

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

**EFEITOS DA BICUCULINA EM DIFERENTES
ESTRUTURAS CEREBRAIS NO
PROCESSAMENTO DA MEMÓRIA EM RATOS**

Dissertação de Mestrado

Tatiana Luft

Porto Alegre, 2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

**EFEITOS DA BICUCULINA EM DIFERENTES
ESTRUTURAS CEREBRAIS NO
PROCESSAMENTO DA MEMÓRIA EM RATOS**

TATIANA LUFT

Orientador:

Prof. Dr. IVAN IZQUIERDO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) como requisito básico para obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Porto Alegre, 2003.

*Dedico esta dissertação aos meus pais
que durante toda a minha vida não mediram
esforços e dedicação para que eu conseguisse alcançar
os objetivos até hoje alcançados.
Se hoje sou uma pessoa feliz e realizada, devo isso a vocês.
Amo vocês, Anildo e Rosemarie!*

AGRADECIMENTOS

Ao mestre:

Ao **Prof. Izquierdo**, por ter me concedido a oportunidade de trabalhar sob sua orientação, e também por sua ajuda, dedicação, confiança no meu trabalho, amizade e experiência.

Aos colegas e amigos:

À minha (melhor) amiga **Grace Schenatto Pereira**, um agradecimento especial pela dedicação, pela força, por toda ajuda. Não se encontram mais pessoas como você, um exemplo de amizade verdadeira. Agradeço a Deus por ter você como amiga... essa dissertação é tua também!

Ao pessoal do laboratório: - **Mônica Vianna**, agradeço pela enorme ajuda na revisão de trabalhos, nas idéias, nos conselhos. Admiro seu amor e sua dedicação à Bioquímica da Memória; - **Juliana Bonini** - minha fiel companheira de laboratório e amiga de apartamento; - **Janine**, pela ajuda no trabalho e pela amizade; - **Leticia**, pelas horas a fio no Radial Maze e fazendo os seminários do Mestrado; - **Lucy** (Luciana Izquierdo), pela ótima recepção e amizade; **Daniel**, **Duda**, **Lia**, **Martin**, **Adri**, **Pati Pereira**, pela ótima convivência no Centro de Memória; - pelos alunos de Iniciação Científica: **Bruno**, **Viviane**, **Rafael**, **Cristiano** (meus ex-alunos queridos), **Humberto**, **Tiago**, **Mário**, **Bia**... sem vocês nenhum trabalho estaria concluído.

Aos professores das disciplinas do Mestrado, pelo grande aporte científico e conhecimentos indispensáveis para a realização deste trabalho.

À família:

Aos meus pais, pelo interesse, pela dedicação e pelo amor. Devo tudo a vocês, este aqui é outro degrau que alcanço graças a vocês. Agradeço a Deus todos os dias de ter vocês como meus pais. Amo vocês.

Aos meus irmãos: Renato, Tânia e Rogério, pelo interesse em saber alguma coisa a mais sobre memória, pelo amor e pela amizade – vocês são muito importantes para mim. Aos meus sobrinhos, em especial ao Rennan, que se interessava muito sobre meu trabalho e 'vez-em-quando' ia ao laboratório comigo, para ver a “fábrica de ratos”. Às minhas cunhadas e ao meu cunhado, por todo amor dedicado aos meus irmãos e a minha irmã, conseqüentemente a mim.

SUMÁRIO

Resumo _____	viii
Abstract _____	ix
Índice de Figuras _____	x
1. Introdução _____	12
1.1. Aprendizado e Memória	12
1.2. Plasticidade Sináptica e Memória	15
1.3. Classificação das Memórias	16
1.4. Regiões Envolvidas na Formação da Memória	18
1.4.1. Hipocampo	19
1.4.2. Outras Regiões Corticais	20
1.4.3. Amígdala	20
1.5. Sistema GABAérgico	21
2. Objetivos _____	24
3. Material e Métodos _____	25
3.1. Animais	25
3.2. Cirurgia	26
3.3. Esquiva Inibitória	27
3.4. Infusão da Droga	28
3.5. Estatística	29

4.Resultados	30
4.1. Hipocampo	30
4.2. Córtex Entorrinal	31
4.3. Córtex Parietal Posterior	33
4.4. Amígdala	34
5.Discussão	35
5.1. Hipocampo	37
5.2. Córtex Entorrinal	39
5.3. Córtex Parietal Posterior	42
5.4. Amígdala	44
5.5. Conclusões gerais	45
6.Bibliografia	47

RESUMO

Tatiana Luft - "Efeitos da Bicuculina em Diferentes Estruturas Cerebrais no Processamento da Memória em Ratos".

Diversos estudos sugerem que os receptores inibitórios GABAérgicos do tipo A estão envolvidos no processamento da memória. Para examinar o papel dos receptores GABA_A na consolidação da memória, ratos foram implantados bilateralmente com cânulas na região CA1 do hipocampo, córtex entorrinal, córtex parietal posterior e núcleo basolateral da amígdala, e treinados na tarefa de esquivas inibitória. Em diferentes tempos depois do treino, o antagonista dos receptores GABA_A - bicuculina - foi infundido nas estruturas acima mencionadas. A bicuculina facilitou a memória quando infundida imediatamente após o treino (0h) no hipocampo, córtex entorrinal e córtex parietal posterior; 1,5h no hipocampo; 3h no córtex entorrinal e no córtex parietal. Nos tempos mais tardios da consolidação da memória (4,5h e 6h) não houve facilitação. A bicuculina não teve efeito na memória quando administrada na amígdala em nenhum dos tempos. Nossos dados sugerem que os receptores GABAérgicos inibem os primeiros momentos da consolidação da memória de longa duração no hipocampo, córtex entorrinal e córtex posterior, mas não nos tempos mais tardios.

ABSTRACT

Tatiana Luft - "Effects of Bicuculline in different brain structures of memory processes in rats".

Several lines of evidence suggest that gamma-aminobutyric acid (GABA) receptors are involved in memory processing. To examine the role of GABA_A receptors on memory consolidation, rats were bilaterally implanted with cannulae aimed at the CA1 region of the dorsal hippocampus, entorhinal cortex, posterior parietal cortex or the basolateral nucleus of the amygdala, and trained in a one-trial step-down inhibitory avoidance task. At different times after training, the GABA receptor antagonist bicuculline was infused into the above mentioned structures. Bicuculline produced increased retention when administered 0 min after training into hippocampus, entorhinal cortex and posterior parietal cortex, when given 1.5h after training into hippocampus and when given 3h after training into entorhinal cortex and posterior parietal cortex. Late phases injections (4.5h and 6h) of bicuculline had no effect. It is noticeable that bicuculline had no effect on memory when administered into amygdala at any time. Our data suggest that the GABA_A receptors inhibit early phases of long-term memory consolidation in hippocampus, entorhinal cortex and parietal cortex.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1.	Tipos de memórias e regiões cerebrais envolvidas na formação das mesmas.....	18
Figura 1.2.	Mapeamento das principais áreas cerebrais envolvidas no processamento das memórias declarativas.....	19
Figura 1.3.	Modelo estrutural do receptor GABA _A	22
Figura 1.4.	Estrutura da bicuculina.....	23
Figura 3.1.	Cirurgia dos ratos no aparelho estereotáxico.....	26
Figura 3.2.	Aparato de esquiva inibitória.....	28
Figura 4.1:	Latência da sessão de teste em grupos infundidos bilateralmente na região CA1 do hipocampo com salina ou bicuculina 0h, 1.5h, 3h, 4.5h ou 6h após a sessão de treino.....	31
Figura 4.2:	Latência da sessão de teste em grupos infundidos bilateralmente na região do córtex entorrinal com salina ou bicuculina 0h, 1.5h, 3h, 4.5h ou 6h após a sessão de treino.....	32
Figura 4.3:	Latência da sessão de teste em grupos infundidos bilateralmente na região do córtex parietal com salina ou bicuculina 0h, 1.5h, 3h, 4.5h ou 6h após a sessão de treino.....	33

Figura 4.4: Latência da sessão de teste em grupos infundidos bilateralmente na região da amígdala com salina ou bicuculina 0h, 1.5h, 3h, 4.5h ou 6h após a sessão de treino.....	34
Figura 5.1. Estrutura interna do hipocampo e suas principais conexões intrínsecas e extrínsecas.....	39
Figura 5.2: Componentes do sistema de memória do lobo medial temporal e suas interações com outras estruturas.....	40
Figura 5.3: Desenho esquemático das conexões entre as diferentes regiões envolvidas na memória.....	44

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aprendizado e memória

Memória compreende a aquisição, formação, conservação e a evocação de informações. Podemos afirmar que ‘somos aquilo que recordamos’, pois não podemos fazer aquilo que não sabemos como fazer, nem comunicar nada que desconhecamos, isto é, nada que não esteja na nossa memória. O acervo de nossas memórias faz com que cada um de nós seja o que é, cada um um indivíduo, um ser para o qual não existe outro idêntico (IZQUIERDO, 2002).

Do ponto de vista evolutivo, a capacidade de adquirir novas informações é uma das mais importantes funções do sistema nervoso central, e a expressão de memórias previamente adquiridas é crucial para a sobrevivência e evolução das espécies (MORGADO, 1999).

A aprendizagem e a memória são propriedades fundamentais do sistema nervoso central (SNC), sendo que ambas estão intimamente relacionadas. Os indivíduos apresentam capacidade de adaptação e modificação de seu

comportamento quando expostos a novas experiências, e a capacidade de aprender e recordar eventos depende de modificações induzidas no sistema nervoso pela percepção desses eventos (RAMON Y CAJAL, 1911).

Sendo um processo dinâmico, a memória pode ser dividida em quatro etapas: aquisição, consolidação, armazenamento e evocação:

(1) Aquisição da informação através da exposição a uma experiência, seja ela interna ou externa ao indivíduo. Tal processo se produz de forma mais ou menos automática e consta essencialmente da associação de estímulos e respostas entre si. Este processo associativo (ou não) inicial é intenso e se manifesta no fato de ser a memória de uma experiência recém-vivida, que geralmente é fiel e precisa ao estímulo que conduziu sua criação. Entretanto, com o passar do tempo, essa intensidade e clareza poderão sofrer um decréscimo (CAMMAROTA, 1998). Não recordamos tudo o que nos sucede e do que recordamos não possuímos todos os detalhes; só guardamos aquilo que, por determinadas circunstâncias, individuais e do contexto, parecem ser determinantes (necessárias e suficientes) para nos capacitarmos a recordar.

(2) Esse processo de filtração e fixação progressiva da informação adquirida recebe o nome de **consolidação**, fase em que a informação é adquirida e processada. Esta é a fase do processamento da memória que a mesma se mostra mais lábil e mais suscetível a modificações (MCGAUGH, 2000).

(3) Uma vez consolidadas, as memórias devem ser "guardadas" em algum lugar do cérebro, no qual sua preservação como tal permaneceria de maneira mais ou menos estável com o passar do tempo, ou seja, ocorre o

armazenamento da informação (IZQUIERDO, 1989; MCGAUGH, 1996, 2000). Onde se armazenam no cérebro as informações já consolidadas, se existe um só lugar de "depósito de memórias", se não existe um lugar fixo mas as memórias se mantêm devido a novas interações neuronais que determinam mudanças na dinâmica comunicacional entre distintas estruturas cerebrais, são questões que ainda não possuem respostas definitivas mas, independente do lugar em que se conservam as memórias, indiscutivelmente certo é que estas só nos servem se podemos resgatá-las (IZQUIERDO, 2002; SOUZA, 2001).

(4) A única maneira de estudar e avaliar o armazenamento da memória é através da **evocação** desta, quando observamos a mudança de comportamento do animal devido ao processo de memorização (QUILLFELDT, 1994). O processo de evocação conta com certa individualidade e pode ser estudado de maneira independente das etapas em que se subdivide o processo de formação da memória (BARROS et al, 2000; HASEGAWA, 2000; IZQUIERDO, 2000a, 2000b).

