

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

**ANGIOTENSINA II BLOQUEIA A CONSOLIDAÇÃO E A  
EVOCAÇÃO DE MEMÓRIAS AVERSIVAS.**

Dissertação de Mestrado

Daniel Shikanai Kerr

Orientador

Prof. Dr. Iván Antonio Izquierdo

Co-Orientador

Prof. Dr. Martín Pablo Cammarota

Porto Alegre, 2004

Dedico essa dissertação aos meus avós:

Warwick

Por me despertar o interesse pela ciência,

Lygia

Por nunca se esquecer ou deixar de torcer por mim, mesmo estando longe,

Helena (Eurico) – *in memoriam*

Por todo o carinho que só a convivência trás e só a falta mostra o quanto era

importante,

Naoe – *in memoriam*

Pela coragem e determinação que me influenciaram, mesmo sem conhecê-lo.

## Agradecimentos

Em primeiro lugar à minha família, meus pais, Joana e Américo e ao meu irmão Gustavo, pois sem o apoio deles não teria a coragem de deixar minha vida sossegada em São Paulo e vir para Porto Alegre correr atrás do que eu queria.

Ao Prof. Iván Izquierdo, por me fornecer a oportunidade de trabalhar com ele, um dos maiores cientistas do mundo e, ainda mais importante, um ser humano fora de série.

Aos Profs. Martin Cammarota e Lia Bevilaqua, por todas as broncas, conselhos, incentivos e acima de tudo o conhecimento transmitido.

Aos amigos do Rio Grande do Sul de dentro e fora do Departamento de Bioquímica, especialmente à Juliana, Janine, Diogo, Marhins, Lucas e Cristiano por toda a ajuda e companheirismo, que tornaram meu “exílio” muito mais divertido.

Aos amigos de São Paulo, GSete, ERAH e pessoal da USP, que mantiveram contato e quando possível me encontravam pra matar a saudade.

A todos os professores do Departamento de Bioquímica, pelo conhecimento transmitido dentro e fora das disciplinas.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica, sem os quais esse trabalho não teria condições de ser realizado, especialmente ao Valeri e sua equipe, Cléia e seu Waldemar que fazem o impossível com o que tem disponível.

Ao CNPq e demais instituições de fomento à ciência de que tanto necessita nosso país.

E por último, à Ana Paula Nishio de Sousa, por ter me mostrado que para certas coisas não existe certo ou errado, mas sim escolhas que fazemos e com as quais temos que aprender a viver.

## Sumário

Resumo	vi
Abstract	vii
Lista de Abreviaturas	viii
Índice de Figuras	ix
1. Introdução	1
1.1. Classificações da memória	1
1.2. Fases da memória	5
1.3. Mecanismos da memória	6
1.4. Esquiva Inibitória	7
1.5. Modulação da memória	8
1.6. Sistema Renina Angiotensina	10
2. Objetivos	14
3. Materiais e Métodos	15
4. Resultados	21
5. Discussão	30
6. Conclusões	35
7. Bibliografia	36

## Resumo

O sistema renina - angiotensina tem um papel importante e bem descrito na modulação do sistema cardiovascular. Sua participação em processos cognitivos tem sido assunto de diversos trabalhos. É de particular interesse a modulação da memória pela ação de seus metabólitos funcionais, angiotensina II (All) e IV (AIV), no sistema nervoso central. Apesar dos diversos trabalhos abordando o assunto, o papel da All no processamento da memória continua controverso. Para tentar aprofundar essa questão utilizamos o paradigma da esQUIVA inibitória de uma única sessão em conjunto com a infusão intra-hipocampal de All, AIV, e antagonistas AT1 ou AT2. Ratos foram implantados com cânulas na região CA1 do hipocampo dorsal, alguns dias depois da cirurgia foram treinados em uma tarefa de esQUIVA inibitória e, em tempos diferentes após o treino, foram infundidos com veículo ou uma das drogas descritas acima. Os animais foram testados 3 ou 24 h após o treino; no primeiro caso para avaliar memória de curta duração (STM) e para avaliar memória de longa duração (LTM) no segundo. Verificou-se um efeito amnésico para a All na consolidação da LTM e STM quando infundida imediatamente ou 30 min pós-treino, e na evocação da LTM quando infundida 15 min antes do teste. O efeito amnésico da All parece ser modulado exclusivamente por sua ação em receptores AT2, não tendo participação nem receptores AT1, nem sua conversão endógena em AIV. A All endógena não parece ter qualquer participação na formação da memória de esQUIVA inibitória.

