10 minutos. Os animais pertencentes aos grupos controles, passaram pelo mesmo procedimento e ao invés de LPS receberam a infusão bilateral de veículo (solução salina). As coordenadas utilizadas para este procedimento foram adaptadas do Atlas Anatômico

Paxinos e Watson e foram as seguintes: Ântero Posterior (AP) = - 4,2 mm; Médio Lateral (MD) = \pm 3,0 mm; Dorso Ventral (DV) = - 3,0 mm; Inclinação Latero-lateral (INCL LL) = 0° a partir do Bregma. A infusão de LPS ou salina foi realizada por meio de uma microseringa Hamilton 10 μ l acoplada ao estereotáxico.

Na segunda etapa dos experimentos, todos os animais passaram pela cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas-guia para a posterior infusão intra-hipocampal de fármacos. Nesta etapa, as coordenadas anatômicas utilizadas também foram adaptadas do Atlas Paxinos e Watson, sendo elas: Ântero Posterior (AP) = - 4,2 mm; Médio Lateral (MD) = \pm 3,0 mm; Dorso Ventral (DV) = - 2,0 mm; Inclinação Látero-lateral (INCL LL) = 0° a partir do Bregma; com exceção dos grupos controle estrutura, nos quais a coordenada DV utilizada foi de -1,0 mm.

Em ambas as etapas de experimentos, os procedimentos cirúrgicos foram realizados com os animais previamente anestesiados com 75 mg/kg de cetamina e 10 mg/kg de xilazina via intra-peritonial. Após a cirurgia foram mantidos em caixas-moradia sob leve aquecimento a fim de evitar hipotermia.

4.4 AVALIAÇÃO DA MEMÓRIA ESPACIAL – LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS

A memória espacial foi avaliada por meio da tarefa comportamental do Labirinto Aquático de Morris (LAM). O LAM é um tanque circular azul escuro, de 180 cm de diâmetro, 55 cm de altura, preenchido com água até a altura de 35 cm e mantida entre 21 °C e 24°C, dividido virtualmente em quatro quadrantes. No centro de um desses quadrantes encontra-se uma plataforma de escape de 12 cm de diâmetro submersa 2 cm abaixo do nível da água, a qual durante os treinos deve ser encontrada pelos animais, que se orientam no LAM através de dicas visuais na forma de luminárias e de cartazes com cores e padrões geométricos diferentes fixados nas paredes, que servem de pista para a formação de um mapa espacial.

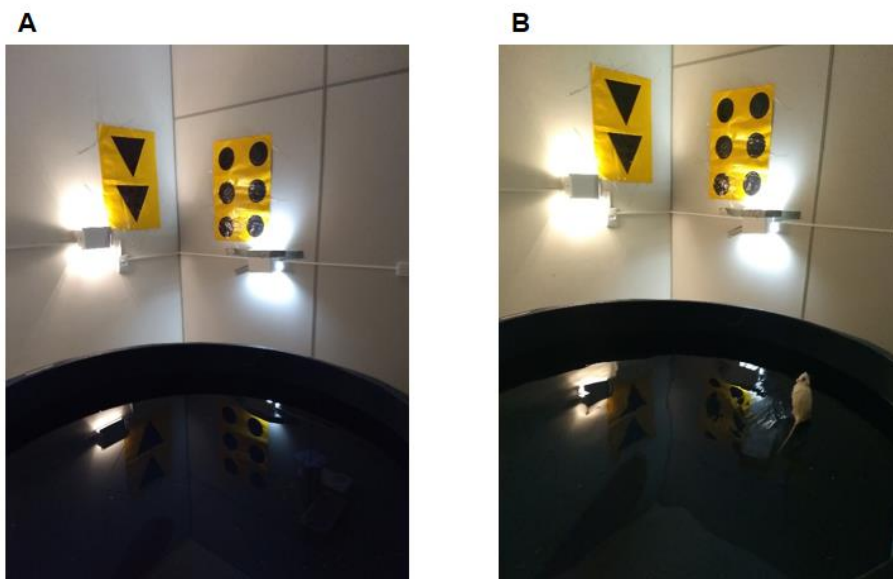
O treino foi realizado por 5 dias consecutivos e consiste em uma sessão diária de 8 largadas, em ordem pseudoaleatória alternada entre as 4 posições cardeais do LAM, nas quais o animal tem 60 segundos para encontrar a plataforma. Após encontrada, permanece sobre a mesma por 30 segundos e após este período é

dada uma nova largada. Caso não a encontre, é reconduzido gentilmente até a mesma, onde permanece por 30 segundos, seguidos por uma nova largada. A plataforma de escape é mantida no mesmo local durante todos os treinos e uma câmera na sala do LAM capta as imagens que são observadas pelo avaliador em outra sala.

Para a avaliação da memória espacial de longa duração recente, os testes foram realizados 24 horas após o último treino, na primeira fase dos experimentos e 48 horas após o último treino (24 h após a infusão) na segunda fase. Já a memória espacial de longa duração remota foi avaliada por meio de testes realizados 5 dias e 10 dias após o último treino ou após a infusão na primeira e segunda fase dos experimentos, respectivamente.

Para a realização dos testes, a plataforma é retirada do LAM e os ratos são largados da posição mais distal da região onde esta se localizava anteriormente e permanecem nadando por 60 segundos. Durante esse tempo são cronometrados o tempo que o animal permanece nadando no quadrante alvo (quadrante onde a plataforma de escape esteve localizada durante os treinos) e o tempo que leva para atingir uma área centrada no local da plataforma (latência), sendo estes os principais parâmetros utilizados como indicadores de retenção do traço mnemônico nesta tarefa (SOLSTAD; MOSER; EINEVOLL, 2006). A figura 8 representa o LAM do laboratório de Neuropsicofarmacologia da UNICENTRO, utilizado neste estudo.

Figura 8— Labirinto Aquático de Morris



Fonte: A autora. A: Labirinto Aquático de Morris da UNICENTRO, utilizado neste estudo. B: Rato wistar sobre a plataforma do Labirinto Aquático de Morris após encontrá-la.

4.5 AVALIAÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA – MEDO CONDICIONADO AO CONTEXTO

A memória aversiva foi avaliada por meio da tarefa comportamental do Medo Condicionado ao Contexto (MCC), realizada no equipamento do medo condicionado (Med-Associates Inc., St. Albans, VT). Tal equipamento consiste em uma câmara retangular medindo 25 cm x 32,2 cm x 25 cm, sendo a sua parede frontal feita de material plástico transparente para permitir a observação do comportamento do animal em seu interior. O chão desta caixa consiste em uma grade com 19 barras de aço inoxidável, conectada a um gerador de corrente elétrica, que quando acionado gera choques nas patas dos animais.

Para isolar o animal de fatores externos à câmara de condicionamento de medo, como ruídos, alterações de luminosidade e a presença do examinador, esta é revestida por outra câmara, com medidas de 75,5 cm x 63,5 cm x 35,8 cm. No interior desta segunda caixa, é fixada uma câmera através da qual o comportamento dos animais é observado.

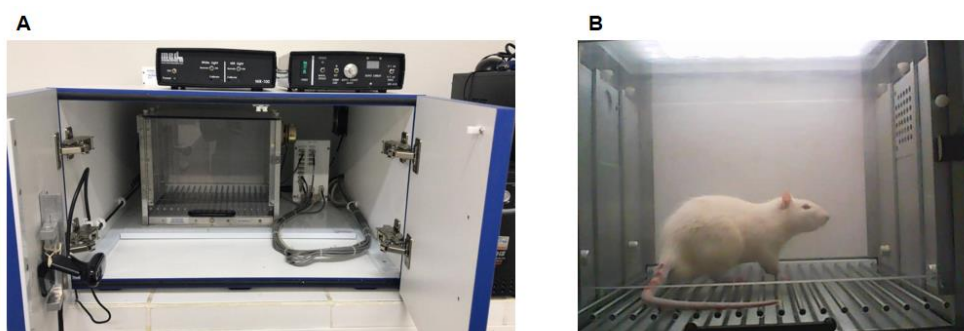
O treino foi realizado em uma única sessão, na qual os ratos foram colocados individualmente por 3 minutos na câmara de condicionamento para aclimação e

em seguida receberam 3 choques nas patas, com intensidade 0,8 mA, com duração de 3 segundos e intervalo de 30 segundos entre cada choque. Após os choques, os ratos permaneceram por mais 2 minutos na câmara e em seguida retornaram às suas caixas-moradia.

Os testes foram realizados 24 e 48 horas após a sessão de condicionamento, quando os animais foram colocados novamente na câmara de condicionamento por 5 minutos e o parâmetro utilizado para avaliar a memória aversiva foi o percentual de tempo que os ratos apresentaram congelamento, ou seja, a ausência de qualquer movimento de corpo e cabeça, exceto movimentos respiratórios durante este período (BEKINSCHTEIN et al., 2007).

No intervalo entre os treinos e testes, a cada rato, a câmara de condicionamento foi higienizada com papel toalha e álcool 70%. A figura 9 refere-se ao equipamento de condicionamento de medo utilizado no Laboratório de Neuropsicofarmacologia da UNICENTRO.

Figura 9 — Câmara de condicionamento de medo



Fonte: A autora. A: Câmara de condicionamento de medo do Laboratório de Neuropsicofarmacologia da UNICENTRO. B: Rato Wistar durante sessão de condicionamento de medo.

4.6 INFUSÃO INTRA-HIPOCAMPAL DE FÁRMACOS

Na segunda fase dos experimentos, para verificar os efeitos da glicina e da taurina na reconsolidação da memória espacial de longa duração recente e remota, os animais receberam infusões bilaterais de 1,0 μ L de veículo com ou sem fármacos (glicina ou taurina) dissolvidos em concentrações específicas de acordo com cada

grupo experimental, através de suas cânulas guias diretamente na região cerebral pré-determinada.

Para a realização deste procedimento, os animais foram imobilizados e foram utilizadas cânulas de infusão (0,05 mm de diâmetro e 10,0 mm de comprimento), conectadas a uma micro-seringa Hamilton por um tubo de polietileno, carregado com os fármacos. Após a introdução da cânula de infusão na luz da cânula-guia na cabeça do rato, a infusão foi iniciada lentamente, durando 30 segundos em cada lado e ao término de cada infusão, a cânula foi mantida no local por 30 segundos adicionais para evitar refluxo. A figura 10 ilustra o momento da realização deste procedimento.

Figura 10 — Infusão de fármacos através de cânulas-guia implantadas por meio de cirurgia estereotáxica



Fonte: A autora. Aparato experimental utilizado para infusão intra-hipocampal de fármacos através de cânulas-guia.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados no software GraphPad Prism 8 e os gráficos foram gerados no mesmo programa. Foi realizado teste de normalidade de Shapiro-Wilk e os dados comportamentais foram apresentados como média e erro padrão da média. Os parâmetros utilizados para avaliar a retenção mnemônica por parte dos animais foram as latências e os percentuais de tempo em determinado comportamento nas tarefas comportamentais (percentual de tempo gasto em nado

no quadrante-alvo para a tarefa do LAM e percentual de tempo em congelamento para o MCC). Tais parâmetros foram comparados entre os diferentes grupos através dos testes paramétrico de Student (dois grupos) ou ANOVA (mais de dois grupos) com teste post-hoc de Dunnett para comparações com um controle. Além disso, o percentual de tempo gasto por cada grupo experimental no quadrante-alvo na tarefa do LAM foi comparado à média teórica de 25% através do teste t simples, para determinar se houve retenção de memória de longa duração em cada grupo. Valores de p menores do que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 EFEITOS DA TAURINA, ADMINISTRADA POR VIA ORAL SOBRE O PREJUÍZO MNEMÔNICO CAUSADO PELA NEUROINFLAMAÇÃO NA MEMÓRIA ESPACIAL DE LONGA DURAÇÃO RECENTE E REMOTA EM RATOS

Para avaliar os efeitos da administração por via oral de taurina sobre o prejuízo mnemônico causado pela neuroinflamação na memória espacial de longa duração recente e remota, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para infusão bilateral de salina ou de LPS na dose de 10 µg/lado na região CA1 do hipocampo. Após 3 dias de recuperação pós-cirúrgica, os animais foram tratados com salina ou taurina nas doses de 2mg/kg, 20 mg/kg e 200 mg/kg por 30 dias e após o último dia de tratamento, foram treinados no LAM por 5 dias. Para avaliar a memória espacial de longa duração recente, os animais foram testados 24 h após a última sessão de treino e para avaliar a memória espacial de longa duração remota, 5 dias e 10 dias após a última sessão.