A consequência dos três primeiros processos envolvidos na memória seria uma aprendizagem que se manifesta por um novo comportamento ou a modificação de um pré-existente. Entretanto, a maioria dos estudiosos restringe o processo de aprendizagem somente à aquisição de novos conhecimentos, enquanto que a memória seria a retenção dos mesmos (IZQUIERDO et al, 1992; KANDEL, 2000; MORGADO, 1999). Por definição, não há aprendizagem sem memória e nem memória sem aprendizagem, pois ambos os processos encontram-se intimamente ligados e estão presentes em muitos processos cerebrais, como, por exemplo, o reconhecimento da percepção sensorial.

O aprendizado é quantificado experimentalmente como a probabilidade com que um organismo responderá, diferentemente, ao mesmo estímulo após sua repetição. Esta alteração está baseada na memória daquilo que foi aprendido pelo organismo após uma sessão de treino, que é sua exposição a uma novidade ou a um novo acontecimento (AGRANOFF, 1998). Devido à dificuldade (e muitas controvérsias) em se definir o que vem a ser literalmente aprendizagem, tem-se optado por um termo mais geral que é a plasticidade.

1.2. Plasticidade sináptica e memória

As alterações observadas no processo de aprendizagem e memória ocorrem devido a plasticidade neural, fenômeno característico do SNC (RAMÓN Y CAJAL, 1911). O conceito de plasticidade é extremamente amplo, incluindo todas as formas de reorganização duradoura que ocorrem em um cérebro maduro. Essas reorganizações podem ser observadas sob o aspecto fisiológico (propriedades funcionais adquiridas pelos neurônios), morfológico (morfologia e ultraestrutura neuronal e glial) ou bioquímico (atividades enzimáticas, transdução de sinal e mudanças na expressão gênica). Refere-se a alterações estruturais e funcionais nas sinapses como resultado de processos adaptativos do organismo. Estas adaptações promovem alterações na eficiência sináptica e podem aumentar ou diminuir a transmissão de impulsos com a conseqüente modulação do comportamento (AU LOIS et al, 1997; MCMAHON & BARRIONUEVO, 2002).

O cérebro tem a extraordinária capacidade de desenvolver respostas plásticas durante longos períodos, podendo durar por toda a vida, sendo que a

plasticidade funcional está acoplada a mudanças estruturais de longa duração (AU LOIS et al, 1997). Estudos demonstraram que o SNC pode exibir plasticidade sináptica sutil e específica em resposta a uma dada atividade, como por exemplo, o aprendizado de uma nova tarefa (COTMAN, 1998).

1.3. Classificação das Memórias

As memórias podem ser classificadas de acordo com sua função, com o tempo que duram e com o seu conteúdo. Quanto a sua função, há basicamente dois tipos: 1) Memória de trabalho: é breve e serve para manter durante alguns segundos, no máximo poucos minutos, a informação que está sendo processada no momento, e diferencia-se das demais porque não deixa traços e não produz arquivos. A memória de trabalho é processada fundamentalmente pelo córtex pré-frontal (ARTIGES et al, 2000; GOLDMAN-RAKIC, 1996); 2) Memórias de curta e de longa duração, que são memórias que são consolidadas e armazenadas, ou seja, produzem arquivos (BARROS et al, 2002; IZQUIERDO et al, 1998a; IZQUIERDO et al, 2002).

Quanto à sua duração, as memórias declarativas ou explícitas, relacionadas a fatos e eventos, podem ser de dois tipos: de curta e de longa duração. As memórias declarativas de longa duração levam um tempo maior para serem consolidadas. Nas primeiras horas após sua aquisição, são lábeis e suscetíveis à interferência de numerosos fatores, desde traumatismos cranianos ou eletrochoques convulsivos, até uma variedade enorme de drogas, ou mesmo à ocorrência de outras memórias (IZQUIERDO, 1989; MCGAUGH, 1996, 2000;).

Assim, as memórias de longa duração não ficam estabelecidas em sua forma estável ou permanente imediatamente após sua aquisição. O processo que leva à sua fixação definitiva, de maneira que posteriormente poderão ser evocadas, denomina-se consolidação (IZQUIERDO, 2002).

Experimentalmente, definiu-se que as memórias de curta duração duram apenas algumas horas, tempo suficiente para que as memórias de longa duração sejam consolidadas e adquiram sua forma estável definitiva. Após este período as memórias de longa duração permanecem armazenadas até que seja oportuno evocar seu conteúdo (IZQUIERDO et al, 1998a,b, 2000a,b). Convém salientar que a memória de curta duração requer as mesmas estruturas nervosas que a de longa duração, mas envolve mecanismos próprios e distintos, ou seja, envolve processos paralelos e independentes (BARROS et al, 2002; FERREIRA et al, 2002; IZQUIERDO et al., 1998a,c, 1999, 2002).

Quanto ao conteúdo da memória, esta pode ser dividida em dois tipos: memórias declarativas (explícitas) e procedurais (implícitas) (Figura 1.1). As memórias declarativas referem-se à retenção de experiências sobre fatos e eventos do passado. As memórias procedurais são memórias de capacidades ou habilidades motoras ou sensoriais (BEVILAQUA, 2000; IZQUIERDO, 2002).

Só é possível verificar o armazenamento de uma informação é através de sua evocação. Quando a evocação é testada até 3h após a exposição a um novo evento, estamos medindo a memória de curta duração; já quando o teste é feito 24h ou mais após o aprendizado, medimos a memória de longa duração (IZQUIERDO et al, 1998a,b, 2000a,b; VIANNA, 2000).

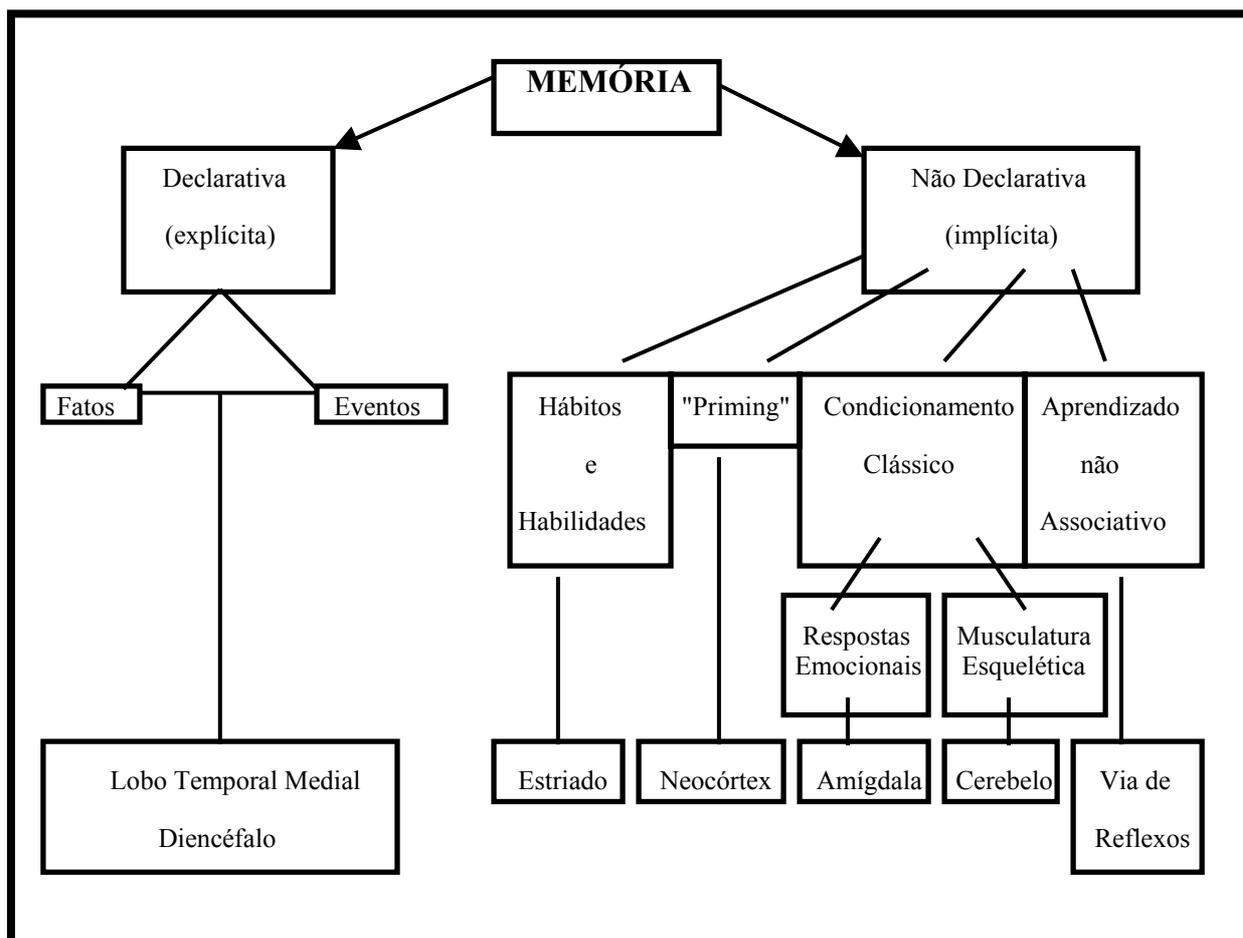


Figura 1.1. Tipos de memórias e regiões cerebrais envolvidas na formação das mesmas. (Adaptado de Zigmound et al, 1999).

1.4. Regiões envolvidas na formação da memória

Em mamíferos, a formação e o armazenamento de memórias declarativas depende de um sistema de estruturas relacionadas anatomicamente no interior do lobo temporal medial e suas interações com o neocórtex (BARROS et al, 2000; IZQUIERDO et al, 1997a,b; SQUIRE & ZOLA-MORGAN, 1991; SQUIRE & KNOWLTON, 1994) (Figura 1.2).

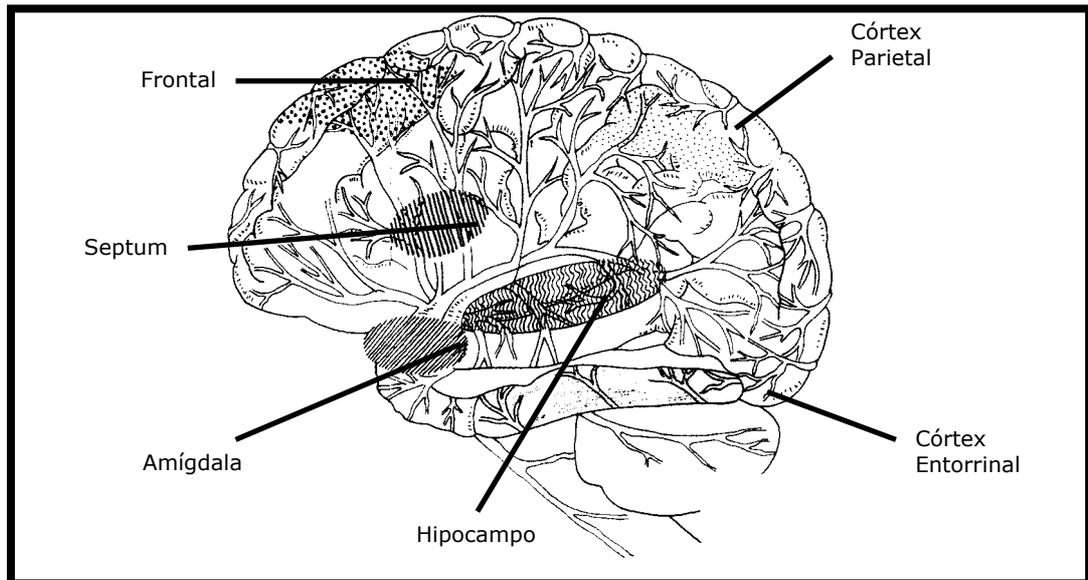


Figura 1.2. Mapeamento das principais áreas cerebrais envolvidas no processamento das memórias declarativas. (Adaptado de Izquierdo, 2002)

1.4.1. Hipocampo

Com respeito à formação da memória, o hipocampo compreende uma estrutura fundamental do lobo temporal medial, e sua integridade funcional parece ser um pré-requisito para a formação e evocação da informação (FORTIN et al, 2002; IZQUIERDO & MEDINA, 1997; RIEDEL & MICHEAU, 2001; ROUTTENBERG, 2001).