## Abstract

The renin-angiotensin system (RAS) plays a well documented role in the modulation of the cardiovascular system. Its participation in cognitive processes has been the subject of several studies. Of particular interest is the modulation of memory by RAS functional metabolites, angiotensin II (AII) and IV (AIV), in the central nervous system. Although there is extensive work on the subject, the role of AII in memory processing is still controversial. To try to solve this discrepancy, we utilized the one-trial inhibitory avoidance paradigm together with stereotaxically localized intra-hippocampal infusions of AII, AIV, or AII receptors antagonists. Briefly, rats were implanted with cannulae aimed at the CA1 region of the dorsal hippocampus, before being trained in the avoidance task. At different post-training times, the animals were infused with vehicle or the previous described drugs. Animals were tested 3 or 24 h after the training session, to evaluate short- (STM) and long-term memory (LTM) respectively. AII blocked STM and LTM consolidation when infused immediately or 30 min after training, and impaired memory retrieval when infused 15 min before the test session. The amnesic effects of AII are mediated by AT2 receptors only and neither AT1 receptors nor the endogenous conversion of AII in AIV seems to play any role on them.

## Lista de Abreviaturas

STM – memória de curta duração

LTM – memória de longa duração

CA1 – região 1 do corno de Amon do hipocampo

AMPA – ácido alfa-amino-3-hidroxi-4-metil-5-isoxazol propiônico

NMDA – ácido N-metil-D-aspartico

PKA – proteína cinase dependente de AMPc

PKC – proteína cinase dependente de cálcio e fosfolipídeos

CaMKII – proteína cinase II dependente de cálcio e calmodulina

MAPK – proteínas cinases ativadas por mitógeno

SRA – sistema renina angiotensina

Ang II – angiotensina II

ECA – enzima conversora de angiotensina

Ang IV – angiotensina IV

AT1 – receptores de angiotensina do tipo 1

AT2 – receptores de angiotensina do tipo 2

AT4 – receptores de angiotensina do tipo 4

SNC – sistema nervoso central

Rearings - elevações das patas dianteiras

## Índice de figuras

<b>Figura 1.1.</b> Classificações das memórias e regiões do sistema nervoso central envolvidas na formação das mesmas.....	4
<b>Figura 1.2.</b> Corte histológico do hipocampo de rato, indicando a região 1 (CA1 – área alvo deste estudo) e 3 (CA3) do corno de Amon e o giro denteado (GD).....	7
<b>Figura 1.3.</b> Sistema renina angiotensina – via de síntese e enzimas envolvidas.....	11
<b>Figura 3.1.</b> Cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas na região CA1 do hipocampo dorsal. Coordenadas utilizadas (AP –4,2 mm, ML 3,0 mm, DV 1,3 mm).....	15
<b>Figura 3.2.</b> Aparelho utilizado para a tarefa da esQUIVA inibitória de uma única sessão.....	17
<b>Figura 3.3.</b> Animal recebendo infusão localizada na região CA1 do hipocampo dorsal.....	18

<b>Figura 3.4.</b> Representação esquemática de um corte histológico de hemisfério cerebral.....	19
<b>Figura 4.1.</b> A infusão intra-hipocampal de angiotensina II (AII) prejudica a consolidação da memória de longa duração associada à tarefa de esquiva inibitória.....	21
<b>Figura 4.2.</b> A infusão intra-hipocampal de angiotensina IV (AIV) não tem efeito sobre a consolidação da memória associada à tarefa de esquiva inibitória.....	22
<b>Figura 4.3.</b> O efeito amnésico da infusão intra-hipocampal de angiotensina II (AII) não é bloqueado pela administração de antagonistas do receptor AT1.....	23
<b>Figura 4.4.</b> O efeito amnésico da infusão intra-hipocampal de angiotensina II (AII) é revertido pela co-administração do antagonista AT2 PD123319 (PD).....	24
<b>Figura 4.5.</b> A consolidação da memória associada à tarefa de esquiva inibitória não é modulada pela angiotensina II hipocampal endógena.....	25

- Figura 4.6.** A infusão intra-hipocampal de angiotensina II (All) inibe a formação da memória de curta duração associada à tarefa de esquiva inibitória de uma única sessão..... 26
- Figura 4.7.** A infusão intra-hipocampal de angiotensina II (All) bloqueia a evocação da memória de longa duração associada à tarefa de esquiva inibitória de uma única sessão..... 27
- Figura 4.8.** As atividades locomotora e exploratória não são afetadas pela infusão intra-hipocampal de angiotensina II (All)..... 28
- Figura 4.9.** O estado de ansiedade do animal não é alterado pela infusão intra-hipocampal de angiotensina II (All)..... 29

## 1. Introdução

A ciência moderna apresenta um caráter extremamente reducionista. Desenvolve-se na tentativa de reduzir todo sistema, por mais complexo que seja, a poucas regras simples.