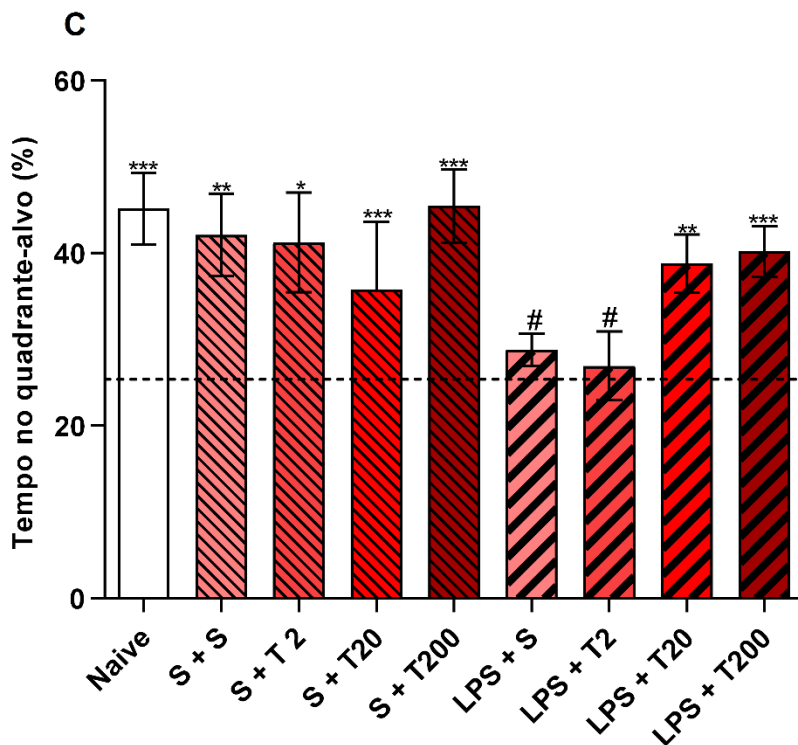
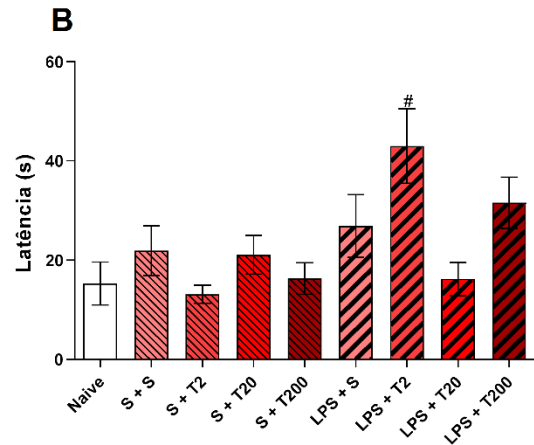
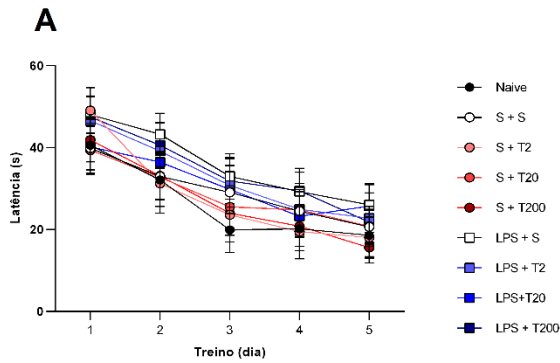
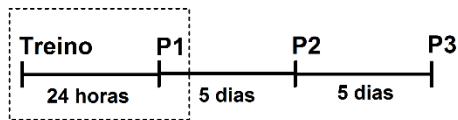
Inicialmente verificamos que ao longo dos dias de treino houve um aprendizado da tarefa do LAM pelos animais, evidenciado pela redução do tempo médio de latência durante os treinos (Figura 11), no entanto, não houve diferença significativa entre estes grupos (ANOVA de duas vias com medidas repetidas). As figuras 11.B e 11.C mostram os efeitos da administração por via oral de taurina sobre o prejuízo mnemônico causado pela neuroinflamação na memória espacial de longa duração recente (teste 24 h), avaliada pelos parâmetros de latência e percentual de tempo de permanência no quadrante alvo, respectivamente.

Observamos que nos grupos LPS + Salina e LPS + Taurina 2 não houve uma retenção do traço mnemônico, uma vez que estes grupos não tiveram um desempenho significativamente diferente em relação à média teórica de 25% de tempo de permanência no quadrante-alvo, esperada para um nado aleatório sobre os quadrantes. Verificamos ainda que nestes grupos houve um percentual de tempo de permanência no quadrante-alvo significativamente menor que o do grupo naive (ANOVA de 1 via, $F(8, 100) = 2,689$, $p < 0,05$ em pós-teste de Dunnett; Figura 11.C).

Porém os resultados acima não foram obtidos quando a dose administrada de taurina foi de 20 mg/kg e de 200 mg/kg nos grupos LPS, grupos estes que não diferiram significativamente do grupo naive em seu desempenho no percentual de tempo gasto no quadrante alvo, e nos quais houve retenção do traço mnemônico, com um desempenho significativamente diferente em relação à média de 25% de tempo de permanência no quadrante-alvo (teste t de Student, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente; Figura 11.C).

Assim, estes resultados mostram que a taurina nas doses de 20 e 200 mg/kg, administrada por via oral por 30 dias, foi capaz de reverter o prejuízo mnemônico causado pela infusão intra-hipocampal de LPS na memória espacial de longa duração recente.

Figura 11 — Efeitos da taurina administrada por via oral no prejuízo mnemônico causado pela neuroinflamação na memória espacial de longa duração recente



Fonte: A autora. Administração de taurina por via oral nas doses de 20 mg/kg e de 200 mg/kg por 30 dias reverte o prejuízo mnemônico na memória espacial de longa duração recente causado pela neuroinflamação induzida pela infusão bilateral de LPS na dose de 10 µg/lado na região CA1 do hipocampo de ratos Wistar machos, avaliado por meio da tarefa do LAM. Ratos Wistar machos foram submetidos à cirurgia estereotáxica para infusão de LPS (10 µg/lado) e tratados com taurina nas

doses de 2 mg/kg, 20 mg/kg e 200 mg/kg por 30 dias. Após o tratamento foram treinados por 5 dias consecutivos no LAM e testados 24 h após o último treino. S+S: Salina + Salina; S+T2: Salina + Taurina 2 mg/kg; S+T20: Salina + Taurina 20 mg/kg; S+T200: Salina + Taurina 200 mg/kg; LPS+S: LPS + Salina; LPS+T2: LPS + Taurina 2 mg/kg; LPS+T20: LPS + Taurina 20 mg/kg; LPS+T200: LPS + Taurina 200 mg/kg. (A) Latência média de 8 largadas por dia de treino de todos os ratos pertencentes a cada grupo até a plataforma de escape. (B) Latência até a plataforma de escape no teste de 24 h. (C) Percentual de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo em 60 s durante o teste de 24 h. Os dados foram expressos em média e em erro padrão da média (\pm EM). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ para o teste t de Student vs. o percentual teórico de 25%. # $p < 0,05$ para o teste de Dunnett vs. Naive após ANOVA de 1 via. ($F(8, 100) = 2,689$, $n = 8 - 12$ ratos por grupo).

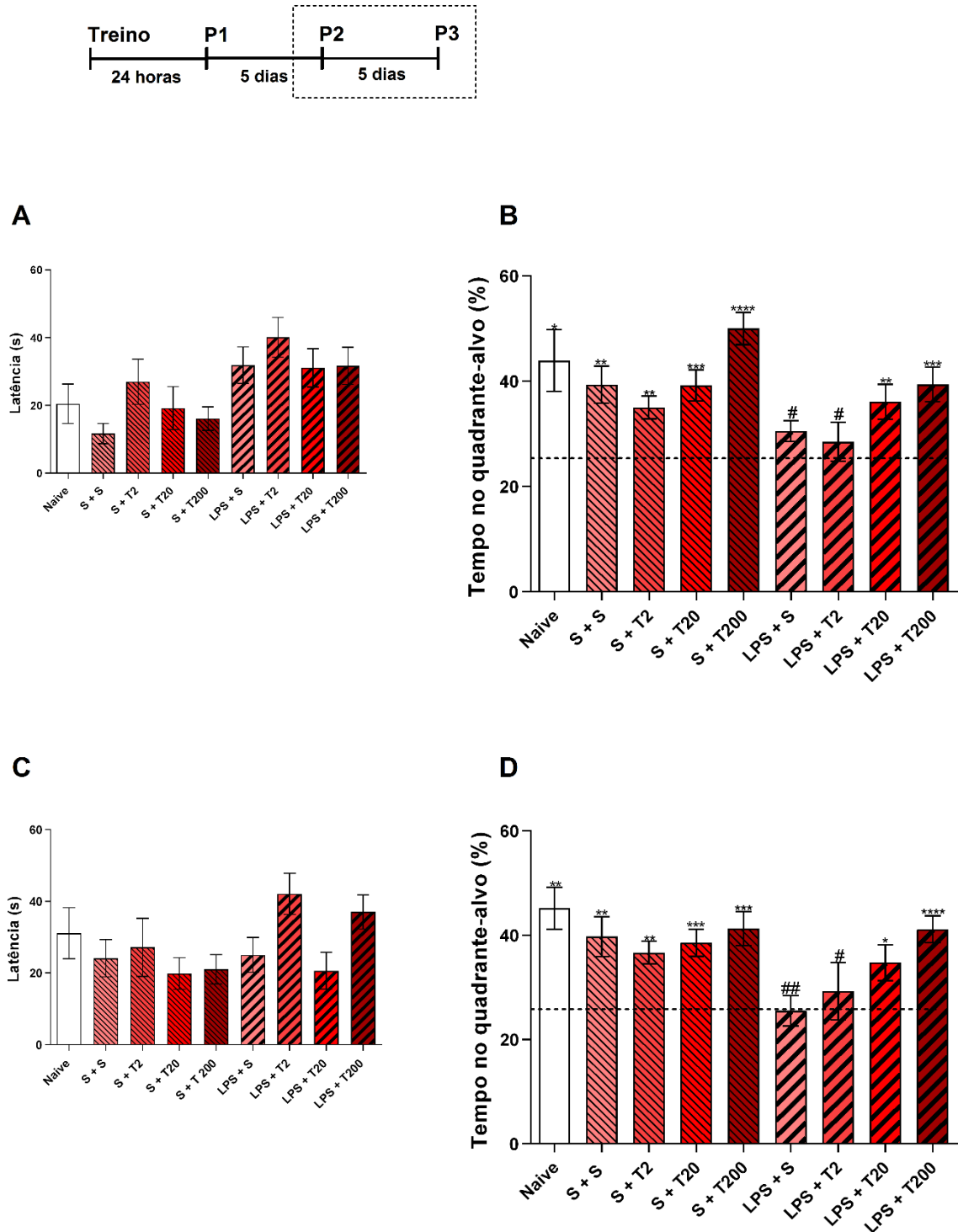
Após o teste de 24 h pós-treino, os animais foram submetidos a outros 2 testes para a avaliação da memória espacial de longa duração remota, sendo estes realizados 5 e 10 dias pós-treino. A figura 12 mostra os efeitos da administração por via oral de taurina sobre o prejuízo mnemônico causado pela neuroinflamação na memória espacial de longa duração remota, testada 5 dias (Figuras 12.A e 12.B) e 10 dias (Figuras 12.C e 12.D) pós-treino.

Observamos nestes testes, que a taurina quando administrada por via oral nas doses de 20 mg/kg e de 200 mg/kg por 30 dias, foi capaz de reverter o prejuízo mnemônico causado pela neuroinflamação induzida por LPS em ratos Wistar machos. Tais resultados, são evidenciados pelo percentual de tempo de permanência no quadrante-alvo dos grupos LPS + Taurina 20 e LPS + Taurina 200 não terem diferido significativamente do grupo naive nos testes de 5 dias e 10 dias pós-treino em seu desempenho de porcentagem de tempo gasto no quadrante alvo, além de esta porcentagem ter sido significativamente diferente do percentual teórico de 25% esperado para nado aleatório (teste t de Student, $p < 0,01$ e $p < 0,001$ no teste 5 dias pós-treino, e $p < 0,05$ e $p < 0,0001$ no teste 10 dias pós-treino, respectivamente aos grupos LPS + Taurina 20 e LPS + Taurina 200; Figura 12.B e 12.C).

Já nos grupos LPS + Salina e LPS + Taurina 2 houve prejuízo mnemônico nos testes 5 dias e 10 dias pós-treino, visto que seus desempenhos de porcentagem de tempo gasto no quadrante alvo não terem diferido significativamente do percentual teórico de 25% esperado para nado aleatório, e de este percentual em ambos os casos ter sido significativamente menor do que o do grupo naive (ANOVA de 1 via, $F(8, 93) = 3,486$, $p < 0,05$ em pós-teste de Dunnett, no teste 5 dias pós-

treino, e ANOVA de 1 via, $F(8, 104) = 3,383$, $p < 0,01$, $p < 0,05$ em pós-teste de Dunnett, no teste 10 dias pós-treino, respectivamente aos grupos LPS + Taurina 20 e LPS + Taurina 200; Figura 12.B e 12.C).

Figura 12 — Efeitos da taurina administrada por via oral no prejuízo mnemônico causado pela neuroinflamação na memória espacial de longa duração remota



Fonte: A autora. Administração de taurina por via oral nas doses de 20 mg/kg e de 200 mg/kg por 30 dias reverte o prejuízo mnemônico na memória espacial de longa duração remota causado pela neuroinflamação induzida pela infusão bilateral de LPS na dose de 10 µg/lado na região CA1 do hipocampo de ratos Wistar machos, avaliado por meio da tarefa do LAM. Ratos Wistar machos foram submetidos à cirurgia estereotáxica para infusão de LPS (10 µg/lado) e tratados com taurina nas doses de 2 mg/kg, 20 mg/kg e 200 mg/kg por 30 dias. Após o tratamento foram treinados por 5 dias consecutivos no LAM e testados 24 h, 5 dias e 10 dias após o último treino. S+S: Salina + Salina; S+T2: Salina + Taurina 2 mg/kg; S+T20: Salina + Taurina 20 mg/kg; S+T200: Salina + Taurina 200 mg/kg; LPS+S: LPS + Salina; LPS+T2: LPS + Taurina 2 mg/kg; LPS+T20: LPS + Taurina 20 mg/kg; LPS+T200: LPS + Taurina 200 mg/kg. (A) Latência até a plataforma de escape no teste de 5 dias pós-treino. (B) Percentual de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo em 60 s durante o teste de 5 dias pós-treino. (C) Latência até a plataforma de escape no teste de 10 dias pós-treino. (D) Percentual de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo em 60 s durante o teste de 10 dias pós-treino. Os dados foram expressos em média e em erro padrão da média (\pm EM). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ para o teste T vs. o percentual teórico de 25%. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ para o teste de Dunnett vs. Naive após ANOVA de 1 via. ($F(8, 93) = 3,486$ e $F(8, 104) = 3,383$ nos retestes 5 dias e 10 dias pós-treino, respectivamente, $n = 8 - 12$ ratos por grupo).

5.2 EFEITOS DA TAURINA, ADMINISTRADA POR VIA ORAL SOBRE O PREJUÍZO MNEMÔNICO CAUSADO PELA NEUROINFLAMAÇÃO NA MEMÓRIA AVERSIVA

Após termos verificado que a taurina administrada por via oral, por 30 dias é capaz de reverter o prejuízo mnemônico causado pela neuroinflamação, induzida por LPS na memória espacial de longa duração recente e remota em ratos, conforme mostrado anteriormente, investigamos se efeito semelhante também ocorre em outros tipos de memória.