O hipocampo processa a informação recentemente adquirida por um período de semanas ou meses e, após, transfere-a a áreas específicas do córtex cerebral para um armazenamento mais prolongado (BADDELEY, 1997). Esta estrutura tem conexões com a amígdala e septo medial, córtex entorrinal, córtex pré-frontal e córtex parietal associativo (HYMAN et al, 1990). Todas essas áreas são essenciais para a formação das memórias declarativas.

1.4.2. Outras regiões corticais

A região CA1 do hipocampo emite fibras excitatórias a uma região vizinha chamada subículo que, por sua vez, emite fibras excitatórias que fazem sinapse com células do córtex entorrinal. Este possui importantes conexões aferentes e eferentes com o córtex pré-frontal (onde se processa a memória de trabalho), com os córtices associativos parietal, occipital e cingulado anterior e com o restante do córtex do lobo temporal. (HYMAN et al, 1990; IZQUIERDO, 2002; IZQUIERDO et al, 1998a).

A intervenção do hipocampo, amígdala e septum na formação de memórias ocorre nos primeiros minutos após sua aquisição. Passados trinta minutos, inicia-se a participação do córtex entorrinal e, passados mais trinta minutos, entra em ação o córtex parietal associativo. Na esquia inibitória, todas estas áreas participam coordenadamente e/ou seqüencialmente (BRIONI, 1993; IZQUIERDO et al, 1994, 1997b; ZANATTA, 1996).

1.4.3. Amígdala

Entre as principais regiões moduladoras da formação de memórias declarativas, está a área basolateral do núcleo amigdalino ou amígdala, localizada no lobo temporal. Os axônios dos neurônios desta região atingem o hipocampo, e os córtices entorrinal, cingulado e parietal e liberam diversos neurotransmissores, tanto excitatórios quanto inibitórios (CAHILL & MCGAUGH, 1998; IZQUIERDO, 2002; MCGAUGH, 2000).

1.5. Sistema GABAérgico

O GABA (sigla de *gamma amino butyric acid*, nome em inglês do ácido gama-amino butírico), é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central de vertebrados e media a inibição neuronal quando liga-se a diferentes receptores denominados GABA_A e GABA_B (BEAR, 1996; ZARRINDAST et al, 2002). Destes, os melhor estudados e fisiologicamente mais importante são os GABA_A, mediadores de 90% da transmissão sináptica inibitória no sistema nervoso central dos mamíferos (BEAR, 1996).

Os primeiros eventos envolvidos na formação de memórias declarativas são altamente sensíveis à atividade de receptores inibitórios GABA_A (BRIONI, 1993; DELOREY & OLSEN, 1994; SCHOFIELD, 1987; IZQUIERDO et al., 1992a). A ativação de receptores para o GABA (ácido gama aminobutírico) tem um efeito negativo na memória por reduzir a excitabilidade neuronal e a atividade das projeções colinérgicas. De fato, pode se considerar que o sistema GABA_A constitui o principal “freio” para a formação de memórias nos momentos iniciais desta, pelo menos no hipocampo, amígdala e septum medial. Receptores GABA_A no hipocampo, amígdala, septum e córtex entorrinal são provavelmente responsáveis pelas influências inibitórias na formação da memória, tanto de curta como de longa duração (IZQUIERDO et al, 1992).

A estrutura do receptor GABA_A é particularmente interessante porque contém uma variedade de sítios de ligação para drogas farmacologicamente significantes que interagem alostericamente com agonistas GABA. Estes incluem ansiolíticos (benzodiazepínicos), anti-convulsantes (barbitúricos), anxiogênicos (β -

carbolinas) e agentes convulsantes (picrotoxina) (Figura 1.3) (SCHOFIELD, 1987).

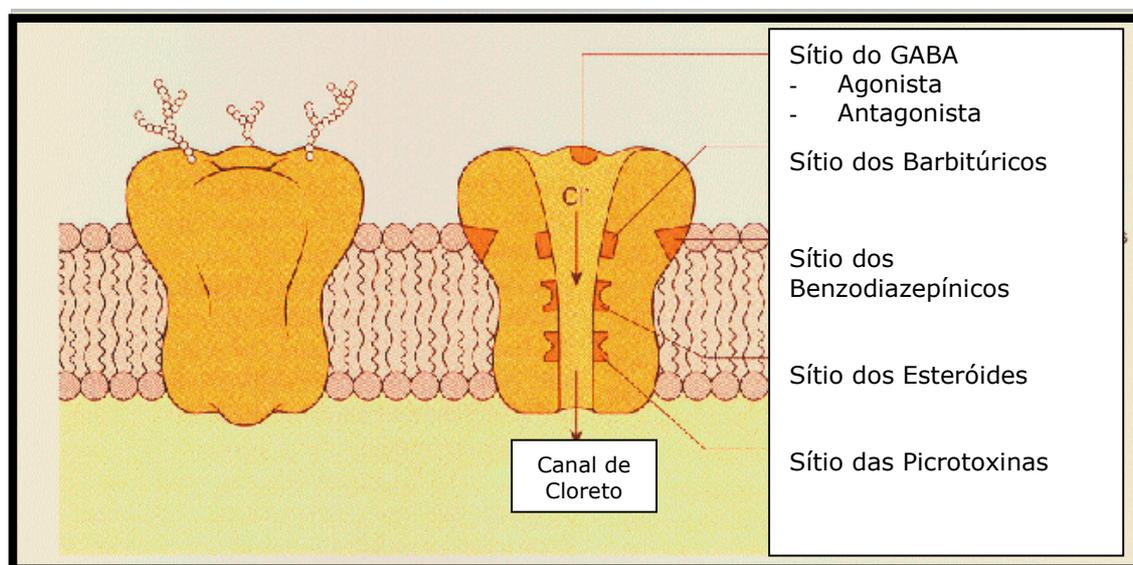


Figura 1.3. Modelo estrutural do receptor GABA_A.
(Adaptado de Siegel, G. J: "Basic Neurochemistry")

Existem pelo menos duas classes de receptores gabaérgicos: GABA_A e GABA_B. Os receptores GABA_A pertencem a uma superfamília de canais iônicos ativados por transmissor. A ativação do receptor GABA_A resulta em aumento no tempo médio de abertura do canal para cloro. A entrada desse ânion através do canal leva à hiperpolarização do neurônio pós-sináptico. O agonista clássico do sítio GABA_A é o muscimol, enquanto que seu principal antagonista é a bicuculina (DELOREY & OLSEN, 1994).

A bicuculina é um potente antagonista dos receptores GABA_A em vertebrados. Atua competindo com o GABA, reconhecendo o mesmo sítio do receptor (CHAVEZ et al, 1995) (Figura 1.3). É uma droga convulsivante que

reduz, por diminuição da freqüência de abertura e tempo, a abertura do canal para a entrada de cloro (Cl^-) (Figura 1.4) (DELOREY & OLSEN, 1994).

Dependendo da concentração, a bicuculina pode causar convulsões em ratos experimentais. Estudos demonstraram que, na concentração utilizada em nossos experimentos, (0.1 nM), a droga produz efeito antagonista aos receptores GABA_A , mas não produz convulsão nos animais experimentais (SALINAS & MCGAUGH, 1996).

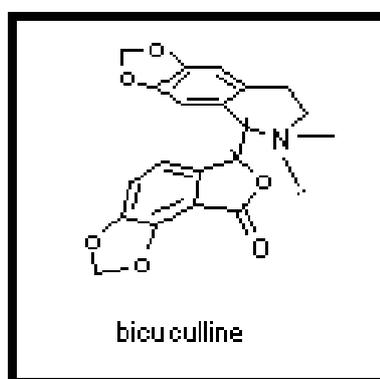


Fig. 1.4: Estrutura da bicuculina.

Os receptores GABA_B foram identificados devido a sua insensibilidade aos agonistas e antagonistas GABA. O análogo do GABA, baclofen, é um potente e seletivo agonista GABA_B . Evidências sugerem que os receptores GABA_B são ligados a canais de potássio, podendo diminuir a condutância dos íons cálcio e inibir a produção de AMPc via proteínas G. Muito recentemente foi descrita uma provável terceira subclasse de receptores GABA – GABA_C – que são insensíveis tanto a bicuculina quanto ao baclofen.

2. OBJETIVOS

Considerando que o hipocampo, córtex entorrinal, córtex parietal e amígdala são estruturas envolvidas na consolidação e modulação da memória, e que o sistema GABAérgico participa do processamento da memória nestas estruturas, este trabalho tem como objetivos:

2.1. Verificar o que ocorre se bloquearmos a participação dos receptores GABAérgicos do tipo A no **hipocampo** durante a consolidação da memória da tarefa de esquiva inibitória;

2.2. Verificar o que ocorre se bloquearmos a participação dos receptores GABAérgicos do tipo A no **córtex entorrinal** durante a consolidação da memória da tarefa de esquiva inibitória;

2.3. Verificar o que ocorre se bloquearmos a participação dos receptores GABAérgicos do tipo A no **córtex parietal** durante a consolidação da memória da tarefa de esquiva inibitória;

2.4. Verificar o que ocorre se bloquearmos a participação dos receptores GABAérgicos do tipo A na **amígdala** durante a consolidação da memória da tarefa de esquiva inibitória.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Os animais utilizados para o experimento são ratos Wistar machos de 2.5 a 3.5 meses de idade, pesando entre 220 e 260 gramas. Os mesmos foram mantidos em caixas moradia e grupos de animais por caixa, alimentados com ração e água *ad libitum*, e mantidos em ambiente climatizado em temperatura de 23°C com 12 horas de intervalo de luminosidade claro/escuro.

Os animais são provenientes do Instituto de Pesquisas Biológicas de Porto Alegre e mantidos durante três semanas no Biotério do Departamento de Bioquímica da UFRGS para ambientação antes do início dos experimentos.

3.2. Cirurgia

Os animais foram anestesiados intraperitonealmente, com tionembutal (30 mg/kg) e fixados num aparelho estereotáxico (Figura 3.1). As cânulas-guia, medindo 0,9 cm e com calibre 30g, foram inseridas bilateralmente e fixadas com acrílico dental 1mm acima da estrutura estudada, conforme as coordenadas do Atlas de Paxinos e Watson (1986), nas seguintes estruturas: **hipocampo** (AP-4,2mm; ML 3,0mm; DV 1,3mm), **córtex parietal** (AP-2,8mm; ML 3,0mm; DV 1,3mm), **córtex entorrinal** (AP-6,7mm; ML 5,0mm; DV 4,8mm) e **amígdala** (AP -2,3mm; ML 4,5mm; DV 4mm).

Três a cinco dias após a cirurgia, os animais foram treinados na tarefa experimental de esquiva inibitória de uma via (BARROS et al, 2000; IZQUIERDO et al, 1998a,b), e testados 24h depois.