Nem a mente, a mais elevada das funções humanas, conseguiu escapar. Desde a visualização do neurônio por Ramón y Cajal no final do século XIX, o pensamento, o raciocínio e outras funções cognitivas foram reduzidos pela neurociência à integração de impulsos internos e externos gerando respostas comportamentais. Onde foi parar nossa liberdade de escolha ou nossa individualidade se todas as nossas decisões são o resultado de estímulos químicos e físicos sendo interpretados numa complexa rede de neurônios? A resposta está no assunto principal dessa dissertação, a memória. As experiências vividas e acumuladas ao longo dos anos fazem com que cada um seja um indivíduo único e essas mesmas experiências ao tornarem-se memórias fazem com que essa intrincada rede neuronal se modifique tornando as integrações e respostas a estímulos únicos para cada pessoa.

### 1.1. Classificações da memória

Todo objeto de estudo demanda classificações que permitam agrupar seus diferentes aspectos funcionais ou característicos. Uma forma clara de se classificar as memórias é segundo seu tempo de permanência. Dessa forma

podemos separá-las em memórias de curta duração (STM, “short-term memory”) ou de longa duração (LTM, “long-term memory”). As primeiras permanecem armazenadas por breves períodos, enquanto que as de longa duração podem se estender por dias, meses ou até mesmo anos. Durante muito tempo acreditou-se que a STM seria somente uma etapa na consolidação da LTM. No entanto, experimentos de nosso laboratório demonstraram que existem tratamentos farmacológicos capazes de bloquear a STM sem afetar a LTM (IZQUIERDO et al., 1998a; 1998b). O qual sugere fortemente que, apesar de partilharem diversos mecanismos, a STM e a LTM também possuem características que lhes são próprias as quais as constituem em dois processos relacionados, porém independentes.

As memórias também podem ser classificadas segundo o seu conteúdo (COHEN, 1984; SQUIRE & ZOLA-MORGAN, 1991; SQUIRE, 1992). Aquelas memórias cujo conteúdo refere-se a habilidades motoras, tais como andar de bicicleta, são denominadas de procedimento. Memórias que registram fatos, eventos ou conhecimentos são denominadas declarativas, uma vez que seu conteúdo pode ser relatado. Memórias declarativas são sub-divididas em episódicas ou semânticas. As primeiras são constituídas pelo registro de eventos aos que assistimos ou dos quais participamos, enquanto que as semânticas são formadas por conhecimentos gerais como matemática ou biologia.

Muitas memórias são adquiridas mediante a associação direta de estímulos e respostas, sendo então denominadas memórias associativas. Pavlov (1926) foi um dos primeiros a estudar metódica e cientificamente esse tipo de memórias ao