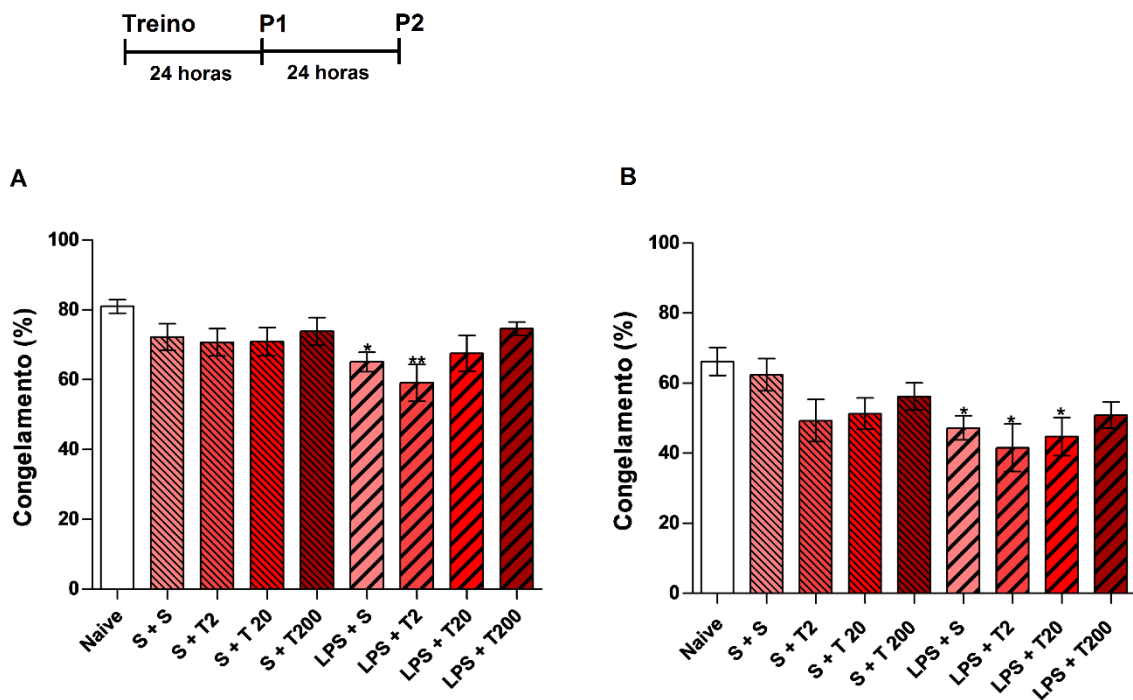
Desta forma, um dia após o último teste no LAM, os animais foram submetidos a uma sessão de treino de condicionamento de medo no equipamento utilizado na tarefa comportamental do Medo Condicionado ao Contexto (MCC) e testados 24 e 48 horas após a sessão de treino, a fim de verificar os efeitos da taurina, administrada cronicamente por via oral sobre o prejuízo mnemônico causado pela neuroinflamação na memória aversiva.

O parâmetro utilizado como indicativo de retenção do traço mnemônico nesta tarefa, foi o percentual de tempo que os animais permaneceram em congelamento durante o teste. Observamos que no teste de 24 horas pós treino (Figura 13.A), os grupos LPS + Taurina 20 e LPS + Taurina 200 não apresentaram menor percentual de tempo de congelamento em relação ao grupo naive, indicando que a taurina nas doses de 20 mg/kg e de 200 mg/kg foi capaz de reverter o prejuízo mnemônico causado pela neuroinflamação na memória aversiva. Já os grupos LPS + Salina e

LPS + Taurina 2 apresentaram um percentual de tempo de congelamento significativamente menor do que o grupo naive, indicando prejuízo mnemônico quanto à retenção da memória aversiva relativa à tarefa do MCC (ANOVA de 1 via, $F(8, 104) = 2,202$, $p < 0,05$ em pós-teste de Dunnett; Figura 13).

Já no teste de 48 horas pós-treino (Figura 13.B), verificamos que os grupos LPS + Salina, LPS + Taurina 2 e LPS + Taurina 20 apresentaram menor percentual de tempo de congelamento em relação ao grupo Naive (ANOVA de 1 via, $F(8, 107) = 2,630$, $p < 0,05$ em pós-teste de Dunnett; Figura 13) demonstrando que mesmo mais tardiamente, apenas a taurina na dose de 200 mg/kg foi capaz de reverter o prejuízo mnemônico causado pela neuroinflamação na memória aversiva.

Figura 13 — Efeitos da taurina, administrada por via oral no prejuízo mnemônico causado pela neuroinflamação na memória aversiva



Fonte: A autora. Administração de taurina por via oral nas doses de 20 mg/kg e de 200 mg/kg por 30 dias reverte o prejuízo mnemônico na memória aversiva causado pela neuroinflamação induzida pela infusão bilateral de LPS na dose de 10 µg/lado na região CA1 do hipocampo de ratos Wistar machos, avaliado por meio da tarefa do MCC. Ratos Wistar machos foram submetidos à cirurgia estereotáxica para infusão de LPS (10 µg/lado) e tratados com taurina nas doses de 2 mg/kg, 20 mg/kg e 200 mg/kg por 30 dias. Após o tratamento foram treinados por 5 dias consecutivos no LAM e testados 24 h, 5 dias e 10 dias após o último treino. Um dia após o último teste no LAM, os animais foram treinados por 1 dia no MCC e testados 24 h e 48 h após o treino. S+S: Salina + Salina; S+T2: Salina + Taurina 2 mg/kg; S+T20: Salina + Taurina 20 mg/kg; S+T200: Salina + Taurina 200 mg/kg; LPS+S:

LPS + Salina; LPS+T2: LPS + Taurina 2 mg/kg; LPS+T20: LPS + Taurina 20 mg/kg; LPS+T200: LPS + Taurina 200 mg/kg. (A) Teste de 24 horas pós-treino. (B) Teste de 48 horas pós-treino. Os dados foram expressos em média e em erro padrão da média (\pm EM). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ para o teste de Dunnet vs. Naive após ANOVA de 1 via. ($F(8, 104) = 2,202$ e $F(8, 107) = 2,630$ nos testes 24h e 48h, respectivamente, $n = 8 - 12$ ratos por grupo).

5.3 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRA-HIPOCAMPAL DE GLICINA NA RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA ESPACIAL DE LONGA DURAÇÃO RECENTE E REMOTA

Para avaliar os efeitos da administração intra-hipocampal de glicina na reconsolidação da memória espacial de longa duração recente e remota em ratos, os animais foram treinados no LAM por 5 dias e testados 24 horas após o último dia de treino. Logo em seguida, receberam infusões intra-hipocampais na região CA1 de salina ou de glicina nas doses de 1 nmol/lado, 10 nmol/lado ou 100 nmol/lado. Para avaliar o efeito desta administração na reconsolidação da memória espacial de longa duração recente, os animais foram testados novamente 24 horas após a infusão e na reconsolidação da memória espacial de longa duração remota, foram retestados 5 e 10 dias após a infusão.

Inicialmente, verificamos que ao longo dos dias de treino houve um aprendizado da tarefa pelos animais, evidenciado pela redução do tempo médio de latência durante os treinos (Figura 14.A) e que estes consolidaram uma memória de longa duração recente para esta tarefa, conforme evidenciado pela latência e pelo percentual de tempo no quadrante-alvo no teste de 24 h pós-treino (Figuras 14.B e 14.C).

As figuras 14.B e 14.C representam os efeitos da infusão intra-hipocampal de glicina na latência e no percentual de tempo de permanência no quadrante-alvo respectivamente, onde verificamos que a infusão de glicina na dose de 10 nmol/lado 0 minutos após o teste realizado 24 horas após o último treino reduziu o percentual de tempo de permanência no quadrante-alvo e aumentou o tempo de latência em todos os testes pós-infusão, demonstrando assim, ter prejudicado a reconsolidação

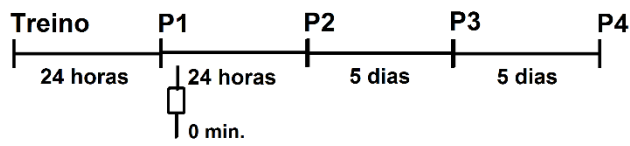
da memória espacial de longa duração recente (teste 24 horas pós-infusão) e remota (testes 5 e 10 dias pós-infusão).

O grupo que recebeu infusão de glicina na dose de 10 nmol/lado 0 minutos pós-teste 24 horas após o último treino, quando comparado seu percentual de permanência no quadrante-alvo com o percentual teórico por aleatoriedade (percentual sem aprendizado prévio), diferiu significativamente do respectivo grupo salina (ANOVA de 1 via, $F(3, 45) = 3,1$, $p < 0,05$ no teste 24h, $F(3, 43) = 3,8$, $p < 0,05$ no teste 5 dias pós-infusão, $F(3, 42) = 3,1$, $p < 0,05$ no teste 10 dias pós-infusão). Estes resultados, somados aos resultados dos experimentos controle que são mostrados mais adiante, demonstram que a glicina nesta dose é prejudicial à reconsolidação da memória espacial de longa duração recente (teste 24 horas pós-infusão) e remota (testes 5 e 10 dias pós-infusão).

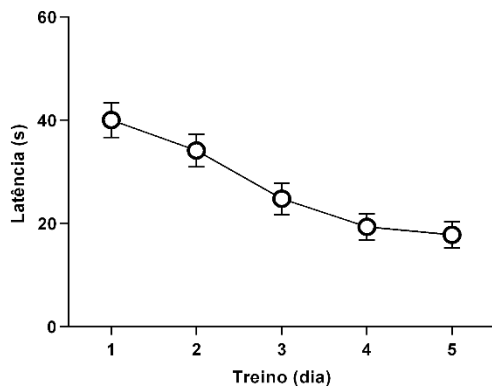
Quanto às demais doses avaliadas, verificamos que houve somente um aumento no tempo de latência no teste de 5 dias pós-infusão e nenhuma diferença significativa no percentual de permanência no quadrante-alvo em relação aos respectivos grupos salina, bem como quase todos esses percentuais diferiram significativamente do percentual teórico por aleatoriedade (teste t de Student), com exceção do grupo glicina 100 nmol/lado no teste 5 dias pós-infusão ($p = 0,0644$).

Desta forma, nos próximos experimentos (controles experimentais), a dose utilizada foi a de 10 nmol/lado, por ter sido a única dose em que houve prejuízo no desempenho dos animais na reconsolidação da memória espacial de longa duração recente e remota.

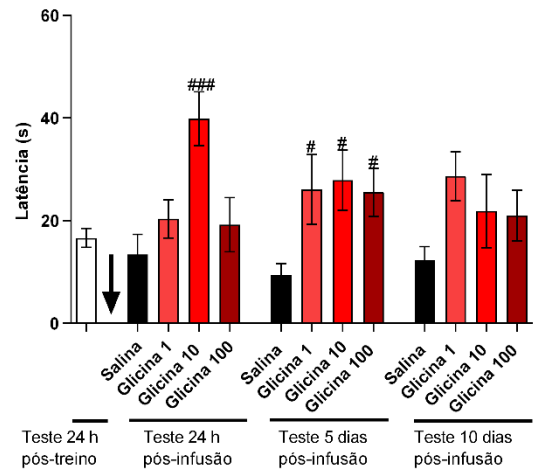
Figura 14 — Efeitos da infusão intra-hipocampal de glicina na reconsolidação da memória espacial de longa duração recente e remota



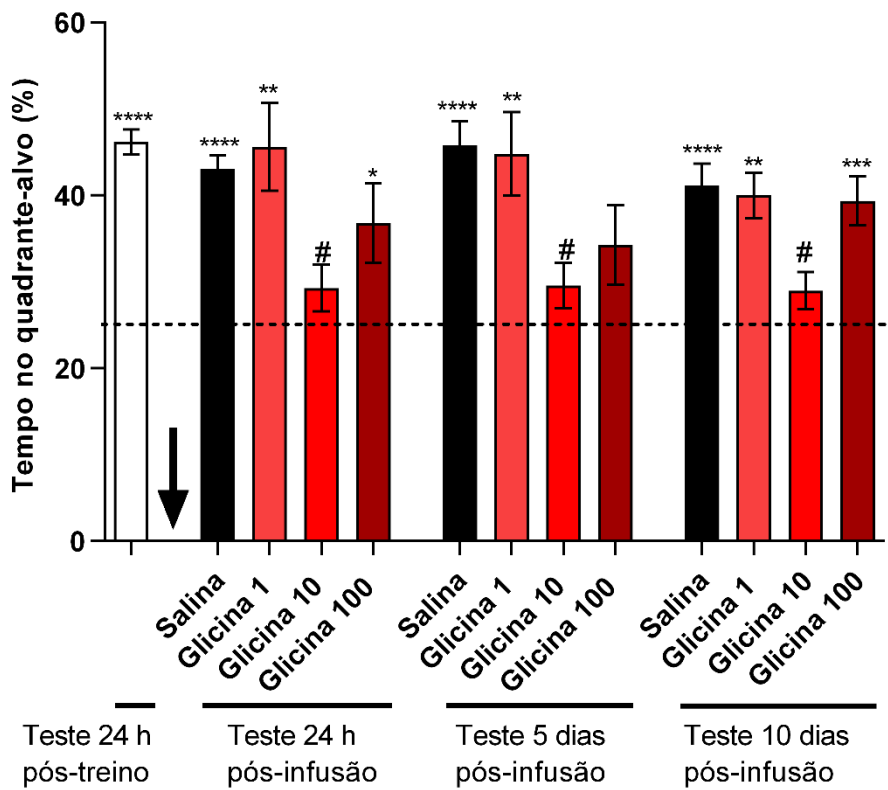
A



B



C



Fonte: A autora. Infusão intra-hipocampal bilateral de glicina na dose de 10 nmol/lado imediatamente pós-teste sem reforço prejudica a reconsolidação da memória espacial de longa duração recente e

remota na tarefa do LAM, conforme verificado nos testes de 24 horas, 5 dias e 10 dias após esta reativação. Ratos Wistar machos com cânulas de infusão implantadas bilateralmente mirando a região CA1 do hipocampo, randomizados em 4 grupos experimentais foram treinados por 5 dias no LAM e testados 24 horas após o último treino. Imediatamente após este teste, receberam infusão de glicina nas doses de 1 nmol/lado, 10 nmol/lado ou 100 nmol/lado ou salina e foram testados novamente 24 horas, 5 dias e 10 dias pós-infusão. Glicina 1: glicina 1 nmol/lado; Glicina 10: glicina 10 nmol/lado; Glicina 100: glicina 100 nmol/lado. (A) Latência média de 8 largadas por dia de treino de todos os ratos até a plataforma de escape. (B) Latência de todos os testes pós-treino (24 h pós treino) e pós-infusão (24 horas, 5 dias e 10 dias pós-infusão). (C) Percentual de tempo de permanência no quadrante-alvo de todos os testes pós-treino (24 h pós treino) e pós-infusão (24 horas, 5 dias e 10 dias pós-infusão). Os dados foram expressos em média e em erro padrão da média (\pm EM). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ para o teste T vs. o percentual teórico de 25%. # $p < 0,05$ para o teste de Dunnet vs. Salina após ANOVA de 1 via ($F(3, 45) = 3,1$; $F(3, 43) = 3,8$; $F(3, 42) = 3,1$, retestes 24 h, 5 dias e 10 dias pós-infusão, respectivamente, $n = 8 - 12$ ratos por grupo).