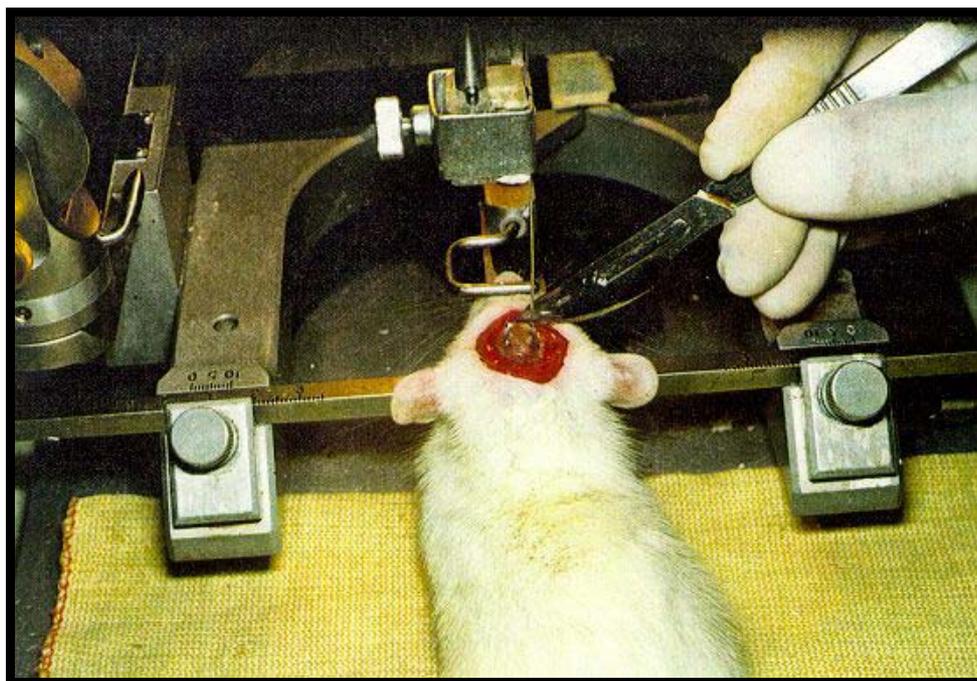


Figura 3.1. Cirurgia dos ratos no aparelho estereotáxico.

3.3. Esquiva Inibitória

A tarefa de esquiva inibitória consiste em um aprendizado associativo aversivo (BARROS et al, 2000; IZQUIERDO et al, 1997a, 1998b; IZQUIERDO & MEDINA, 1997a). Nesta tarefa, o animal é submetido a uma sessão de aprendizado chamada treino, na qual aprende a associar o comportamento de descer de uma plataforma ao recebimento de um choque. Como os animais são capazes de aprender tal informação rapidamente, o aprendizado é medido pela permanência do animal sobre a plataforma durante a sessão de teste.

A esquiva inibitória consiste em uma caixa de material plástico de 50 x 25 x 25cm, cujo assoalho é uma grelha de barras de bronze paralelas, calibre 1mm, separadas entre si por 1cm. Os animais são colocados sobre uma plataforma de 2,5 cm de altura, 10 cm de largura e 15 cm de extensão, que ocupa o extremo esquerdo do assoalho (Figura 3.2). O tempo que os animais levam para descer da plataforma à grelha (latência) é medido quando os mesmos colocam suas quatro patas na grelha, o que leva, em média, de 5 a 10 segundos. Uma vez na grelha, os ratos recebem um choque elétrico "*scrambled*" de 0.5 mA durante 2 segundos. Imediatamente após são retirados do aparato.

Na sessão de teste, que é realizado 24h após o treino, para medir a memória de longa duração, o animal é colocado novamente no aparato de esquiva inibitória; porém, ao descer da plataforma, não recebe choque. Para avaliar o quanto o animal aprendeu, mede-se o tempo de latência em que este permanece na plataforma e, conseqüentemente, a retenção da tarefa. (BARROS et al, 2000; IZQUIERDO et al, 1997a, IZQUIERDO & MEDINA, 1997a).

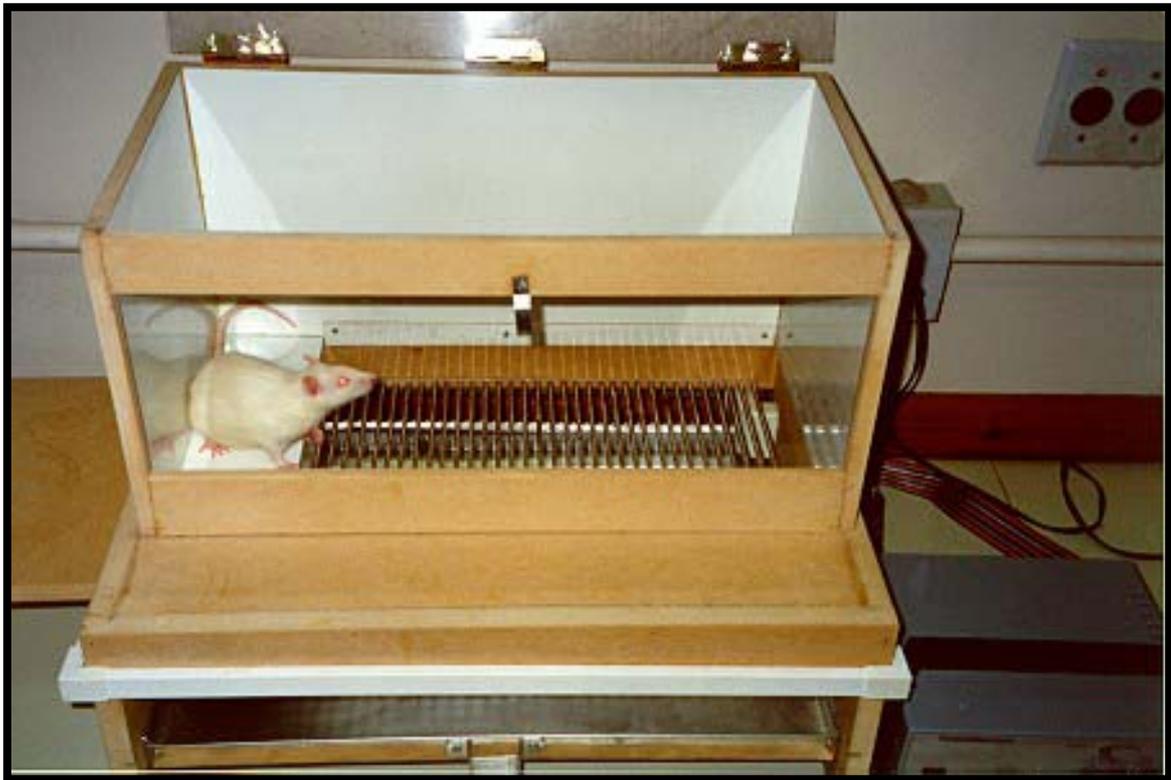


Figura 3.2. Aparato de esquiva inibitória.

3.4. Infusão da droga

A 0h, 1.5h, 3h, 4.5h e 6h após a sessão de treino, os animais foram injetados, através de cânula guia, com uma infusão bilateral de 0,5 μ l/cânula de salina (NaCl 0,9%) ou bicuculina (na concentração de 0.1nM) nas diferentes estruturas: hipocampo, córtex entorrinal, córtex parietal e amígdala.

Duas à 24h após o procedimento comportamental, os animais receberam uma infusão de 0,5 μ l de azul de metileno 4%. Os ratos foram mortos por decapitação 1h depois, seus cérebros retirados e colocados em formalina para a localização histológica dos sítios de infusão. Somente os animais com a localização correta da cânula foram incluídos na análise final estatística.

3.5. Estatística:

Os dados referidos são expressos como medianas (intervalo interquartis) da retenção do teste. Sessões de treino dos grupos das mesmas estruturas e nos mesmos tempos foram comparadas por análise de variância Kruskal-Wallis. Diferenças entre o grupo controle e o grupo infundido com a droga, no mesmo tempo e na mesma estrutura, foram comparados por análise estatística não paramétrica Mann Whitney U test.

4. RESULTADOS

Os resultados estão apresentados através de figuras. Estas mostram a estrutura estudada, a latência do teste dos animais controle (colunas azuis) e dos animais injetados com a droga, bicuculina (colunas amarelas), nos diferentes tempos nos quais a mesma foi administrada após o treino: 0h (imediatamente após), 1,5h (90 minutos), 3h (180 minutos), 4,5h (270 minutos) e 6h (360 minutos).

A análise de variância (Kruskal-Wallis) mostrou que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos injetados em diferentes tempos, durante a sessão de treino. Em contraste, todos os grupos apresentaram uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre a sessão de treino e de teste, realizada 24 horas após, para o estudo do efeito do antagonista GABA_A na memória de longa duração.

4.1. Hipocampo

Como pode se observar na Figura 4.1, o hipocampo apresentou uma melhora na retenção da memória quando a bicuculina foi administrada

imediatamente após o treino (n=10, p<0,01) e também quando administrada 1,5h (90 minutos) após o treino (n=10, p<0,01). Os animais injetados nas fases mais tardias da consolidação da memória de longa duração (3h; 4,5h e 6h) não tiveram diferença significativa (p<0,05) em relação ao grupo controle.

Este resultado mostra que o sistema GABAérgico está envolvido, no hipocampo, nas fases iniciais da consolidação da memória, e não tem função nas fases mais tardias, quando outras estruturas são requisitadas.

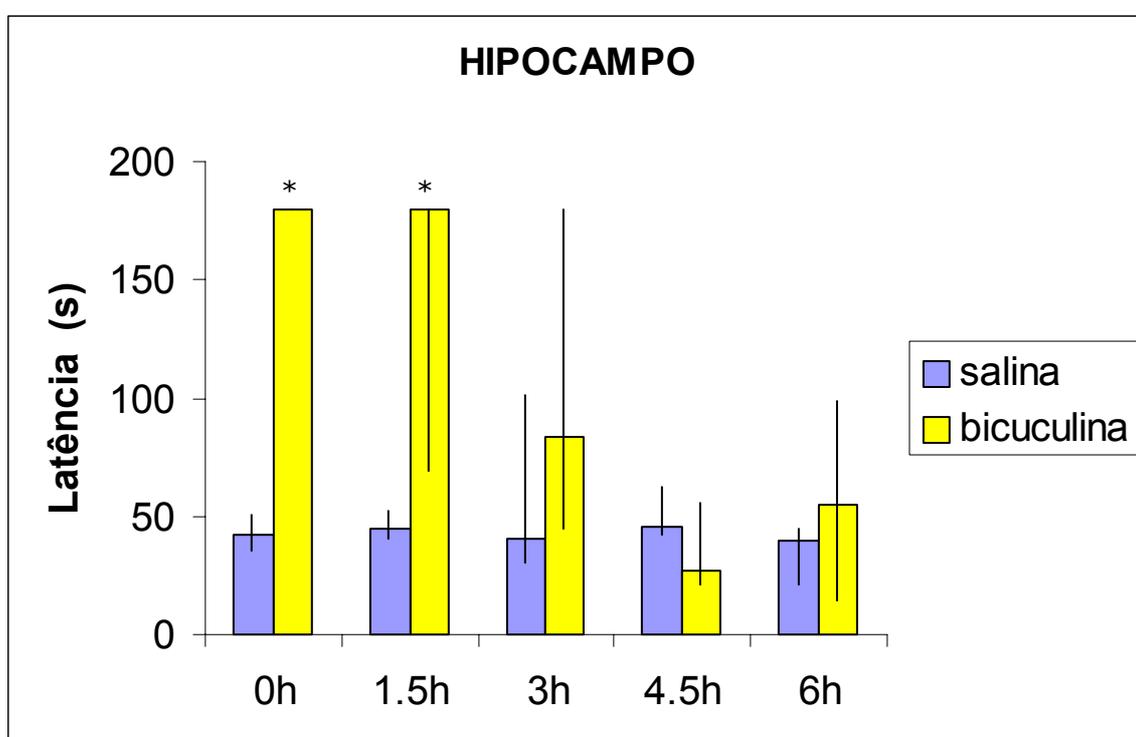


Figura 4.1: Latência da sessão de teste em grupos infundidos bilateralmente na região CA1 do hipocampo com salina 0,9% de NaCl (0.5µl) (colunas azuis) ou bicuculina 0.1nM (0.5µl) (colunas amarelas), 0h, 1.5h, 3h, 4.5h ou 6h após a sessão de treino. O asterisco indica diferença estatística significativa em Mann-Whitney *U* test. O número de animais utilizados (N) por grupo foi: n=10 (0h), n=10 (1.5h), n=11 (3h), n=14 (4.5h) e n=10 (6h).