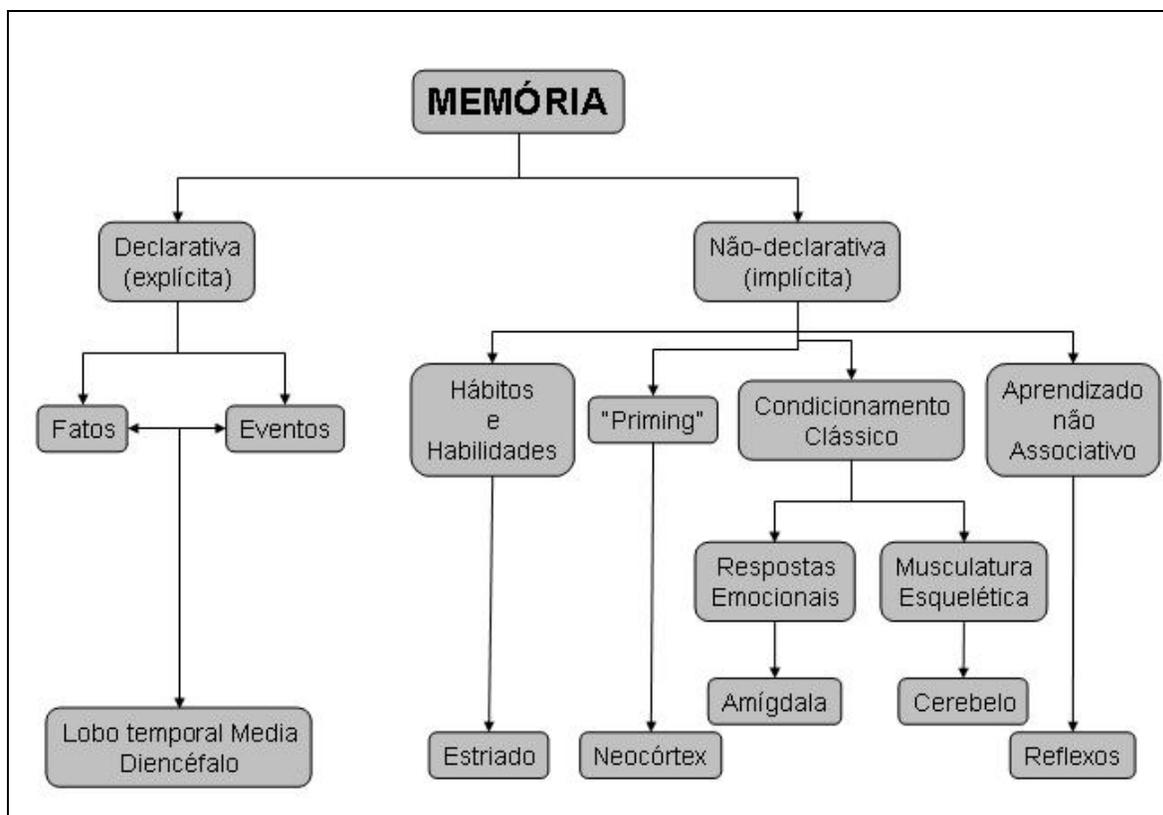
descrever e analisar um tipo de paradigma comportamental que posteriormente receberia o nome de condicionamento clássico ou pavloviano. No condicionamento clássico, um estímulo comportamental inicialmente neutro, denominado condicionado (ambiente, som, etc.), é apresentado repetidamente antecedendo a outro biologicamente significativo, denominado incondicionado (comida, choque, barulho, etc.). Após um número determinado de repetições, que depende do par de estímulos escolhidos, estabelece-se uma relação entre ambos estímulos. Essa relação é caracterizada pelo fato do animal aprender a emitir a resposta ao estímulo incondicionado quando da apresentação do estímulo condicionado, que era inicialmente neutro.

Além do condicionamento clássico existem outro tipo de aprendizado, conhecido como condicionamento instrumental. Neste, o animal utiliza a informação adquirida para evitar receber um castigo ou para obter uma recompensa. Os condicionamentos instrumentais incluem os condicionamentos operantes e os condicionamentos de “prova-erro”. Os primeiros referem-se aos paradigmas experimentais nos quais o animal é motivado, por um estímulo desagradável (medo, fome, etc.), a explorar um ambiente, realizando uma série de tarefas motoras, uma das quais será pareada com um estímulo negativo ou positivo. Após um número determinado de repetições o animal aprende a atuar de maneira a receber sua recompensa ou evitar o castigo. Nos condicionamentos de “prova-erro”, os animais aprendem a executar uma rotina de complexidade variável, durante as quais recebem uma recompensa, no caso de acerto, ou um castigo, quando erram (KANDEL et al., 2000).

Os condicionamentos instrumentais podem ser também passivos ou ativos. No primeiro caso o animal aprende a inibir um comportamento para evitar receber um estímulo aversivo ou para receber uma recompensa. No segundo caso o prêmio ou castigo está relacionado com a emissão de uma resposta aprendida.

A esQUIVA inibitória de uma única sessão, paradigma escolhido para a realização desse trabalho da qual falaremos com mais detalhes adiante, encontra-se no grupo dos condicionamentos passivos.

Existem outras classificações de memórias, algumas dessas estão resumidas na Figura 1.1.



**Figura 1.1. Classificações das memórias e regiões do sistema nervoso central envolvidas na formação das mesmas.** Adaptado de SQUIRE et al., 1996.

## 1.2. Fases da memória

Existem três etapas definidas no processamento da memória: aquisição, consolidação e evocação (IZQUIERDO, 2002).

Durante a aquisição ocorre a integração entre estímulos, ou entre estímulos e respostas, relacionados ao evento que está sendo processado. Nessa etapa o traço mnemônico é muito intenso, portanto experiências recentes são recordadas com mais nitidez. Essa nitidez decai com o tempo e esse é o motivo pelo qual recordamos com mais facilidade eventos recentes.