5.4 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRA-HIPOCAMPAL DE TAURINA NA RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA ESPACIAL DE LONGA DURAÇÃO RECENTE E REMOTA

Para avaliar os efeitos da administração intra-hipocampal de taurina na reconsolidação da memória espacial de longa duração recente e remota em ratos, os animais foram treinados no LAM por 5 dias e testados 24 horas após o último dia de treino. Logo em seguida ao teste, receberam infusões intra-hipocampais na região CA1 de salina ou de taurina nas doses de 1 nmol/lado, 10 nmol/lado ou 100 nmol/lado. Para avaliar o efeito desta administração na memória espacial de longa duração recente, os ratos foram testados novamente 24 horas após a infusão e na reconsolidação da memória espacial de longa duração remota, foram testados 5 e 10 dias após a infusão.

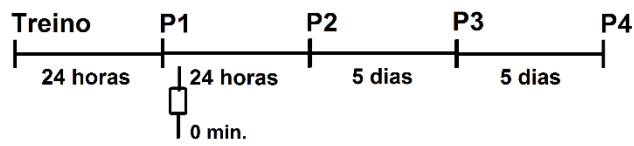
Inicialmente verificamos que ao longo dos dias de treino houve um aprendizado da tarefa pelos animais, evidenciado pela redução do tempo médio de latência durante os treinos (Figura 15.A) e que estes consolidaram uma memória de longa duração recente para esta tarefa, conforme evidenciado pela latência e pelo percentual de tempo no quadrante-alvo no teste de 24 h pós-treino (Figuras 15.B e 15.C).

Verificamos que o grupo que recebeu infusão de taurina na dose de 100 nmol/lado 0 minutos após o teste realizado 24 horas pós-treino apresentou uma redução no percentual de tempo no quadrante-alvo em todos os testes pós-infusão, demonstrando assim, que a taurina nesta dose foi prejudicial à reconsolidação da memória espacial de longa duração recente (teste 24 h pós-infusão, ANOVA de uma via, $F(3, 40) = 4,480$, $p < 0,05$) e remota (testes 5 dias e 10 dias pós-infusão, $F(3, 43) = 5,228$, $p < 0,01$ e $F(3, 40) = 3,847$, $p < 0,05$, respectivamente).

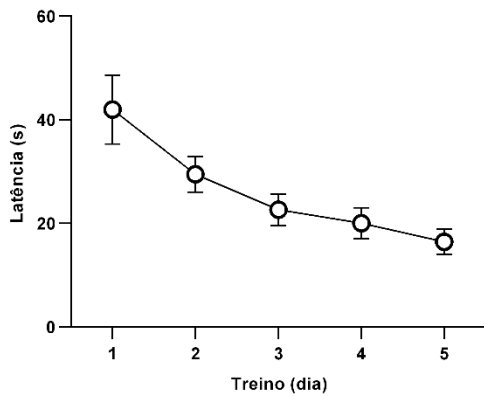
Com relação às demais doses avaliadas, verificamos que a taurina na dose de 10 nmol/lado reduziu significativamente o percentual de tempo de permanência no quadrante-alvo no teste de 10 dias pós-infusão, comparado aos respectivos grupos salina (ANOVA de uma via, $F(3, 43) = 5,228$, $p < 0,05$ e $F(3, 40) = 3,847$, $p < 0,05$, respectivamente), demonstrando assim, ter prejudicado a memória espacial de longa duração remota, mas não a recente. Na dose de 1 nmol/lado, não foi observada nenhuma diferença em relação aos respectivos grupos salina.

Desta forma, nos próximos experimentos (controles experimentais), a dose utilizada foi a de 100 nmol/lado, uma vez que esta dose prejudicou o desempenho dos animais tanto na reconsolidação da memória espacial de longa duração recente quanto a reconsolidação da memória espacial de longa duração remota.

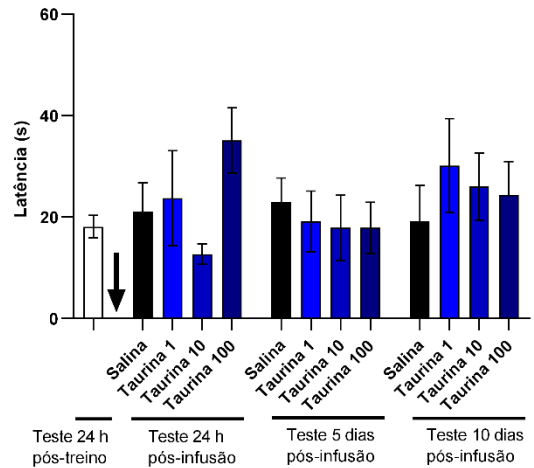
Figura 15 — Efeitos da infusão intra-hipocampal de taurina na reconsolidação da memória espacial de longa duração recente e remota



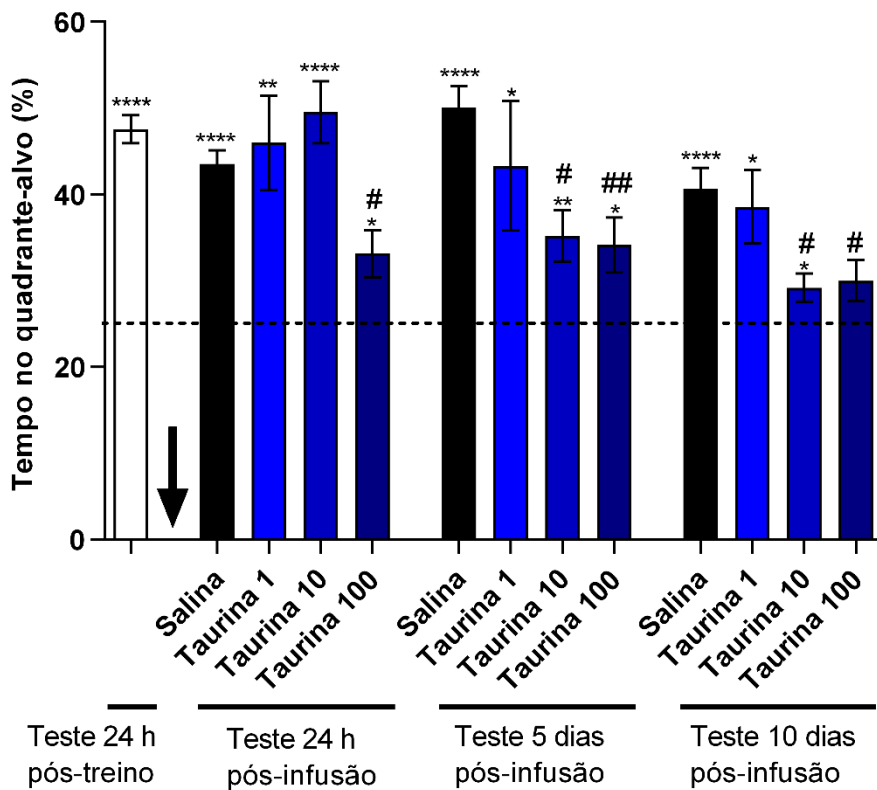
A



B



C



Fonte: A autora. Infusão intra-hipocampal bilateral de taurina na dose de 100 nmol/lado imediatamente pós-teste sem reforço prejudica a reconsolidação da memória espacial de longa duração recente e remota na tarefa do LAM, conforme verificado nos testes de 24 horas, 5 dias e 10

dias após esta reativação. Ratos Wistar machos com cânulas de infusão implantadas bilateralmente mirando a região CA1 do hipocampo, randomizados em 4 grupos experimentais foram treinados por 5 dias no LAM e testados 24 horas após o último treino. Imediatamente após este teste, receberam infusão de glicina nas doses de 1 nmol/lado, 10 nmol/lado ou 100 nmol/lado ou salina e foram testados novamente 24 horas, 5 dias e 10 dias pós-infusão. Taurina 1: taurina 1 nmol/lado; Taurina 10: taurina 10 nmol/lado; Taurina 100: taurina 100 nmol/lado. (A) Latência média de 8 largadas por dia de treino de todos os ratos até a plataforma de escape. (B) Latência de todos os testes pós-treino (24 h pós treino) e pós-infusão (24 horas, 5 dias e 10 dias pós-infusão). (C) Percentual de tempo de permanência no quadrante-alvo de todos os testes pós-treino (24 h pós treino) e pós-infusão (24 horas, 5 dias e 10 dias pós-infusão). Os dados foram expressos em média e em erro padrão da média (\pm EM). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ para o teste T vs. o percentual teórico de 25%. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ para o teste de Dunnet vs. Salina após ANOVA de 1 via ($F(3, 40) = 4,48$; $F(3, 43) = 5,228$; $F(3, 40) = 3,847$, testes 24 h, 5 dias e 10 dias pós-infusão, respectivamente, $n = 8 - 12$ ratos por grupo).

5.5 CONTROLES EXPERIMENTAIS

5.5.1 Controle Infusão

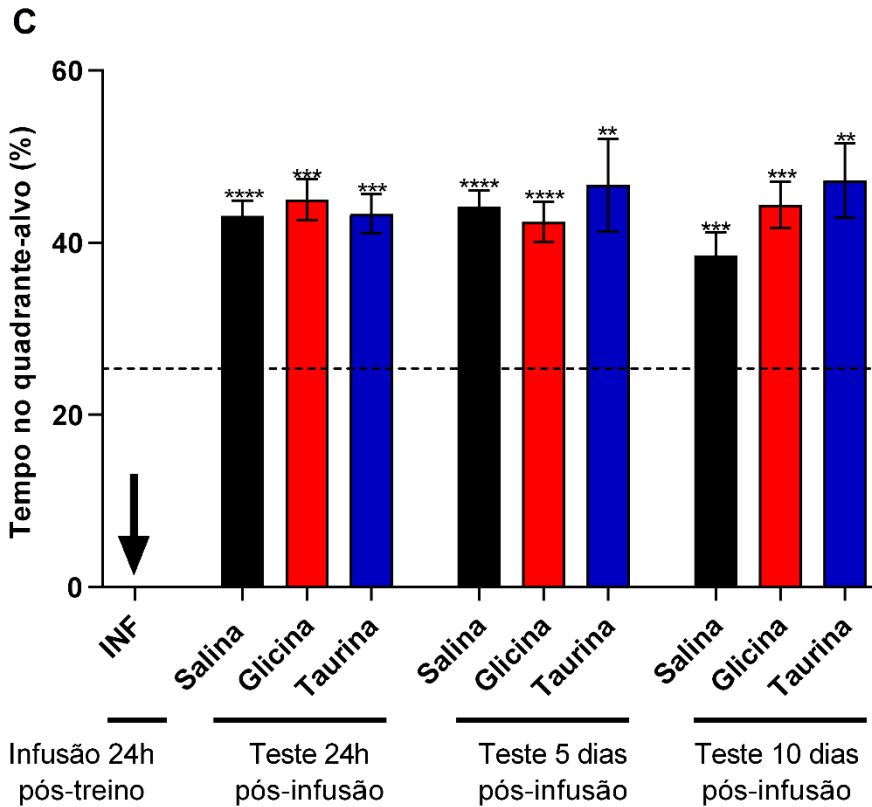
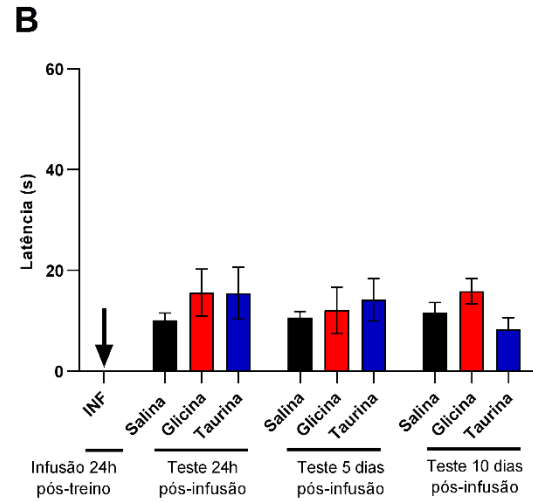
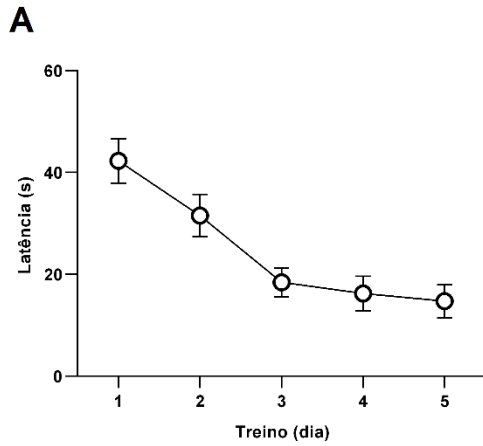
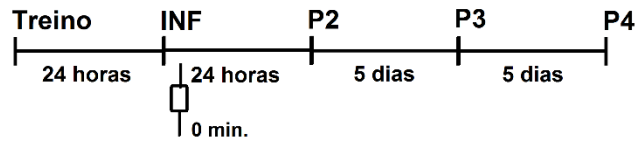
Para realização do grupo controle infusão, os animais passaram pelo mesmo procedimento cirúrgico para implantação de cânulas de infusão e treino no LAM, conforme descrito anteriormente. No entanto, 24 horas após o último treino, não passaram pelo teste e mesmo assim receberam a infusão bilateral intra-hipocampal de salina, glicina 10 nmol/lado ou taurina 100 nmol/lado. Os testes de 24 horas, 5 dias e 10 dias pós-infusão foram realizados normalmente como nos demais grupos experimentais.

Verificamos que houve aprendizado da tarefa por parte dos animais, conforme evidenciado pela redução do tempo médio de latência ao longo dos dias de treino (Figura 16.A) e que a glicina e a taurina infundidas 24 horas pós-treino, sem a realização de uma sessão de reativação sem reforço (teste 24 horas pós-treino), não causou amnésia anterógrada na memória espacial de longa duração recente e remota, conforme evidenciado nos testes de 24 horas, 5 dias e 10 dias pós infusão (Figuras 16.B e 16.C), nos quais não houve diferença significativa dos

grupos para com os respectivos grupos salina em ambos os parâmetros avaliados (percentual de permanência no quadrante-alvo e latência de escape).