4.2. Córtex Entorrinal

Na Figura 4.2 são apresentadas as latências encontradas no córtex entorrinal, nos diferentes tempos da consolidação da memória. Como pode ser

visto, houve uma melhora na retenção da memória de longa duração quando a bicuculina foi administrada imediatamente após o treino e também quando administrada 3h após o treino ($p < 0,01$). Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) quando a droga foi injetada na fase intermediária (1,5h) ou nas fases mais tardias (4,5h ou 6h).

Este resultado demonstra que, antagonizando os receptores GABAérgicos nos primeiros momentos da consolidação da memória há um aumento na retenção desta. O mesmo ocorre a 3h (180 minutos), o que sugere o envolvimento dos receptores inibitórios GABAérgicos do tipo A do córtex entorrinal nos momentos mais tardios da consolidação da memória.

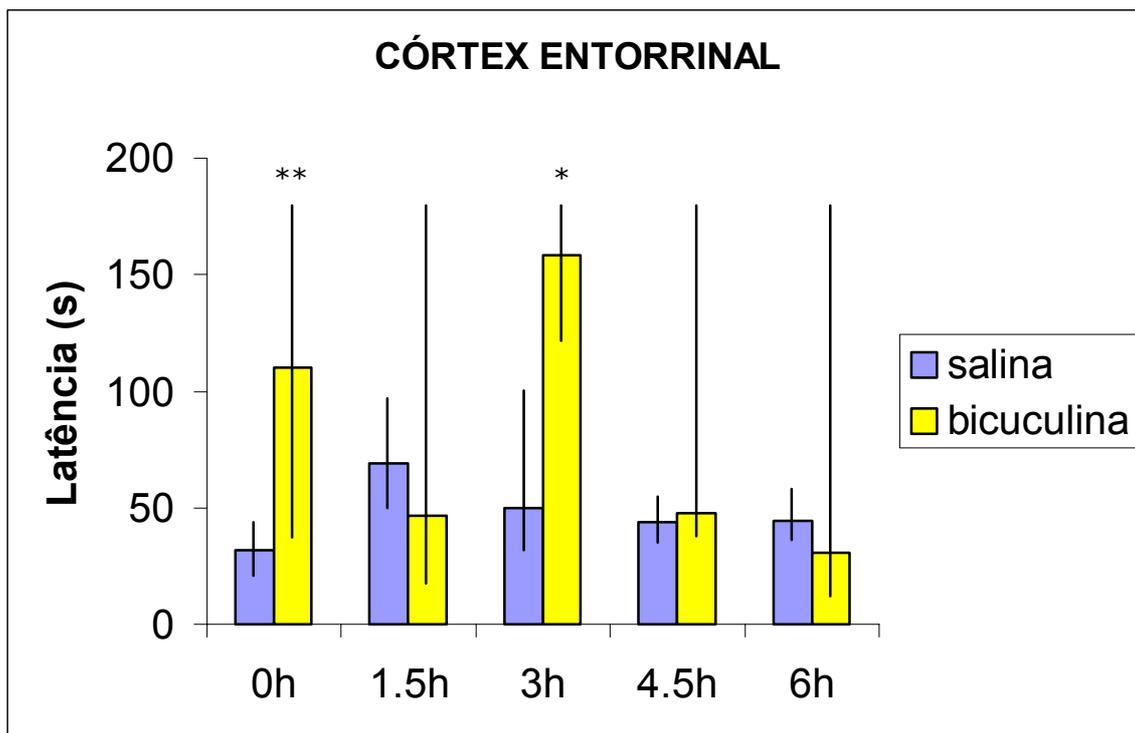


Figura 4.2: Latência da sessão de teste em grupos infundidos bilateralmente na região do córtex entorrinal com salina (0.5 μ l) (colunas azuis) ou bicuculina (0.5 μ l) (colunas amarelas), 0h, 1.5h, 3h, 4.5h ou 6h após a sessão de treino. Um asterisco (*) e dois asteriscos (**) indicam diferença estatística significativa em Mann-Whitney U test, $p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente. O número de animais utilizados (N) por grupo foi: n=10 (0h), n=13 (1.5h), n=10 (3h), n=11 (4.5h) e n=10 (6h).

4.3. Córtex Parietal

Na Figura 4.3, a estrutura estudada é o córtex parietal. Observa-se que neste houve uma melhora na retenção da memória quando a bicuculina foi administrada imediatamente após o treino e também quando administrada 3h após o treino ($p < 0,01$), assim como no córtex entorrinal. Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) quando administrada na fase intermediária (1,5h) ou nas fases mais tardias (4,5h ou 6h).

Este resultado sugere uma estreita relação entre o córtex entorrinal e parietal, e destes com o hipocampo nos momentos iniciais da consolidação da memória, quanto aos receptores GABAérgicos do tipo A, ou melhor, quando sua atividade inibitória é bloqueada.

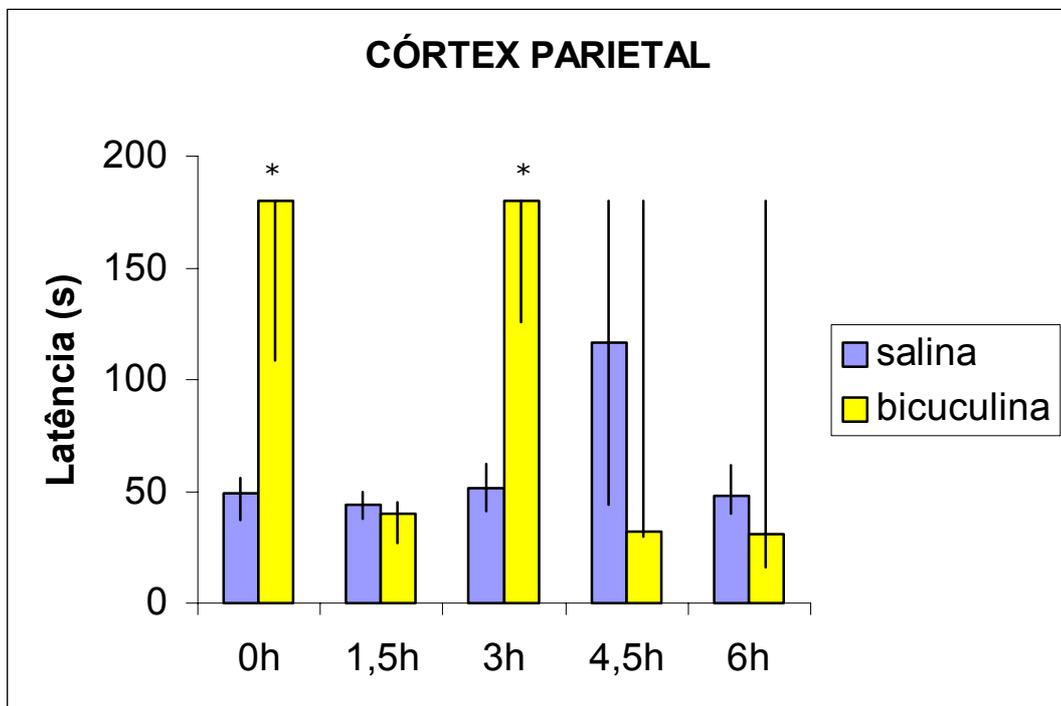


Figura 4.3: Latência da sessão de teste em grupos infundidos bilateralmente na região do córtex parietal com salina (0.5 μ l) (colunas azuis) ou bicuculina (0.5 μ l) (colunas amarelas), 0h, 1.5h, 3h, 4.5h ou 6h após a sessão de treino. O asterisco indica diferença estatística significativa em Mann-Whitney U test. O número de animais utilizados (N) por grupo foi: n=10 (0h), n=13 (1.5h), n=10 (3h), n=10 (4.5h) e n=10 (6h).

4.4. Amígdala

A amígdala, como apresentado na Figura 4.4, não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo injetado com o antagonista dos receptores GABAérgicos do tipo A e o grupo controle em nenhum dos tempos estudados.

Este resultado sugere que esta estrutura não tem alteração em sua função moduladora quando os receptores inibitórios GABA_A são bloqueados.

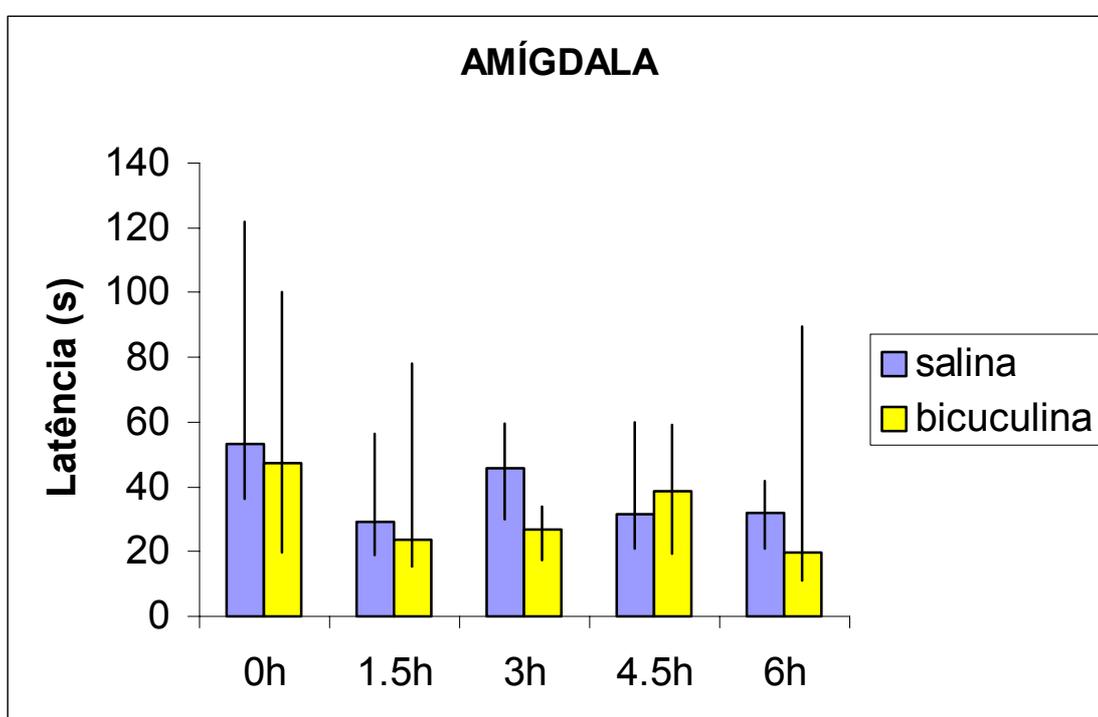


Figura 4.4: Latência da sessão de teste em grupos infundidos bilateralmente na amígdala com salina (0.5 μ l) (colunas azuis) ou bicuculina (0.5 μ l) (colunas amarelas), 0h, 1.5h, 3h, 4.5h ou 6h após a sessão de treino. O número de animais utilizados (N) por grupo foi 10.

5. DISCUSSÃO

Muitos estudos têm sido feitos para compreender melhor a participação das diferentes estruturas cerebrais e dos diferentes receptores no processo de formação da memória.

Experimentos demonstraram que a memória certamente não é formada ou consolidada somente em um local do cérebro (BARROS et al, 2000; IZQUIERDO et al, 1992a,b; 1997a,b; SQUIRE & ZOLA-MORGAN, 1991; SQUIRE & KNOWLTON, 1994). A cascata bioquímica da memória vem sendo bem estudada no hipocampo, principalmente na tarefa de esquiva inibitória (MEDINA & IZQUIERDO, 1995), e muitos estudos sugerem que outras estruturas como a amígdala, córtex entorrinal e córtex parietal estejam envolvidas na formação da memória declarativa (IZQUIERDO, 1994; IZQUIERDO et al, 1992a; IZQUIERDO & MEDINA, 1995, 1997).

A tarefa utilizada no experimento, comentada no capítulo 2, é a esquiva inibitória. Esta envolve a formação de uma memória declarativa na qual o animal aprende, após uma sessão de teste aversiva, a inibir uma resposta (descer da plataforma) para não receber um estímulo de aversão (choque elétrico)

(IZQUIERDO, 2002). A microinjeção, nas diferentes estruturas cerebrais, dada em diferentes tempos após o treino, com agonistas ou antagonistas, serviu e serve para que esquematizemos a seqüência das estruturas envolvidas na consolidação da memória e quais os receptores envolvidos nos diferentes tempos (BARROS et al, 2000; IZQUIERDO et al, 1997a, 1998b; IZQUIERDO & MEDINA, 1997a).

O resultado das experiências bioquímicas e farmacológicas/ moleculares sobre a formação das memórias leva-nos a determinar a seqüência de passos moleculares subjacentes à consolidação das memórias de longa duração (IZQUIERDO, 2002).

Enfatizando o assunto do presente trabalho, muitos experimentos foram feitos para elucidar um pouco mais o envolvimento dos receptores GABAérgicos do tipo A na consolidação da memória, principalmente com o agonista destes, o muscimol. Teoricamente, um antagonista que se liga no mesmo sítio do agonista deve ter uma função contrária mas, como veremos, na prática nem sempre é isso que ocorre. O agonista vai maximizar o efeito do receptor, enquanto que o antagonista vai bloquear a ação deste. No caso dos receptores GABAérgicos do tipo A, que servem como um "freio" no processo de formação da memória, o que pode ocorrer se bloquearmos os mesmos? Quais são as conseqüências da inativação destes receptores?

Com nosso trabalho, queremos elucidar um pouco mais a função e o envolvimento dos receptores GABAérgicos do tipo A, em diferentes estruturas cerebrais, durante a consolidação da memória.

Para facilitar a discussão dos resultados, este capítulo foi dividido em cinco subcapítulos, sendo que nos quatro primeiros serão discutidas, separadamente,

as diferentes estruturas cerebrais estudadas e no quinto será feita uma discussão geral.

5.1. Hipocampo

Em relação ao hipocampo, sabe-se que é uma estrutura envolvida nos primeiros momentos da consolidação da memória (IZQUIERDO et al, 1992a, 1997a,b; IZQUIERDO & MEDINA, 1997; ZANATTA et al, 1997; ZARRINDAST et al, 2002).

O hipocampo tem suas células excitadas por meio de estimulação de receptores glutamatérgicos AMPA, NMDA (IZQUIERDO & MEDINA, 1993; PLATENIK et al, 2000) e metabotrópicos (CHEN et al, 2001; IZQUIERDO, 2002; VIANNA et al, 2000). Estes são bloqueados por receptores GABAérgicos do tipo A, os quais inibem o início da formação da memória de longa duração (BRIONI, 1993) e são modulados por sinapses colinérgicas muscarínicas e β -noradrenérgicas (IZQUIERDO et al, 1992a; IZQUIERDO & MEDINA, 1992b).

Como nosso propósito é verificar a participação dos receptores GABAérgicos do tipo A, utilizando um antagonista - bicuculina - queremos, primeiramente, sugerir qual a interferência destes sobre o hipocampo.

Estudos realizados com o agonista dos receptores GABA_A, muscimol, demonstraram que este causa amnésia retrógrada quando infundido imediatamente após o treino no hipocampo na tarefa de esquiva inibitória (IZQUIERDO et al, 1992a; IZQUIERDO et al, 1997b; IZQUIERDO et al, 1998b; VIANNA et al, 2000; ZANATTA et al, 1997).

Izquierdo et al (1998b) encontraram que, quando injeta-se muscimol 6 minutos antes do treino para medir a memória de trabalho (WM), ou quando

injeta-se o agonista dos receptores GABA_A no hipocampo imediatamente após o treino e mede-se a STM (3 horas após) e a LTM (24 horas após), em ambos causa amnésia retrógrada, tanto na WM (memória de trabalho) quanto na Memória de Curta Duração (STM) e Memória de Longa Duração (LTM).

Já quando é infundido um bloqueador indireto dos receptores GABA_A, picrotoxina, na mesma estrutura, este causa uma facilitação retrógrada na memória na tarefa de esquiva inibitória (IZQUIERDO et al, 1992a).

Em nossa abordagem experimental observamos que, quando injetamos bicuculina, o antagonista clássico dos receptores GABA_A nas primeiras horas da consolidação da memória declarativa na tarefa de esquiva inibitória, imediatamente após o treino ou 90 minutos após, verificamos uma facilitação na memória, reconfirmando o envolvimento dos receptores inibitórios GABA_A nos primeiros momentos da consolidação da memória no hipocampo.

Imediatamente após o treino (0h), constatamos que a função do agonista e do antagonista são contrárias: quando a célula for hiperpolarizada com a entrada de Cloro (Cl⁻), haverá um bloqueio no processo de formação da memória nos primeiros momentos da consolidação. Já quando o canal de cloro é bloqueado pela ação do antagonista, há uma melhor funcionalidade dos receptores excitatórios, o que ocasiona uma melhora na memória.

Aos 90 minutos (1.5h), quando bloqueados os receptores GABAérgicos tipo A pela administração de bicuculina, percebemos que há uma melhora significativa na memória, sugerindo que estes receptores ainda estão presentes 90 minutos após a aquisição da memória, ou seja, ainda têm um papel inibitório nesta fase.

Nas fases mais tardias da consolidação, tanto a 180 minutos (3h), 270 minutos (4.5h) e 360 minutos (6h), percebe-se que o grupo injetado com salina

nestes tempos não apresentam uma diferença significativa em relação ao grupo injetado com bicuculina, o que sugere que os receptores GABAérgicos não estão mais envolvidos nestas fases mais tardias da consolidação da memória no hipocampo.

5.2. Córtex Entorrinal

O córtex entorrinal é uma estrutura que possui estreita ligação com o hipocampo (Figura 5.1 e 5.2). Estudos sugerem que é uma estrutura envolvida na consolidação da memória de longa duração não nos primeiros momentos, mas sim nas fases mais tardias de sua formação (IZQUIERDO & MEDINA, 1993; JERUSALINSKY et al, 1994; ZANATTA, 1996).

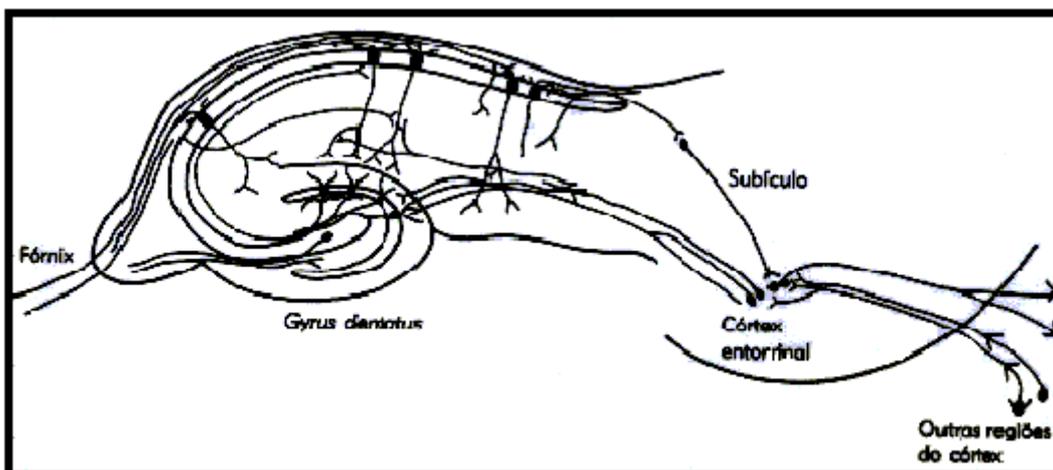


Figura 5.1: Estrutura interna do hipocampo e suas principais conexões intrínsecas e extrínsecas. O principal contingente de axônios aferentes ao hipocampo provém do córtex entorrinal, que mantém suas conexões com outras estruturas corticais.

(Adaptado de IZQUIERDO, 2002)

Ferreira et al (1992) encontraram que tanto muscimol (agonista dos receptores GABAérgicos do tipo A) quanto AP5 (antagonista dos receptores

NMDA) causam amnésia retrógrada quando administrados 3h (180 minutos) após o treino. Em nossos experimentos, encontramos uma grande facilitação da memória 3h (180 minutos) após o treino, o que sugere que o sistema GABAérgico possui função inibitória nesta fase da consolidação da memória de longa duração.

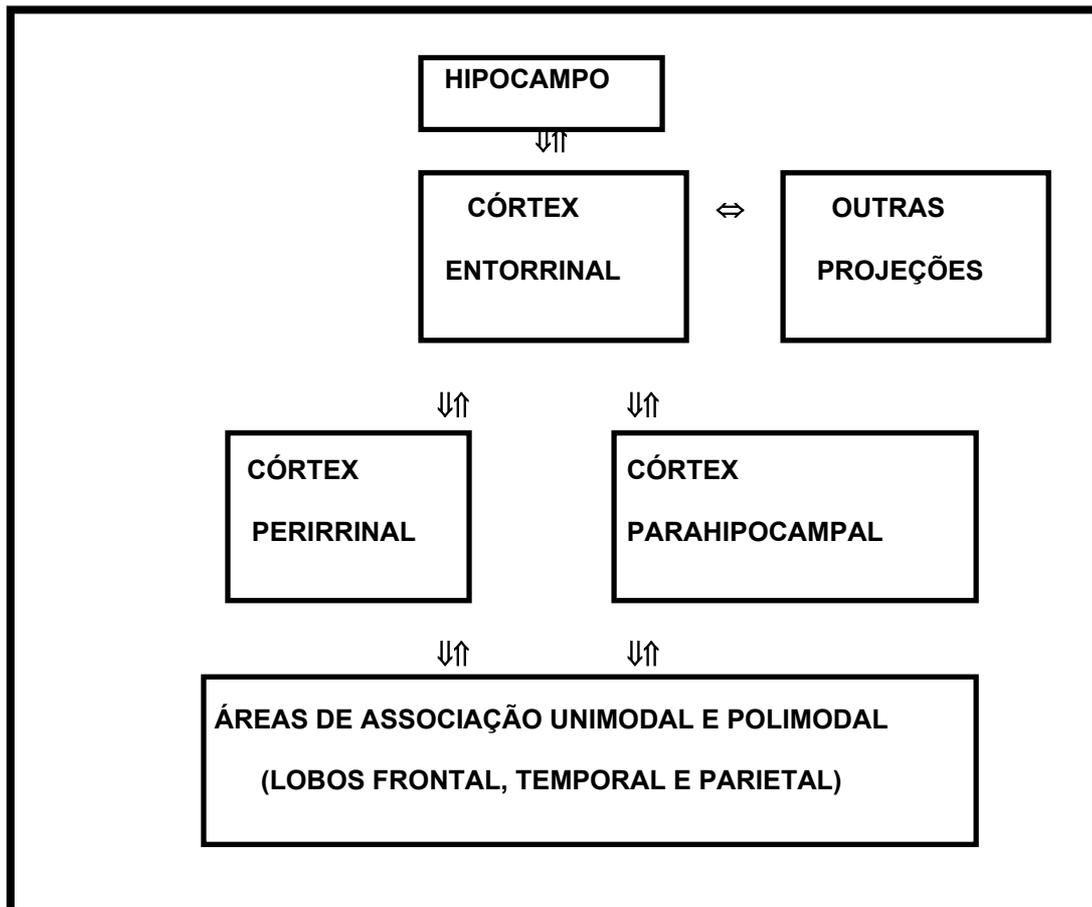


Figura 5.2: Os componentes do sistema de memória do lobo medial temporal são mostrados nas caixas. O córtex entorrinal é a maior fonte de projeções para a região hipocampal (hipocampo, giro denteado e complexo subicular). Quase 2/3 de fibras corticais recebidas no córtex entorrinal se originam nos córtices perirrinal e parahipocampal, que de volta recebem fibras das áreas de associação unimodal e polimodal (lobo frontal, temporal e parietal). O córtex entorrinal também recebe outras projeções diretas do córtex frontal orbital, córtex cingulado, córtex insular e giro temporal superior. Todas estas projeções são recíprocas. (Adaptado de L. R. Squire e S. Zola-Morgan, 1991 Science 253, 1380-86. In: Memory and Brain Systems, p. 61).