Este resultado exclui a possibilidade de que os efeitos verificados anteriormente pela infusão bilateral de glicina ou taurina na região CA1 hipocampal tenham sido independentes de sua infusão ter sido realizada imediatamente após uma sessão de reativação sem reforço (teste 24 horas pós-treino), ou devido a alguma alteração tardia desencadeada pela glicina ou pela taurina, que seria observada nos testes posteriores à sua infusão.

Figura 16 — Controle Infusão



Fonte: A autora. Infusão intra-hipocampal bilateral de glicina ou de taurina 24 horas após o último treino, sem uma sessão de reativação sem reforço (teste 24 horas pós-treino), não prejudica a evocação de memória espacial de longa duração recente e remota na tarefa do LAM, conforme

verificado nos testes de 24 horas, 5 dias e 10 dias pós-infusão. Ratos Wistar machos com cânulas de infusão implantadas bilateralmente mirando a região CA1 do hipocampo, foram treinados por 5 dias no LAM, randomizados aleatoriamente em 3 grupos experimentais e 24 horas após o último treino receberam infusão intra-hipocampal de salina, glicina ou taurina. INF: Infusão de salina, glicina 10 nmol/lado ou taurina 100 nmol/lado bilateralmente na região CA1 hipocampal. (A) Latência média de 8 largadas por dia de treino de todos os ratos até a plataforma de escape. (B) Latência dos testes pós-infusão (24 horas, 5 dias e 10 dias). (C) Percentual de tempo de permanência no quadrante-alvo dos testes pós-infusão (24 horas, 5 dias e 10 dias). Os dados foram expressos em média e em erro padrão da média (\pm EM). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ para o teste t de Student vs. o percentual teórico aleatório de 25%. (n = 6 – 10 ratos por grupo).

5.5.2 Controle Reforço

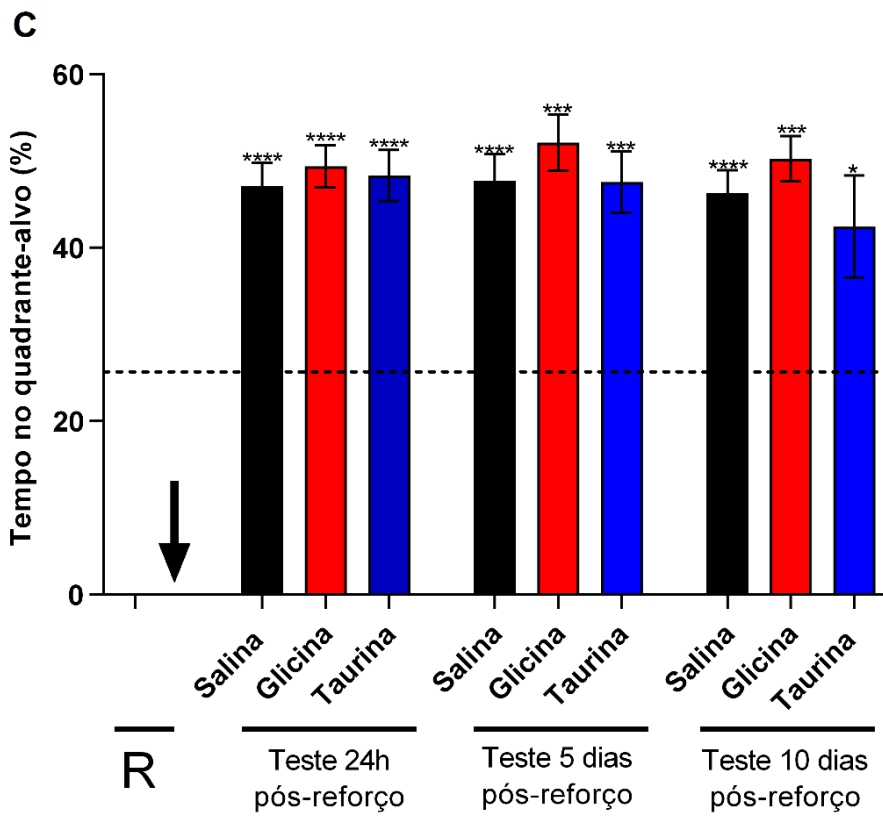
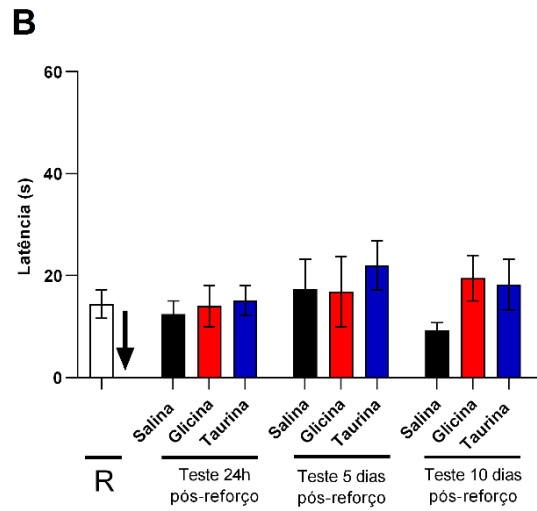
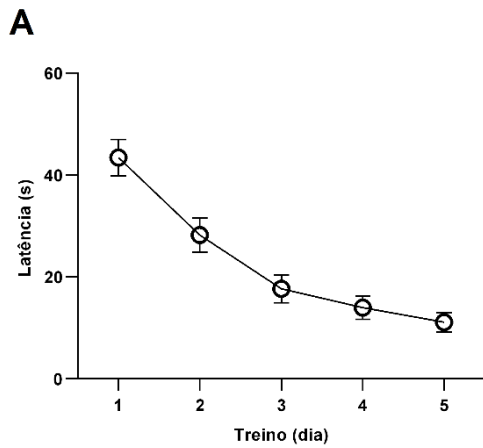
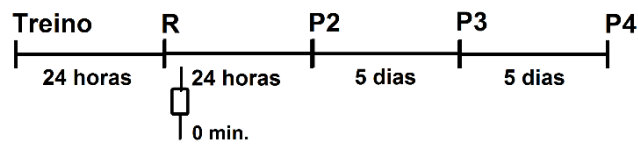
Para realização do grupo controle reforço, os animais passaram pelo mesmo procedimento cirúrgico para implantação de cânulas de infusão e treino no LAM, conforme descrito anteriormente. No entanto, no teste de 24 horas pós-treino, os animais foram submetidos a um teste de 60 segundos com a presença da plataforma de escape no LAM, de forma que este teste se assemelhou com mais uma sessão de treino com reforço. Imediatamente após este teste, os animais receberam infusão bilateral intra-hipocampal, na região CA1 de salina, de glicina na dose de 10 nmol/lado ou de taurina na dose de 100 nmol/lado e foram testados novamente 24 horas, 5 dias e 10 dias pós-infusão.

A infusão de glicina e de taurina imediatamente pós-teste com reforço não causou amnésia anterógrada para a memória espacial de longa duração recente e remota conforme verificado nos testes de 24 horas, 5 dias e 10 dias pós-infusão, uma vez que não houve diferença significativa dos grupos para com os respectivos grupos salina, para ambos os parâmetros avaliados (percentual de permanência no quadrante-alvo e latência de escape) (Figura 17.B e 17.C).

Este resultado condiciona os efeitos da glicina e da taurina infundidas bilateralmente na região CA1 hipocampal verificados anteriormente à ausência do reforço (plataforma de escape) durante a sessão de reativação (teste 24 horas pós-treino), ausência esta necessária para que haja o disparo do processo de liberação, que permite a ocorrência da reconsolidação. Desta forma, tal resultado nos permite afirmar que os efeitos da glicina e da taurina quando infundidas

bilateralmente na região CA1 hipocampal verificados nesta dissertação, são de fato sobre a reconsolidação da memória espacial de longa duração recente e remota.

Figura 17 — Controle Reforço



Fonte: A autora. Infusão intra-hipocampal bilateral de glicina e de taurina imediatamente após teste com reforço não prejudica a reconsolidação de memória espacial de longa duração recente e remota,

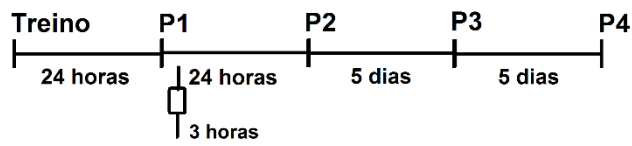
avaliadas pela tarefa do LAM. Ratos Wistar machos com cânulas de infusão implantadas bilateralmente mirando a região CA1 do hipocampo foram treinados por 5 dias no LAM, randomizados aleatoriamente em 3 grupos experimentais (salina, glicina 10 nmol/lado ou taurina 100 nmol/lado infundido bilateralmente na região CA1 hipocampal) e 24 horas após o último treino foram testados com a presença da plataforma de escape. R: reforço (teste realizado 24 horas pós-treino com a presença da plataforma de escape no LAM). (A) Latência média de 8 largadas por dia de treino de todos os ratos até a plataforma de escape. (B) Latência de todos os testes, pós treino (teste 24 horas pós-treino) e dos testes pós-infusão (24 horas, 5 dias e 10 dias). (C) Percentual de tempo de permanência no quadrante-alvo dos testes pós-infusão (24 horas, 5 dias e 10 dias). Os dados foram expressos em média e em erro padrão da média (\pm EM). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ para o teste t vs. o percentual teórico aleatório de 25%. (n = 6 – 10 ratos por grupo).

5.5.3 Controle Temporal

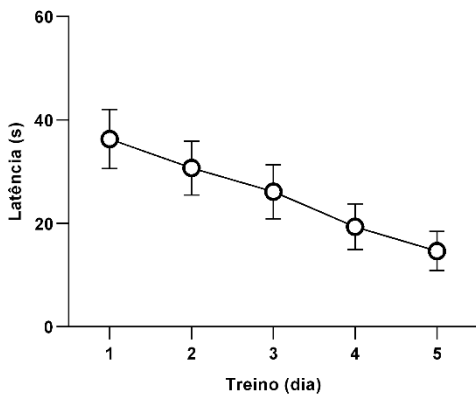
Para a realização do grupo controle temporal, os animais passaram pelo mesmo procedimento cirúrgico para implantação de cânulas de infusão e treino no LAM, conforme descrito anteriormente. Foram testados 24 horas pós-treino e 3 horas após este teste receberam infusão bilateral na região CA1 do hipocampo de salina, glicina na dose de 10 nmol/lado ou taurina na dose de 100 nmol/lado. Foram testados novamente 24 horas, 5 dias e 10 dias após a infusão.

Verificamos que em todos os testes realizados após a infusão (24 horas, 5 dias e 10 dias), a glicina e a taurina não causaram amnésia anterógrada para a memória espacial de longa duração recente e remota, uma vez que não houve diferença significativa dos grupos para os respectivos grupos salina para ambos os parâmetros avaliados (percentual de tempo de permanência no quadrante-alvo e latência de escape) (Figura 18.B e 18.C). Este resultado indica que os efeitos da glicina e da taurina verificados anteriormente sobre a memória espacial de longa duração recente e remota são tempo dependentes, ou seja, só ocorrem se a infusão for realizada imediatamente após sessão de reativação sem reforço (teste 24 horas pós-treino).

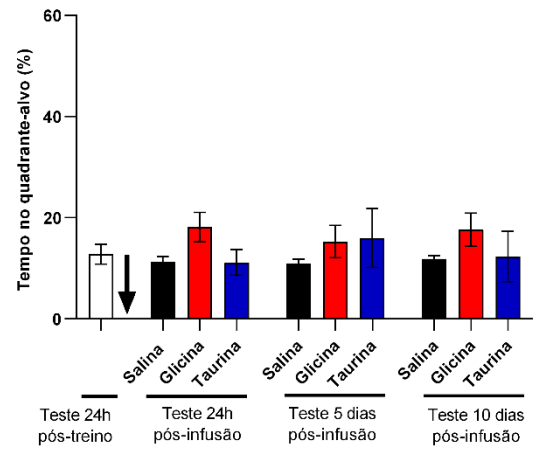
Figura 18 — Controle Temporal



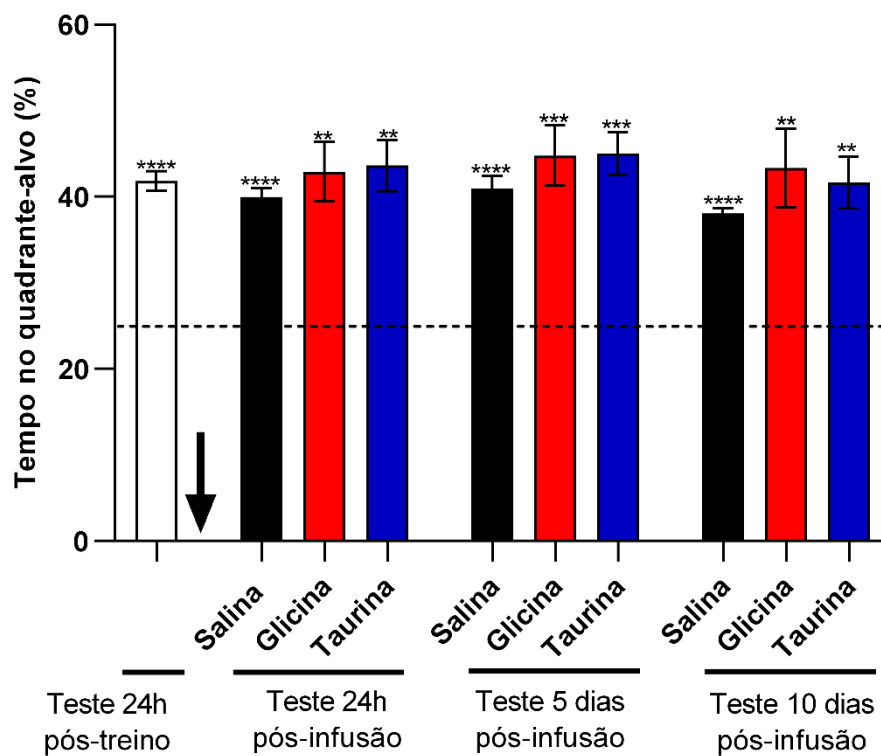
A



B



C



Fonte: A autora. Infusão intra-hipocampal bilateral de glicina ou de taurina 3 horas pós-teste sem reforço, não prejudica a reconsolidação da memória espacial de longa duração recente e remota na tarefa do LAM, conforme verificado nos testes de 24 horas, 5 dias e 10 dias pós-infusão. Ratos Wistar

machos com cânulas de infusão implantadas bilateralmente mirando a região CA1 do hipocampo, foram treinados por 5 dias no LAM, randomizados aleatoriamente em 3 grupos experimentais e 3 horas após o teste de 24 horas pós-treino receberam infusão intra-hipocampal salina, de glicina 10nmol/lado ou taurina 100 nmol/lado. (A) Latência média de 8 largadas por dia de treino de todos os ratos até a plataforma de escape. (B) Latência dos testes pós-infusão (24 horas, 5 dias e 10 dias). (C) Percentual de tempo de permanência no quadrante-alvo dos testes pós-infusão (24 horas, 5 dias e 10 dias). Os dados foram expressos em média e em erro padrão da média (\pm EM). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ para o teste T vs. o percentual teórico de 25%. (n = 6 – 10 ratos por grupo).