Como foi ilustrado no capítulo 4, a Figura 4.2 mostra que, além de haver uma facilitação na memória quando infundido o antagonista GABA_A no córtex entorrinal 180 minutos (3h) após o treino, houve também uma facilitação quando o mesmo foi infundido imediatamente após o treino. Esta facilitação pode se dar em consequência da grande afinidade que este tem com o hipocampo, e também porque a inibição dos receptores inibitórios GABA_A pode ocasionar uma maior funcionalidade nos outros receptores excitatórios, nas primeiras fases da consolidação da memória no córtex entorrinal.

Estudos com o agonista dos receptores GABA_A, muscimol, no córtex entorrinal imediatamente após o treino (0h), não apresentaram efeito amnésico na memória de longa duração (FERREIRA et al, 1992a; ZANATTA et al, 1997); todavia, em nosso trabalho, injetando o antagonista dos receptores GABA_A imediatamente após o treino, encontramos uma clara facilitação da memória de longa duração, o que mostra que, se bloquearmos estes receptores nesta fase, há uma melhora no processo de formação da memória de longa duração.

Izquierdo et al (1998b) encontraram que a memória de trabalho (WM) e a Memória de Curta Duração (STM) foram inibidas por muscimol no córtex entorrinal, sendo que este foi administrado 6 minutos antes do treino (WM) ou imediatamente após o treino (STM).

Na fase intermediária estudada, 90 minutos (1,5h) após o treino, percebe-se que o grupo injetado com salina não apresenta diferença significativa em relação ao grupo injetado com o antagonista bicuculina. Diversos estudos com o agonista dos receptores GABAérgicos do tipo A (IZQUIERDO et al, 1992, 1997a,b; ZANATTA et al, 1997) mostram que este produz amnésia retrógrada

quando injetado nesta fase da memória. Nesta fase, o agonista e o antagonista não apresentam um efeito antagônico.

Nas fases mais tardias da consolidação, como 270 minutos (4.5h) e 360 minutos (6h), encontramos que o grupo injetado com salina nestes tempos não apresentou uma diferença significativa em relação ao grupo injetado com bicuculina, o que sugere que os receptores GABAérgicos, bloqueados nestas fases, não estão mais envolvidos nestas fases mais tardias da consolidação da memória no córtex entorrinal.

5.3. Córtex Parietal

Estudos anteriores sugerem que o córtex parietal posterior participa ativamente nos momentos mais tardios da consolidação da memória (IZQUIERDO et al, 1992b, 1997a,b; ZANATTA et al, 1996,1997).

Experimentos com muscimol realizados por Zanatta et al (1996, 1997) sugerem que esta estrutura está envolvida na consolidação da memória somente após 60 minutos (1h). Izquierdo et al (1997b) encontraram que, se o agonista dos receptores GABAérgicos do tipo A (muscimol) ou o antagonista dos receptores NMDA (AP5) forem injetados 180 minutos (3h) após o treino, ambas as drogas causam amnésia retrógrada na memória de longa duração.

Em nossos experimentos encontramos uma facilitação da memória quando injetamos bicuculina 180 minutos (3h) após o treino, o que sugere que o sistema GABAérgico possui função inibitória nesta fase da consolidação da memória de longa duração.

Além disso, encontramos uma grande facilitação da memória de longa duração quando injetamos o antagonista dos receptores GABAérgicos tipo A

imediatamente após o treino (0h), o que não é demonstrado quando injeta-se muscimol (ZANATTA et al, 1997). Neste caso, quando bloqueamos o canal de cloro, percebemos que há uma melhora no processo de formação da memória de longa duração, e podemos sugerir que os receptores GABAérgicos possuem funcionalidade nesta fase.

Na fase intermediária estudada, 90 minutos (1,5h) após o treino, percebe-se que o grupo injetado com salina não apresenta diferença significativa em relação ao grupo injetado com o antagonista bicuculina. Diversos estudos com o agonista dos receptores GABAérgicos do tipo A (IZQUIERDO et al, 1992, 1997a,b; ZANATTA et al, 1996,1997) mostram que este produz amnésia retrógrada quando injetado nesta fase da memória. Nesta fase, assim como no córtex entorrinal, o agonista e o antagonista não apresentam um efeito antagônico.

Já nas fases mais tardias da consolidação, como 270 minutos (4.5h) e 360 minutos (6h), encontramos que o grupo injetado com salina nestes tempos não apresentou uma diferença significativa em relação ao grupo injetado com bicuculina, o que sugere que os receptores GABAérgicos, bloqueados nestas fases, não estão mais envolvidos nestas fases da consolidação da memória no córtex parietal.

Podemos concluir que o córtex parietal e o córtex entorrinal possuem uma estreita relação, como está ilustrado na Figura 5.3.

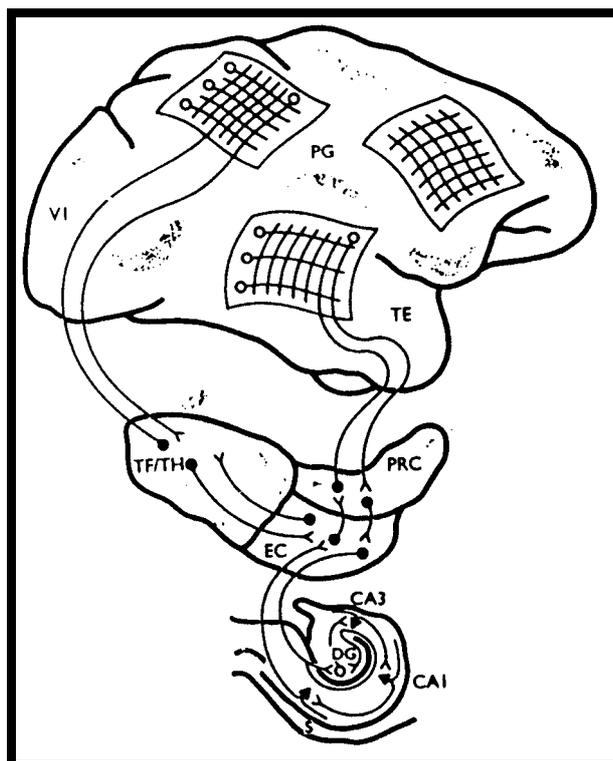


Figura 5.3. Desenho esquemático das conexões entre as diferentes regiões envolvidas na memória: PG: Córtex Parietal Posterior; TE: Córtex Inferotemporal; EC: Córtex Entorrinal; TF/TH: Córtex Parahipocampal; PR: Córtex Perirrinal; CA1 e CA3: Regiões do hipocampo. (Adaptado de SQUIRE. Memory and Brain Systems).

5.4. Amígdala

A amígdala é uma estrutura do cérebro com função de modular a formação de memórias declarativas. Ela recebe, na hora da formação da memória, o impacto inicial de hormônios periféricos (corticóides, adrenalina), liberados no sangue pelo estresse ou pela emoção excessiva. É o núcleo por meio do qual estas substâncias modulam as memórias; sua ativação faz com que estas se gravem, em geral, melhor do que as outras (IZQUIERDO, 2002).

Infusão de AP5 ou muscimol na amígdala imediatamente após o treino é amnésico na tarefa de esquiva inibitória (IZQUIERDO 1992a, 1997b,c, ZANATTA et al, 1997).

No nosso trabalho, quando injetamos o antagonista dos receptores GABAérgicos do tipo A, bicuculina, não observamos nenhuma facilitação na memória, ou seja, não teve um papel antagônico em relação ao agonista. Estes resultados não concordam com as observações de IZQUIERDO et al. (1992a) em que um inibidor do canal de Cl⁻ do receptor GABA_A, a picrotoxina, teve um efeito facilitador quando dado imediatamente após o treino na amígdala. É possível que a pequena diferença entre as coordenadas utilizadas para microinjeção na amígdala no presente trabalho e aquele outro expliquem as diferenças no efeito farmacológico. As coordenadas utilizadas no presente trabalho correspondem à amígdala lateral, com eventual difusão do material injetado para a amígdala basal. As de Izquierdo et al (1992a) estão mais orientadas à amígdala central.

5.5. Conclusões Gerais

Os resultados apresentados neste trabalho nos permitem observar que o sistema GABAérgico está envolvido nos primeiros momentos do processamento da memória na tarefa de esquiva inibitória. Além disso, através da administração do antagonista dos receptores GABA_A em diferentes momentos da consolidação da memória, podemos sugerir que estes participam em diferentes momentos nas diferentes estruturas:

1. O hipocampo tem os receptores inibitórios GABAérgicos envolvidos desde o início da consolidação da memória até 90 minutos após;

2. O córtex entorrinal e o córtex parietal mostraram que têm receptores GABA_A em duas fases distintas: no início da consolidação da memória e 180 minutos após, sendo que 90 minutos não apresentaram facilitação. Este resultado demonstra uma estreita ligação entre estas duas estruturas e, como sugerido, destas com o hipocampo no início da consolidação da memória.

3. A amígdala parece não sofrer alterações em sua função moduladora quando são bloqueados os receptores GABA_A pela bicuculina, diferentemente dos resultados já encontrados com picrotoxina. Estas duas drogas ligam-se em sítios distintos no receptor GABAérgico tipo A, o que pode sugerir que há uma diferença funcional entre os diversos sítios de ligação deste receptor.

4. Para concluir, este trabalho demonstra que os receptores GABAérgicos do tipo A estão envolvidos em tempos distintos nas diferentes estruturas, mas somente até 180 minutos; em tempos mais tardios, não temos mais a função inibitória dos receptores GABA_A agindo na consolidação da memória.

6. BIBLIOGRAFIA

AGRANOFF B.W. Learning and Memory. In: **Basic Neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects**. 6th ed. Lippincott-Raven Publishers, 1027-52, 1998.

ARTIGES, E., SALAME, P., RECASENS, C., POLINE, J., ATTAR-LEVY, D., DE LA PAILLÈRE-MARTINOT, M.L., DANION, J.M., MARTINOT, J.L. Working memory control in patients with schizophrenia, a study during a random number generation task. **American Journal of Psychiatry**, **157**, 1517-19, 2000.

AU LOIS, N.C., NIQUET, J., BEN-ARI, Y, REPRESA, A. Cellular plasticity. In: **Epilepsy: a comprehensive textbook**. Lippincott-Raven Publishers, 387-96, 1997.

BADDELEY, A. **Human Memory, Theory and Practice**. Boston: Allyn & Bacon, 1997.

BARROS, D.M., IZQUIERDO, L.A., MELLO E SOUZA, T., ARDENGUI, P.G., PEREIRA, P., MEDINA, J.H., IZQUIERDO, I. Molecular signalling pathways in the cerebral cortex are required for retrieval of one-trial avoidance learning in rats. **Behavioural Brain Research 114**. p.183-192, 2000.