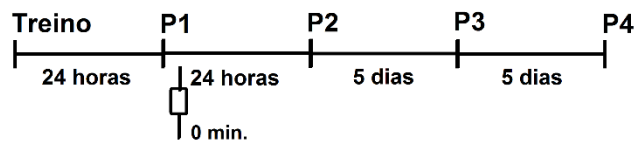
5.5.4 Controle Estrutura

Para realização do grupo controle estrutura, os animais passaram por cirurgia estereotáxica para implantação bilateral de cânulas-guia mirando a região do córtex occipital médio-lateral, situado 1 mm acima da região CA1 do hipocampo. Foram treinados por 5 dias no LAM e testados 24 horas pós-treino. Imediatamente após este teste, receberam infusão bilateral na região do córtex occipital médio-lateral de salina, glicina na dose de 10 nmol/lado ou taurina na dose de 100 nmol/lado. Foram testados novamente 24 horas, 5 dias ou 10 dias após a infusão.

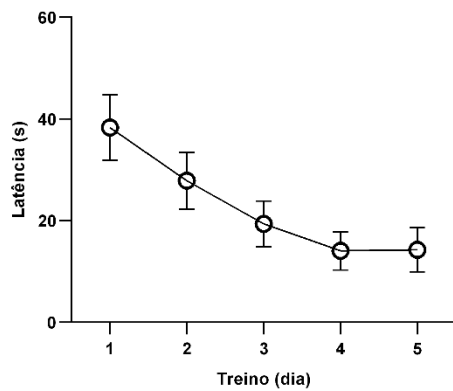
Verificamos que houve aprendizado da tarefa por parte dos animais, conforme evidenciado pela redução do tempo médio de latência ao longo dos dias de treino (Figura 19.A) e que a infusão de glicina ou de taurina imediatamente após teste sem reforço em uma região 1 mm acima da região CA1 do hipocampo não causou amnésia anterógrada para a memória espacial de longa duração recente e remota, conforme evidenciado pelos testes de 24 horas, 5 dias e 10 dias pós-infusão, nos quais não houve diferença significativa dos grupos para com os respectivos grupos salina em ambos os parâmetros avaliados (percentual de tempo de permanência no quadrante-alvo e latência de escape) (Figura 19.B e 19.C).

Este resultado demonstra que os efeitos da glicina e da taurina verificados anteriormente nesta dissertação sobre a reconsolidação da memória espacial de longa duração recente e remota é estrutura-dependente, ou seja, a infusão precisa ser realizada na região CA1 hipocampal.

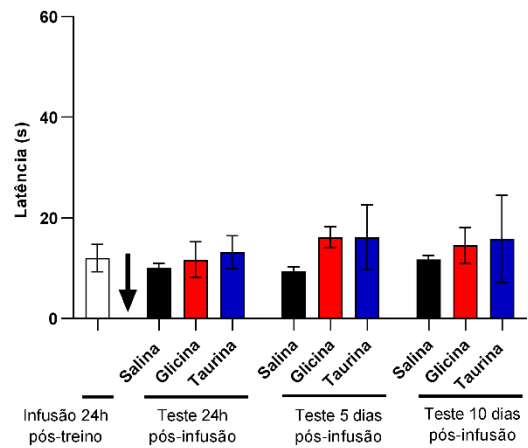
Figura 19 — Controle Estrutura



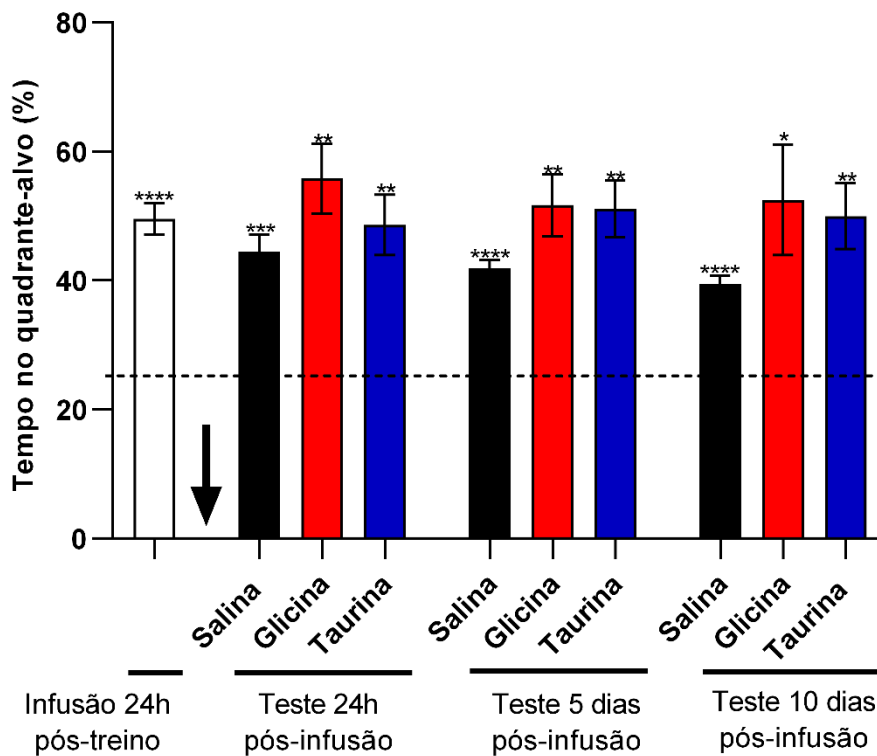
A



B



C



Fonte: A autora. Infusão bilateral de glicina e de taurina no córtex occipital médio-lateral imediatamente pós-teste sem reforço não prejudica a reconsolidação da memória espacial de longa duração recente e remota, referente à tarefa do LAM, conforme verificado nos testes de 24 horas, 5

dias e 10 dias pós-infusão. Ratos Wistar machos com cânulas de infusão implantadas bilateralmente mirando a região do córtex occipital médio-lateral, foram treinados por 5 dias no LAM, randomizados aleatoriamente em 3 grupos experimentais e testados 24 horas após o último treino. Imediatamente após este teste, receberam infusão intra- córtex occipital médio-lateral de salina, glicina 10 nmol/lado ou taurina 100 nmol/lado. (A) Latência média de 8 largadas por dia de treino de todos os ratos até a plataforma de escape. (B) Latência dos testes pós-infusão (24 horas, 5 dias e 10 dias). (C) Percentual de tempo de permanência no quadrante-alvo dos testes pós-infusão (24 horas, 5 dias e 10 dias). Os dados foram expressos em média e em erro padrão da média (\pm EM). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ para o teste t de Student vs. o percentual teórico de 25%. (n = 6 – 10 ratos por grupo).

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, investigamos inicialmente o potencial neuroprotetor da taurina, um agonista do receptor ionotrópico glicinérgico (LYNCH, 2004a), em um modelo animal de neuroinflamação, através da administração crônica e por via oral em ratos submetidos previamente à infusão intra-hipocampal de LPS. Verificamos então que a taurina administrada pelo período de 30 dias nas doses de 20 mg/kg e 200 mg/kg foi capaz de reverter o prejuízo mnemônico causado pelo LPS na memória espacial de longa duração recente e remota, bem como na memória aversiva de longa duração, avaliadas pelas tarefas comportamentais do Labirinto Aquático de Morris e do Medo Condicionado ao Contexto, respectivamente.

Sabendo que a taurina é também agonista parcial do receptor ionotrópico GABA_A (PAZ et al., 2019) e que seus efeitos neuroprotetores se ligando a este receptor já tem sido descritos na literatura, optamos por, na continuidade de nossos experimentos, focar no papel do receptor ionotrópico glicinérgico, que é menos conhecido e estudado do que o do receptor GABA_A, visto que o termo-chave de busca “GABA_A receptor” retorna 19798 resultados no PubMed, enquanto o termo “GlyR receptor” retorna apenas 727 resultados (busca realizada em 01 de novembro de 2020). Assim, avaliamos especificamente o papel da glicina e da taurina na reconsolidação da memória espacial de longa duração, a fim de elucidar melhor nossos resultados acerca da ação neuroprotetora da taurina que pode estar sendo exercida pela sua ligação ao receptor ionotrópico glicinérgico.

Nossa hipótese é de que em situações patológicas que envolvam um mecanismo de neuroinflamação similar ao induzido experimentalmente neste trabalho, por ser um agonista parcial do receptor de glicina e do receptor GABA_A, a taurina promove um influxo de correntes aniônicas para a célula, hiperpolarizando-a, o que dificulta sua despolarização e conseqüentemente reduz a entrada de Ca²⁺ para a célula, inibindo assim o mecanismo de excitotoxicidade causado pela ativação excessiva dos receptores NMDA (VYKLYCKY et al., 2014),(RUGGIERO et al., 2011).

Reforçando nossa hipótese, estudos anteriores já demonstraram que a taurina ao se ligar ao receptor GABA_A reduz a ativação excessiva dos receptores

NMDA (ALBRECHT; SCHOUSBOE, 2005), (LOUZADA et al., 2004). Além disso, sob as evidências de que a neurotransmissão gabaérgica é prejudicada com o envelhecimento devido a diversos fatores, tais como a redução das concentrações de GABA e a redução da funcionalidade de seus receptores e que este prejuízo na função inibitória pode alterar diversas funções cognitivas, foi visto que a suplementação crônica de taurina por 8 meses melhorou a aquisição e retenção da memória em camundongos envelhecidos. Desta forma, tais achados sugerem que a suplementação exógena de taurina melhora o declínio da função gabaérgica que ocorre com o envelhecimento (IDRISSI, 2008).

A taurina tem importantes funções no desenvolvimento do cérebro e suas concentrações são reduzidas com o envelhecimento (BALIOU et al., 2020), (GUPTA; WIN; BITTNER, 2005). Em cultura de células de neurônios corticais de ratos no dia 0 de vida, observou-se que a taurina promove o crescimento de neuritos e estimula a formação de sinapses (MERSMAN et al., 2020).

Ainda em cultura de células, em modelo de lesão traumática do encéfalo, neurônios e astrócitos foram tratados com taurina nas doses 100, 200, ou 300 mg/l por 72 h e os resultados obtidos demonstraram que a taurina foi capaz de reduzir as espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células lesionadas, reduzindo a peroxidação lipídica, aumentando a glutathiona reduzida (GSH) e a atividade da superóxido dismutase (SOD), da catalase, da glutathiona peroxidase (Gpx) e da acetilcolinesterase (AChE), exercendo assim, ação antioxidante. No mesmo estudo, observou-se também que o tratamento com taurina exerceu ação anti-inflamatória ao reduzir os níveis de TNF- α e de IL-6 e antiapoptótica, ao reduzir os marcadores de apoptose caspase-3, p53, bcl-2 e bax (NIU et al., 2018).

Neste trabalho investigamos também o papel dos receptores ionotrópicos glicinérgicos sobre a reconsolidação da memória espacial recente e remota, através da administração *in loco* da glicina, agonista principal deste receptor, na região CA1 hipocampal de ratos em condições não patológicas. Posteriormente, sabendo que a taurina se liga aos receptores ionotrópicos glicinérgicos e GABA_A com afinidades próximas (DUTERTRE et al., 2012),(DOMINGUEZ-PERROT; FELTZ; POULTER, 1996), investigamos também o seu efeito *in loco* na região CA1 hipocampal sobre a

reconsolidação da memória espacial de longa duração recente e remota, para fins de comparação desse efeito com o da glicina.

Verificamos que a taurina, quando administrada na região CA1 do hipocampo imediatamente após sessão de reativação sem reforço, prejudica a reconsolidação da memória espacial de longa duração recente e remota em todos os testes realizados (24 horas, 5 dias e 10 dias pós-infusão) somente na dose de 100 nmol/lado, a maior dose avaliada.

Corroborando com nossos resultados, um estudo anterior avaliou em ratos os efeitos da taurina administrada via intracerebroventricular e intraperitoneal no aprendizado e na memória espacial no LAM, e verificou que no grupo que recebeu infusão intracerebroventricular de taurina houve um prejuízo no aprendizado e na retenção da memória, enquanto que no grupo que recebeu a infusão intraperitoneal, não houve diferença significativa em nenhum parâmetro com relação aos controles (ITO et al., 2012). Estes dados, somados às evidências já apresentadas anteriormente, reforçam mais uma vez nossa hipótese levantada a partir de nossos resultados de que a taurina, quando administrada por via oral em situações patológicas exerce efeito neuroprotetor, uma vez que ao administrá-la por via oral por 30 dias em ratos submetidos previamente à infusão intra-hipocampal de LPS, esta foi capaz de reverter o prejuízo mnemônico causado pela neuroinflamação, mas ao administrá-la *in loco* na região CA1 hipocampal, verificamos prejuízo na reconsolidação da memória espacial.

Essa discrepância quanto aos efeitos da taurina quando administrada sistemicamente versus *in loco* numa região implicada na consolidação e reconsolidação de memórias declarativas (região CA1 hipocampal) pode ser explicada pelo fato de na primeira situação a taurina estar agindo em um cenário em que há um quadro de excitotoxicidade desencadeado em consequência de um processo neuroinflamatório (SUBHRAMANYAM et al., 2019), onde um agente hiperpolarizante pode ser bem vindo, diferentemente do cenário fisiológico que caracteriza a segunda fase dos experimentos, em que a taurina foi infundida localmente na região CA1 hipocampal.