BARROS, D.M., PEREIRA, P., MEDINA, J.H., IZQUIERDO, I. Modulation of working memory and of long- but not short-term memory by cholinergic mechanisms in the basolateral amygdala. **Behavioural Pharmacology, 13(2)**: 163-7, 2002.

BEAR, M. F. **Neuroscience : exploring the brain**. Baltimore: Willians & Wilkins, 666p., 1996.

BRIONI, J.D. Role of GABA during the multiple consolidation of memory. **Drug Development Research 28**: 3-27, 1993.

CAHILL, L. & MCGAUGH, J.L. Mechanisms of Emotional arousal and lasting declarative memory. **Trends in Neuroscience 21**, 294-299, 1998.

CAMMAROTA, M. **Un Studio Neuroquimico sobre la consolidación de memorias**. Trabajo de Tesis para optar al Título de doctor de la universidad de Buenos Aires. 104p. 1998.

CHAVEZ, M. SALADO-CASTILLO, R., SANCHEZ-ALAUENZ, M., QUIRARTE, G.L., PRADO-ALCALA, R.A. Post-training injection of GABAergic antagonists into the striatum produces retrograde amnesia. **Neurobiology of Learning and Memory** **63**, 296-300, 1995.

CHEN, H., MA, T., HO, I.K. Effects of developmental lead exposure on inhibitory avoidance learning and glutamate receptors in rats. **Environment Toxicological Pharmacology** **9(4)**:185-191, 2001.

COTMAN, C.W. Axonal sprouting. In: **Basic neurochemistry: Molecular cellular and medical aspects**. 6 th ed. Lippincott-Raven Publishers. p. 589-612, 1998.

DELOREY, T. & OLSEN, R. GABA and Glycine. In: **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects**. 5th Ed. Raven Press, New York, 1994.

FERREIRA, G., GUTIERREZ, R., DE LA CRUZ, V., BERMUDEZ-RATTONI, F. Differential involvement of cortical muscarinic and NMDA receptors in short- and long-term taste aversion memory. **European Journal Neuroscience** **16** (6): 1139-45, 2002.

FERREIRA, M.B.C., DA SILVA, R.C., MEDINA, J.H. & IZQUIERDO, I. Late post-training memory processing by entorhinal cortex: role of NMDA and GABAA receptors. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** **41**: 767-71. 1992.

FORTIN, N.J., AGSTER, K.L., EICHENBAUM, H.B. Critical role of the hippocampus in memory for sequences of events. **Nature Neuroscience** **5** (5):458-62, 2002.

GOLDMAN-RAKIC, P., Regional and cellular fractionation of working memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** **93**, 13473-13480, 1996.

HASEGAWA, I. Neural mechanisms of memory retrieval: Role of the prefrontal cortex. **Reviews in Neurosciences** **11**, 113-125, 2000.

HYMAN, B.T., VAN HOESEN, G.W., DAMASIO, A.D. Memory-related neural system in Alzheimer's disease, an anatomic study. **Neurology**, **40**, 1721-30, 1990.

IZQUIERDO, I & MEDINA, J.H. The biochemistry of memory formation and its regulation by hormones and neuromodulators. **Psychobiology** **25**, 1-9, 1997b.

IZQUIERDO, I. & MEDINA, J.H. Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. **Neurobiology of Learning & Memory** **63**, 19-32, 1995.

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

IZQUIERDO, I. & MEDINA, J.H. Role of the amygdala, hippocampus and entorhinal cortex in memory consolidation and expression. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** **26** (6): 573-89. 1993.

IZQUIERDO, I. Different forms of posttraining memory processing. **Behavioral and Neural Biology** **51**, 171-202, 1989.

IZQUIERDO, I. Different hippocampal molecular requirements for short- and long-term retrieval of one-trial avoidance learning. **Behavioural Brain Research** **111**, 93-98, 2000a.

IZQUIERDO, I. **Memória**. Artmed: Porto Alegre. 95p. 2002.

IZQUIERDO, I. Pharmacological evidence for a role of long-term potentiation in memory. **FASEB Journal** **8**, 1139-45, 1994.

IZQUIERDO, I. Short- and Long-Term Memory are Differentially Affected by Metabolic Inhibitors Given into Hippocampus and Entorhinal Cortex. **Neurobiology of Learning and Memory** **73**, 141-49, 2000b.

IZQUIERDO, I., BARROS, D.M., IZQUIERDO, L.A., BARROS, D.M., DE SOUZA, M.M., MELLO E SOUZA, T. Short- and Long-term memory are differentially regulated by monoaminergic systems in rat brain. **Neurobiology of Learning and Memory** **69**, 219-24, 1998c.

IZQUIERDO, I., BARROS, D.M., MELLO E SOUZA, T., DE SOUZA, M.M., IZQUIERDO, L.A., MEDINA, J.H. Mechanisms for memory types differ. **Nature** **393**, 635-36, 1998b.

IZQUIERDO, I., DA CUNHA, C., ROSAT, R., JERUSALINSKY, D., FERREIRA, M.B., MEDINA, J.H. Neurotransmitter receptors involved in memory processing by the amygdala, medial septum and hippocampus of rats. **Behavioral and Neural Biology** **58**, 16-26, 1992a.

IZQUIERDO, I., IZQUIERDO, L.A., BARROS, D.M., MELLO E SOUZA, T., DE SOUZA, M.M., QUEVEDO, J., RODRIGUES, C., SANT'ANNA, M.K., MADRUGA, M., MEDINA, J.H. Differential involvement of cortical receptor mechanisms in working, short- and long-term memory. **Behavioural Pharmacology** **9**, 421-27, 1998a.

IZQUIERDO, I., MEDINA, J.H., JERUSALINSKY, D., DA CUNHA, C. Post-training memory processing in amygdala, septum and hippocampus: role of benzodiazepine/GABAA receptors, and their interaction with other neurotransmitters systems. **Reviews in the Neurosciences**, **3**, 11-23. 1992b.

IZQUIERDO, I., MEDINA, J.H., VIANNA, M.R.M., IZQUIERDO, L.A., BARROS, D.M. Separate mechanisms for short- and long-term memory. **Behavioural Brain Research** **103**, 1-11, 1999.

IZQUIERDO, I., QUILLFELDT, J.A., ZANATTA, M.S., QUEVEDO, J., SCHAEFFER, E., SCHMITZ, P.K., MEDINA, J.H. Sequential role of hippocampus and amygdala, the entorhinal cortex and the posterior parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats. **European Journal of Neuroscience** **9**, 786-93, 1997.

IZQUIERDO, L.A., BARROS, D.M., VIANNA MR, COITINHO, A., DEDAVID
E SILVA, T., CHOI, H., MOLETTA, B., MEDINA, J.H., IZQUIERDO, I.
Molecular pharmacological dissection of short- and long-term memory.
Cellular Molecular Neurobiology **22** (3): 269-87, 2002.

JERUSALINSKY, D., QUILLFELDT, J.A., WALZ, R., DA SILVA, R.C.,
BUENO E SILVA M, BIANCHIN M, SCHMITZ P, ZANATTA MS,
RUSCHEL AC, PACZKO N, ET AL. Effect of the infusion of the GABA-A
receptor agonist, muscimol, on the role of the entorhinal cortex,
amygdala, and hippocampus in memory processes. **Behavioral and
Neural Biology** **61**(2):132-8, 1994.

KANDEL, E.R., SQUIRE, L.S. Neuroscience: Breaking down barriers in the
study of brain and mind. **Science** **290**, 1113-20, 2000.

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

MCGAUGH, J.L. Time-dependent process in memory storage. **Science**
153, 1351-58, 1996.

MCMAHON, D.B. & BARRIONUEVO, G. Short- and long-term plasticity of
the perforant path synapse in hippocampal area CA3. **Journal
Neurophysiology** **88**(1):528-33, 2002.

MEDINA, J.H. & IZQUIERDO, I. Retrograde messengers, long-term potentiation and memory processes. **Brain Research Reviews** **21**, 185-194. 1995.

MORGADO, I. Aprendizaje y Memoria: conceptos, categorías y sistema neurales. In: **Neuroanatomia y fisiología das funciones cerebrales**. Ed. Madrileña. Madrid, Cap. 32. p. 827-73, 1999.

PAXINOS, G. AND WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 2nd ed. Academic Press, San Diego, 1986.

PLATENIK J, KURAMOTO N, YONEDA Y. Molecular mechanisms associated with long-term consolidation of the NMDA signals. **Life Science** **16**;67(4):335-64, 2000.

QUILLFELDT, J. A. **O papel dos receptores glutamatérgicos do tipo AMPA na expressão da memória no córtex entorrinal e estruturas relacionadas**. Tese de Doutorado do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, 1994.

RAMÓN Y CAJAL, S. **Histologie du systeme nerveux de l'homme et des vertebres**. Paris, 1911.

RIEDEL, G. & MICHEAU, J. Function of the hippocampus in memory formation: desperately seeking resolution. **Prog Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry** **25**, 835-53, 2001.

ROUTTENBERG, A. It's about time. In: P.E. Gold & W. Greenough (Eds.), **Memory Consolidation**, p. 17-34, Washington, American Psychological Association, 2001.

SALINAS, J.A. & MCGAUGH, J.L. The amygdala modulates memory for changes in reward magnitude: involvement of the amygdaloid GABAergic system. **Behavioural Brain Research** **80**(1-2):87-98, 1996.

SCHOFIELD, P. Sequence and functional expression of the GABA_A receptor shows a ligand-gated receptor super-family. **Nature** **328**, 16 July, 1987.

SIEGEL, G.J., AGRANOFF, B.W., ALBERS, R.W., MOLINOFF, P.B. **Basic Neurochemistry**. 5ed. Raven Press: New York. 1080p. 1994.

SOUZA, M.M. **Memórias de curta e longa duração: Mecanismos Independentes**. 157p. Tese de Doutorado do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.

SQUIRE, L. R. & ZOLA-MORGAN, S. The medial temporal lobe memory system. **Science** **253**, 1380-86, 1991.

SQUIRE, L.R. & KNOWLTON, B. Memory, hippocampus and brain systems.

In: **The Cognitive Neurosciences**. MIT Press, 1994.

SQUIRE, L.R. Memory and Brain Systems. In: **The biology of memory**. ed.

L. Squire and E. Lindenlaub, p. 648, Schattauer Verlag, 1990.

VIANNA MR, ALONSO M, VIOLA H, QUEVEDO J, DE PARIS F, FURMAN

M, DE STEIN ML, MEDINA JH, IZQUIERDO I. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. **Neurobiology of Learning and Memory** 7(5):333-40, 2000.

VIANNA, M.R.M. Short- and long-term memory: Differential involvement of neurotransmitter systems and signal transduction cascades. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 72, 353-64, 2000.

ZANATTA, M.S., SCHAEFFER, E., SCHMITZ, P.K., MEDINA, J.H., QUEVEDO, J., QUILLFELDT, J.A., IZQUIERDO, I. Sequential involvement of NMDA-dependent mechanisms in hippocampus, amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in memory processing. **Behavioural Pharmacology** 6, 341-45, 1996.

ZANATTA, M.S., QUILLFELDT, J.H., SCHAEFFER, E., SCHMITZ, P.K., QUEVEDO, J., MEDINA, J.H., IZQUIERDO, I. Involvement of the hippocampus, amygdala, entorhinal cortex and posterior parietal cortex in memory consolidation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** **30**: 235-40. 1997.

ZARRINDAST, M.R., BAKHSHA, A., ROSTAMI, P., SHAFAGHI, B. Effects of intrahippocampal injection of GABAergic drugs on memory retention of passive avoidance learning in rats. **Journal Psychopharmacology** **16(4)**:313-319, 2002.

ZIGMOUND, M.J.; BLOOM, F.E.; LANDIS, S.C.; ROBERTS, J.L.; SQUIRE, L.R. Learning and Memory: Basic Mechanisms. In: **Fundamental Neuroscience**. Academic Press. San Diego: California. 1600p. 1999.