Também é importante destacar que a taurina não atravessa facilmente a BHE (RIPPS; SHEN, 2012), na qual existe um sistema de transporte dependente de Na⁺

e Cl⁻, que pode ser regulado por diversos fatores, dentre eles a osmolalidade e o TNF- α . Em ratos, foi visto que após a microinjeção desta citocina ocorre uma redução do efluxo de taurina do cérebro para o sangue inversamente proporcional à concentração de TNF- α . Além disso, no mesmo estudo, observou-se que 40 minutos após a microinjeção, ocorreu o efluxo de 46% da taurina do cérebro para o sangue (LEE; KANG, 2004). Ainda, em cultura de células endoteliais de capilares cerebrais, um modelo *in vitro* de BHE, observou-se que o tratamento com TNF- α aumentou a absorção de taurina pelas células, bem como a expressão de RNA mensageiro (RNAm) do transportador TauT (KANG et al., 2002), demonstrando que o TNF- α exerce ação moduladora no transporte de taurina na BHE.

Visto que o TNF- α é uma citocina pró-inflamatória liberada no SNC pelos astrócitos e pela micróglia em grandes quantidades frente a situações patológicas (OLMOS; LLADÓ, 2014), tais evidências fortalecem a hipótese levantada a partir de nossos resultados de que a taurina exerce ação neuroprotetora quando administrada por via oral em situações patológicas ao se ligar aos receptores de glicina e GABA_A, uma vez que em doenças que desenvolvem um quadro neuroinflamatório, como TCE, DA, DP, ELA e isquemia cerebral, a liberação de TNF- α aumenta (OLMOS; LLADÓ, 2014), e esta citocina por sua vez, modula a passagem de taurina pela BHE, conforme descrito anteriormente.

Além disso, a taurina previne a excitotoxicidade glutamatérgica ao regular a [Ca²⁺] intracelular e o metabolismo energético mitocondrial. A mitocôndria tem grande capacidade de captar Ca²⁺ do citoplasma e os receptores de glutamato quando estimulados promovem grande influxo de Ca²⁺ para a célula, prejudicando o metabolismo energético mitocondrial. Em cultura de células, observou-se que o tratamento prévio com taurina, promoveu o retorno aos níveis basais de Ca²⁺ intracelular após a ativação dos receptores de glutamato, demonstrando seu papel na regulação da homeostase do Ca²⁺ (EL IDRISSEI; TRENKNER, 1999).

Já com relação à glicina, verificamos este efeito prejudicial sobre a reconsolidação da memória espacial de longa duração recente e remota somente na dose de 10 nmol/lado, a dose intermediária avaliada. Não verificamos nenhum efeito nas doses de 1 nmol/lado e de 100 nmol/lado.

Além do receptor ionotrópico glicinérgico GlyR, ao qual a glicina se liga com afinidade mensurável por um EC₅₀ variando entre 90 e 720 μM (DUTERTRE et al., 2012), a glicina também se liga ao seu sítio co-agonista nos receptores NMDA (VYKLICKY et al., 2014), (BRADY et al., 2012), com afinidade mensurável por um EC₅₀ variando entre 30-40 nM (BERGER, 1995) a 1-3 μM (CUMMINGS; POPESCU, 2015). Assim, a glicina possui uma afinidade maior pelo seu sítio co-agonista no receptor NMDA do que ao seu próprio receptor ionotrópico GlyR.

Outro fator que precisa ser considerado é a densidade desses receptores na região CA1 hipocampal de ratos. Nesta região, a densidade de receptores NMDA é maior do que a de receptores GlyR (PALOMERO-GALLAGHER; BIDMON; ZILLES, 2003), (FROSTHOLM; ROTTER, 1985).

Com estas duas informações juntas, sobre as afinidades e as densidades dos receptores NMDA e GlyR, sugerimos a seguinte explicação para a curva em U observada: a glicina na dose de 1 nmol/lado, por afinidade, liga-se preferencialmente ao seu sítio co-agonista no receptor NMDA, promovendo uma maior excitabilidade dos neurônios afetados, desta forma não prejudicando os vários tipos de LTP que possam estar ocorrendo nesses neurônios de forma a contribuir com o processo de reconsolidação em andamento. Já numa dose maior, de 10 nmol/lado, os receptores GlyR passam a ser acionados, e seu efeito hiperpolarizante neutraliza e sobrepuja os efeitos despolarizantes dos receptores pró-LTP mobilizados pela reconsolidação (receptores glutamatérgicos AMPA, kainato, NMDA e metabotrópicos (LYNCH, 2004b),(RAYMOND, 2007), explicando o prejuízo observado no desempenho dos animais nos testes posteriores à infusão de glicina nesta dose pós-teste na reconsolidação da memória espacial de longa duração recente e remota. Já na dose mais elevada, de 100 nmol/lado, devido a densidade dos receptores NMDA ser maior do que a dos GlyR, o efeito somado da glicina nesses receptores passa a sobrepujar o seu efeito nos receptores GlyR, que já se encontram saturados. Para comprovar esta explicação, necessitaríamos realizar um experimento de *receptor-binding* diferencial entre os receptores GlyR e NMDA para a glicina nessas diferentes doses, o que fica como sugestão para projetos futuros.

Voltando para a análise dos resultados obtidos sobre a ação da taurina sobre a reconsolidação, notamos que não houve a curva em U verificada para a glicina.

Como a taurina não se liga ao sítio co-agonista de glicina no receptor NMDA, este resultado é coerente com a explicação acima sugerida para o efeito dose-dependente em U observado com a glicina. Mas resta ainda um outro detalhe digno de nota nos resultados da ação dose-dependente da taurina sobre a reconsolidação de memória espacial recente e remota. Na dose de 10 nmol/lado, a taurina prejudicou a reconsolidação da memória espacial remota, mas não da recente. Este resultado, junto com outro resultado que mostrou que a inibição imediatamente pós-teste da enzima CaMKII na região CA1 hipocampal também prejudica seletivamente a reconsolidação da memória espacial remota mas não da recente (DA SILVA et al., 2013), reforça a tese de que o processo de reconsolidação de memória remota possui diferenças no nível de transdução de sinais subjacentes em relação ao processo de reconsolidação de memória recente. E este resultado ainda sugere um vínculo entre a ativação de receptores GlyR e GABA_A e a diminuição da ativação da enzima CaMKII, o que faz sentido se considerarmos que uma maior hiperpolarização neuronal acarreta em menor ativação tanto de receptores NMDA quando de canais L-VDCC, fontes de entrada de Ca²⁺ para o citoplasma, necessário para se ligar a calmodulina e subsequentemente para a ativação da CaMKII. Estudos farmacológicos para testar esta hipótese também surgem como projetos futuros relativos ao presente trabalho.

Por fim, acreditamos no potencial translacional de nossos resultados para a realização de estudos futuros em humanos acerca do potencial neuroprotetor da taurina administrada por via oral, uma vez que a taurina é uma substância endógena, de ampla distribuição e funcionalidade em diversos órgãos (RIPPS; SHEN, 2012) e já consumida por humanos e amplamente utilizada em bebidas energéticas (PEREIRA et al., 2012), o que reduz a ocorrência de possíveis efeitos tóxicos. Estudos de ensaio clínico randomizados, bem como revisões sistemáticas desses estudos são sugestões de projetos futuros neste sentido.

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste estudo pudemos concluir que:

- A taurina administrada por via oral, por 30 dias, nas doses de 20 mg/kg e 200 mg/kg foi capaz de reverter o prejuízo mnemônico causado pela neuroinflamação induzida por LPS na memória espacial de longa duração recente e remota de ratos, exercendo assim efeito neuroprotetor cognitivo;
- Na dose 200 mg/kg, administrada por via oral, por 30 dias, o efeito neuroprotetor da taurina foi observado também, mais tardiamente na memória aversiva, na qual foi capaz de reverter o prejuízo mnemônico causado pela neuroinflamação induzida por LPS em ratos;
- A glicina quando infundida bilateralmente na região CA1 do hipocampo de ratos, imediatamente após o primeiro teste (24 horas pós-treino) no LAM, na dose de 10 nmol/lado prejudicou a reconsolidação da memória espacial de longa duração recente (teste 24 horas pós-infusão) e remota (testes 5 dias e 10 dias pós-infusão) em ratos;
- A taurina quando infundida bilateralmente na região CA1 do hipocampo de ratos, imediatamente após o primeiro teste (24 horas pós-treino) no LAM, na dose de 100 nmol/lado prejudicou a reconsolidação da memória espacial de longa duração recente (teste 24 horas pós-infusão) e remota (testes 5 dias e 10 dias pós-infusão) e na dose de 10 nmol/lado, prejudicou apenas a reconsolidação da memória espacial de longa duração remota (testes 5 dias e 10 dias pós-infusão);
- Os resultados obtidos a partir da infusão intra-hipocampal bilateral de taurina e salina na reconsolidação da memória espacial de longa duração recente e remota, avaliada pela tarefa comportamental do LAM foram confirmados através da realização dos controles experimentais: infusão, reforço, temporal e estrutura;
- Desta forma concluímos, que a taurina administrada por via oral em situações patológicas que apresentem um quadro subjacente de neuroinflamação, como o induzido pelo LPS neste estudo, pode exercer ação neuroprotetora, por estar agindo em um cenário excitotóxico. Como perspectivas futuras, acreditamos no potencial translacional destes resultados como uma possível

ferramenta terapêutica em doenças que afetam o SNC e que apresentam a neuroinflamação como mecanismo subjacente. No entanto, são necessárias investigações futuras visando avaliar a presença de mediadores inflamatórios em animais tratados com taurina, bem como seus efeitos no nível bioquímico e histológico.

8 REFERÊNCIAS

- ALBERINI, C. M. Mechanisms of memory stabilization : are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes ? **Trends in Neurosciences**, v. 28, n. 1, p. 51–56, 2005.
- ALBERTO, C.; JÚNIOR, M.; FARIA, N. C. Memória. **Psychology/Psicologia: Reflexão e Crítica**, v. 28, n. 4, p. 780–788, 2015.
- ALBRECHT, J.; SCHOUSBOE, A. Taurine Interaction with Neurotransmitter Receptors in the CNS: An Update*. **Neurochemical Ressearch**, v. 30, n. 12, p. 1615–1621, 2005.
- BALIOU, S. et al. Significance of taurine transporter (TauT) in homeostasis and its layers of regulation (review). **Molecular Medicine Reports**, v. 22, p. 2163–2173, 2020.
- BEKINSCHTEIN, P. et al. Persistence of Long-Term Memory Storage Requires a Late Protein Synthesis- and BDNF- Dependent Phase in the Hippocampus. **Neuron**, v. 53, n. 2, p. 261–277, 2007.
- BERGER, M. L. On the true affinity of glycine for its binding site at the NMDA receptor complex. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 34, p. 79–88, 1995.
- BEVILAQUA, L. I. A. R. M. et al. The evidence for hippocampal long-term potentiation as a basis of memory for simple tasks. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 80, n. 1, p. 115–127, 2008.
- BRADY, S. T. et al. **BASIC NEUROCHEMISTRY**. 8° Edition ed. [s.l: s.n.].
- CHAAYA, N.; BATTLE, A. R.; JOHNSON, L. R. An update on contextual fear memory mechanisms: Transition between Amygdala and Hippocampus. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 92, p. 43–54, 2018.
- CHEN, W. W.; ZHANG, X.; HUANG, W. J. Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review). **Molecular Medicine Reports**, v. 13, p. 3391–3396, 2016.

CRUZ-MACHADO, S. DA S. Lipopolissacarídeo (lps): ativador e regulador da transcrição gênica via fator de transcrição nfkb. **Revista da Biologia**, v. 4, p. 40–43, 2010.

CUMMINGS, K. A.; POPESCU, G. K. Glycine-dependent activation of NMDA receptors. **Journal of General Physiology**, v. 145, n. 6, p. 513–527, 2015.

DA SILVA, W. C. et al. Inhibition of mRNA Synthesis in the Hippocampus Impairs Consolidation and Reconsolidation of Spatial Memory. **Hippocampus**, v. 18, p. 29–39, 2008.

DA SILVA, W. C. et al. Memory reconsolidation and its maintenance depend on L-voltage-dependent calcium channels and CaMKII functions regulating protein turnover in the hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 16, p. 6566–6570, 2013.

DE SOUSA, A. A.; BRAGA, S. A.; DA ROCHA SOBRINHO, H. M. Neuroinflamação na doença de Parkinson. **Evs**, v. 43, n. 1, p. 78–89, 2016.

DICKSON, K.; LEHMANN, C. Inflammatory Response to Different Toxins in Experimental Sepsis Models. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 1–13, 2019.

DOMINGUEZ-PERROT, C.; FELTZ, P.; POULTER, M. O. Recombinant GABA(A) receptor desensitization: The role of the $\gamma 2$ subunit and its physiological significance. **Journal of Physiology**, v. 497, n. 1, p. 145–159, 1996.

DUTERTRE, S. et al. Probing the pharmacological properties of distinct subunit interfaces within heteromeric glycine receptors reveals a functional $\beta\beta$ agonist-binding site. **Journal of Neurochemistry**, v. 122, p. 38–47, 2012.

EL IDRISSE, A. E.; TRENKNER, E. Growth factors and taurine protect against excitotoxicity by stabilizing calcium homeostasis and energy metabolism. **Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 21, p. 9459–9468, 1999.

EPSTEIN, R. A. et al. The cognitive map in humans: Spatial navigation and beyond. **Nature Neuroscience**, v. 20, n. 11, p. 1504–1513, 2017.

ERKKINEN, M. G.; KIM, M. O.; GESCHWIND, M. D. Clinical neurology and epidemiology of the major neurodegenerative diseases. **Cold Spring Harbor**

Perspectives in Biology, v. 10, n. 4, p. 1–44, 2018.

FERNÁNDEZ, G.; MORRIS, R. G. M. Memory , Novelty and Prior Knowledge. **Trends in Neurosciences**, v. 41, n. 10, p. 654–659, 2018.

FROSTHOLM, A.; ROTTER, A. Glycine receptor distribution in mouse CNS: autoradiographic localization of [3H]strychnine binding sites. **Brain Research Bulletin**, v. 15, p. 473–486, 1985.

GIBSON, B. M.; MAIR, R. A pathway for spatial memory encoding. **Learning & Behavior**, v. 44, p. 97–98, 2016.

GUPTA, R.; WIN, T.; BITTNER, S. Taurine Analogues; A New Class of Therapeutics: Retrospect and Prospects. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 763–771, 2005.

HALL, J. C. Glycine. **Journal of parenteral and Enteral Nutrition**, v. 22, n. 6, p. 393–398, 1998.

IDRISSI, A. EL. Taurine improves learning and retention in aged mice. **Neuroscience Letters**, v. 436, p. 19–22, 2008.

IDRISSI, A. EL. Taurine Regulation of Neuroendocrine Function. In: **Taurine 11, Advances in Experimental Medicine and Biology**. [s.l: s.n.]. p. 977–985.

ITO, K. et al. Intracerebroventricular administration of taurine impairs learning and memory in rats. **Nutritional Neuroscience**, v. 15, n. 2, p. 70–77, 2012.

IZQUIERDO, I. A. et al. Memória : tipos e mecanismos – achados recentes. **Revista USP**, n. 98, p. 9–16, 2013.

IZQUIERDO, I.; FURINI, C. R. G.; MYSKIW, J. C. Fear memory. **physiological Reviews**, v. 96, p. 695–750, 2016.

KANDEL, E. R. et al. **Princípios de Neurociências**. 5° Edição ed. [s.l: s.n.].

KANG, Y. S. et al. Regulation of taurine transport at the blood-brain barrier by tumor necrosis factor- α , taurine and hypertonicity. **Journal of Neurochemistry**, v. 83, p. 1188–1195, 2002.

KIRSCH, J. Glycinergic transmission. **Cell Tissue Ressearch**, v. 326, p. 535–540, 2006.

- KUMAR, V. Toll-like receptors in the pathogenesis of neuroinflammation. **Journal of Neuroimmunology**, v. 332, p. 16–30, 2019.
- LAU, A.; TYMIANSKI, M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. **European Journal of Physiology**, v. 460, p. 525–542, 2010.
- LE-CORRONC, H. et al. GABAA receptor and glycine receptor activation by paracrine/autocrine release of endogenous agonists: More than a simple communication pathway. **Molecular Neurobiology**, v. 44, p. 28–52, 2011.
- LEE, J. L. C. Reconsolidation: maintaining memory relevance. **Trends in Neurosciences**, v. 32, n. 8, p. 413–420, 2009.
- LEE, N. Y.; KANG, Y. S. The brain-to-blood efflux transport of taurine and changes in the blood-brain barrier transport system by tumor necrosis factor- α . **Brain Research**, v. 1023, p. 141–147, 2004.
- LOUZADA, P. R. et al. Taurine prevents the neurotoxicity of beta-amyloid and glutamate receptor agonists: activation of GABA receptors and possible implications for Alzheimer's disease and other neurological disorders. **The FASEB Journal**, v. 18, p. 511–518, 2004.
- LYNCH, J. W. Molecular Structure and Function of the Glycine Receptor Chloride Channel. **Physiol Rev**, v. 84, p. 1051–1095, 2004a.
- LYNCH, J. W. Native glycine receptor subtypes and their physiological roles. v. 56, p. 303–309, 2009.
- LYNCH, M. A. Long-Term Potentiation and Memory. **physiological Reviews**, v. 84, p. 87–136, 2004b.
- MAREN, S.; PHAN, K. L.; LIBERZON, I. The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 14, n. 6, p. 417–428, 2016.
- MERSMAN, B. et al. Taurine Promotes Neurite Outgrowth and Synapse Development of Both Vertebrate and Invertebrate Central Neurons. **Frontiers in Synaptic Neuroscience**, v. 12, p. 1–18, 2020.
- MOSER, E. I.; KROPFF, E.; MOSER, M. Place Cells , Grid Cells , and the Brain ' s

Spatial Representation System. **Annual Review of Neuroscience**, v. 31, p. 69–89, 2008.

MOSER, M.; ROWLAND, D. C.; MOSER, E. I. Place Cells, Grid Cells, and Memory. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, p. 1–16, 2015.

NADER, K.; HARDT, O. A single standard for memory : the case for reconsolidation. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, p. 224–234, 2009.

NIU, X. et al. Protective effects of taurine against inflammation, apoptosis, and oxidative stress in brain injury. **Molecular Medicine Reports**, v. 18, p. 4516–4522, 2018.

OLMO, N. DEL et al. Taurine activates GABAA but not GABAB receptors in rat hippocampal CA1 area. **Brain Ressearch**, v. 864, p. 298–307, 2000.

OLMOS, G.; LLADÓ, J. Tumor necrosis factor alpha: A link between neuroinflammation and excitotoxicity. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, p. 1–12, 2014.

PALOMERO-GALLAGHER, N.; BIDMON, H. J.; ZILLES, K. AMPA, kainate, and NMDA receptor densities in the hippocampus of untreated male rats and females in estrus and diestrus. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 459, p. 468–474, 2003.

PAZ, L. O. et al. Taurine and GABA neurotransmitter receptors, a relationship with therapeutic potential? Taurine and GABA neurotransmitter receptors, a relationship with therapeutic potential? **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 19, n. 4, p. 289–291, 2019.

PEREIRA, J. C. et al. Efeito da ingestão de taurina no desempenho físico: uma revisão sistemática. **Revista Andaluza de Medicina del Deporte**, v. 5, n. 4, p. 156–162, 2012.

QIN, L. et al. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. **Glia**, v. 55, n. 5, p. 453–462, 2007.

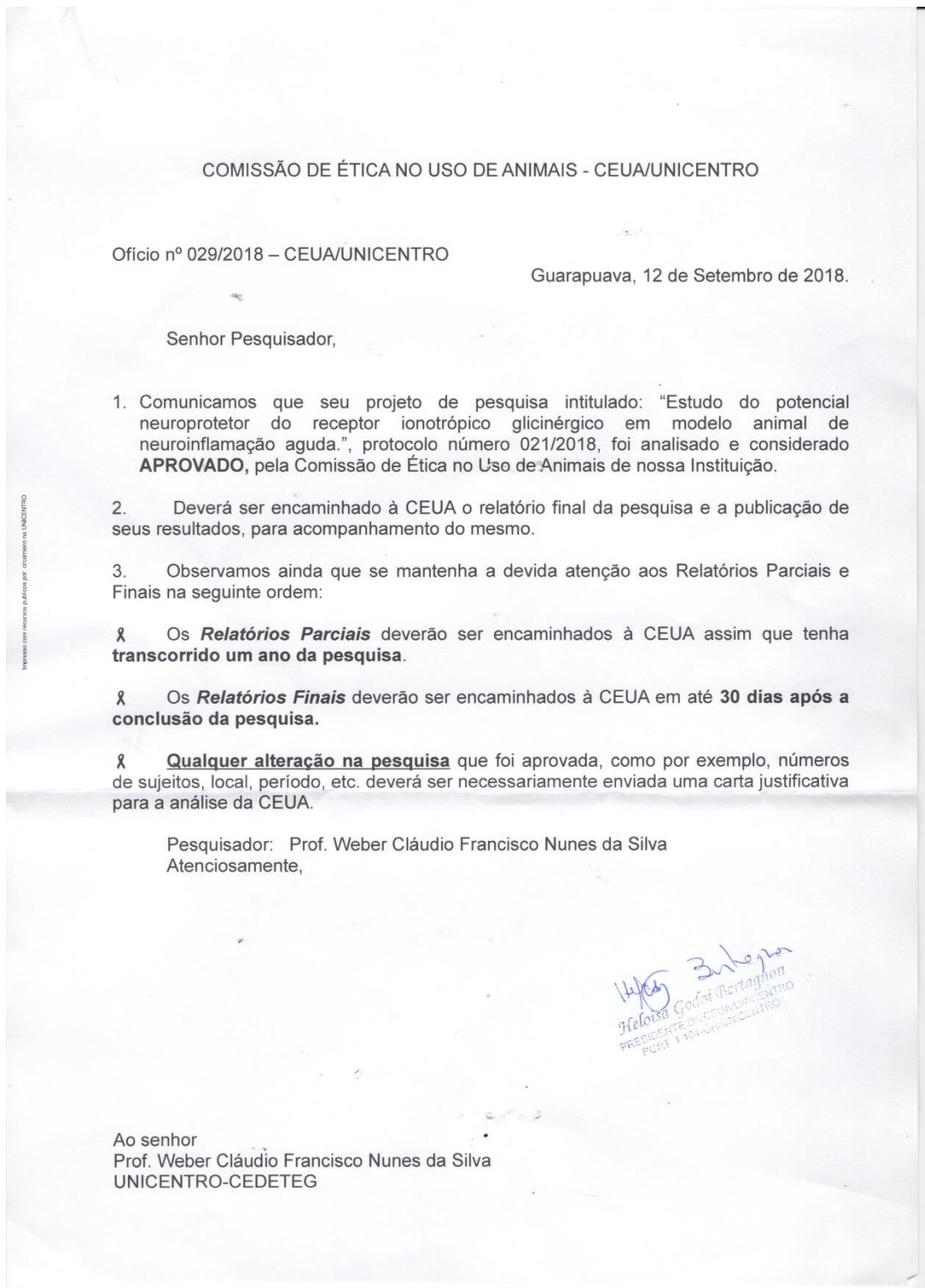
RALLI, M. et al. Amyotrophic lateral sclerosis: Autoimmune pathogenic mechanisms, clinical features, and therapeutic perspectives. **Israel Medical Association Journal**, v. 21, p. 438–443, 2019.

- RANSOHOFF, R. M. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. **Science**, v. 353, n. 6301, p. 777–783, 2016.
- RAYMOND, C. R. LTP forms 1, 2 and 3: different mechanisms for the “long” in long-term potentiation. **Trends in Neurosciences**, v. 30, n. 4, p. 167–175, 2007.
- RIPPS, H.; SHEN, W. Review: Taurine: A “very essential” amino acid. **Molecular Vision**, v. 18, p. 2673–2686, 2012.
- RUGGIERO, R. N. et al. Neurotransmissão glutamatérgica e plasticidade sináptica : aspectos moleculares, clínicos e filogenéticos. **Medicina**, v. 44, n. 2, p. 143–156, 2011.
- SCHWABE, L.; NADER, K.; PRUESSNER, J. C. Reconsolidation of Human Memory_ Brain Mechanisms and Clinical Relevance. **Biological Psychiatry**, v. 76, n. 4, p. 274–280, 2014.
- SEEMANN, S.; ZOHLES, F.; LUPP, A. Comprehensive comparison of three different animal models for systemic inflammation. **Journal of Biomedical Science**, v. 24, n. 60, p. 1–17, 2017.
- SOLSTAD, T.; MOSER, E. I.; EINEVOLL, G. T. From grid cells to place cells: A mathematical model. **Hippocampus**, v. 16, n. 12, p. 1026–1031, 2006.
- STEPHENSON, J. et al. Inflammation in CNS neurodegenerative diseases. **Immunology**, v. 154, p. 204–219, 2018.
- SUBHRAMANYAM, C. S. et al. Biology Microglia-mediated neuroinflammation in neurodegenerative diseases. **Seminars in Cell & Developmental**, v. 94, p. 112–120, 2019.
- SUZUMURA, A. Neuron-microglia interactions in neuroinflammation. **Current Protein and Peptide Science**, v. 14, p. 16–20, 2013.
- TANG, Y.; LE, W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. **Molecular Neurobiology**, v. 53, p. 1181–1194, 2016.
- TONEGAWA, S.; MORRISSEY, M. D.; KITAMURA, T. The role of engram cells in the systems consolidation of memory. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 19, p. 485–498, 2018.

- TRONSON, N. C.; TAYLOR, J. R. Molecular mechanisms of memory reconsolidation. **Nature Reviews Neurology**, v. 8, p. 262–275, 2007.
- VIVIANI, B. et al. Perspectives on neuroinflammation and excitotoxicity: A neurotoxic conspiracy? **NeuroToxicology**, v. 43, p. 10–20, 2014.
- VYKLICKY, V. et al. Structure , Function , and Pharmacology of NMDA Receptor Channels. **Physiological Ressearch**, v. 63, p. 191–203, 2014.
- WALLACE, T. L. et al. Drug targets for cognitive enhancement in neuropsychiatric disorders. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 99, p. 130–145, 2011.
- WANG, X. et al. Lipopolysaccharide-induced inflammation and perinatal brain injury. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, v. 11, p. 343–353, 2006.
- WEN, C. et al. Taurine is Involved in Energy Metabolism in Muscles , Adipose Tissue , and the Liver. **Molecular Nutrition Food Ressearch**, v. 63, p. 1–11, 2019.
- ZELIKOWSKY, M. et al. Prefrontal microcircuit underlies contextual learning after hippocampal loss. **PNAS**, v. 110, n. 24, p. 9938–9943, 2013.
- ZELIKOWSKY, M.; BISSIERE, S.; FANSELOW, M. S. Contextual Fear Memories Formed in the Absence of the Dorsal Hippocampus Decay Across Time. **The Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 10, p. 3393–3397, 2012.

9 ANEXOS

9.1 ANEXO I - APROVAÇÃO CEUA



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA/UNICENTRO


Ofício nº 018/2019 – CEUA/UNICENTRO

Guarapuava, 27 de maio de 2019.

Senhor Pesquisador,

1. Comunicamos que seu projeto de pesquisa intitulado: "Estudo do potencial neuroprotetor do receptor ionotrópico glicinérgico em modelo animal de neuroinflamação aguda", protocolo número 013/2019, foi analisado e considerado **APROVADO**, pela Comissão de Ética no Uso de Animais de nossa Instituição.
2. Deverá ser encaminhado à CEUA o relatório final da pesquisa e a publicação de seus resultados, para acompanhamento do mesmo.
3. Observamos ainda que se mantenha a devida atenção aos Relatórios Parciais e Finais na seguinte ordem:
 - Os **Relatórios Parciais** deverão ser encaminhados à CEUA assim que tenha **transcorrido um ano da pesquisa**.
 - Os **Relatórios Finais** deverão ser encaminhados à CEUA em até **30 dias após a conclusão da pesquisa**.
 - **Qualquer alteração na pesquisa** que foi aprovada, como por exemplo, números de sujeitos, local, período, etc. deverá ser necessariamente enviada uma carta justificativa para a análise da CEUA.

Pesquisador: Weber Cláudio Francisco Nunes da Silva
Atenciosamente,


Ivo Ivan Kerppers
Presidente da Ceua/Unicentro
Port. nº 411- GR/Unicentro-2019

Ao Senhor
Weber Cláudio Francisco Nunes da Silva
UNICENTRO-CEDETEG