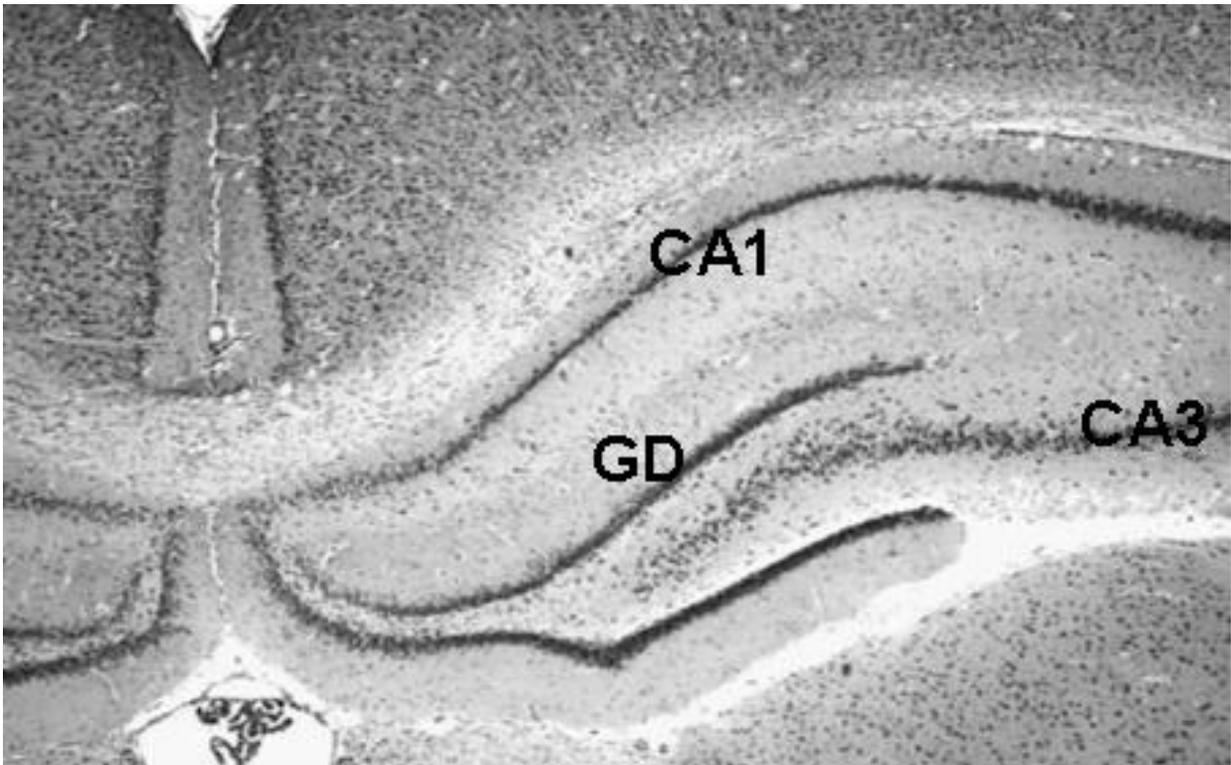
Das memórias adquiridas nem todas serão preservadas, e mesmo estas apresentarão diferentes níveis de detalhamento e intensidade. Muitos se lembram do primeiro beijo, mesmo décadas depois, mas muitos não se lembram o que comeram no jantar de ontem. Mesmo nas memórias de grande intensidade muitos detalhes são perdidos: qual a roupa que estava usando na ocasião, quem estava por perto, qual a data ou a hora. A consolidação consiste nesse processo de filtração e na posterior fixação do traço mnemônico necessário para a posterior evocação.

Uma memória só pode ser medida quando for evocada ou expressa; dessa forma a própria evocação é considerada uma parte importante do processamento mnemônico.

### 1.3. Mecanismos da memória

O armazenamento adequado da memória requer a ação conjunta de diversas áreas cerebrais e mecanismos (IZQUIERDO & MEDINA, 1997). Sabe-se que a consolidação de memórias declarativas envolve o hipocampo e o córtex entorrinal, e através do córtex entorrinal outras regiões corticais como córtex cingulado e parietal (IZQUIERDO & MEDINA, 1998). Particularmente foi mostrado que para a formação da LTM é necessária a ação seqüencial de diferentes mecanismos moleculares na região 1 do corno de Amon do hipocampo (CA1) (Figura 1.2). Num primeiro momento é necessário o funcionamento de receptores ionotrópicos glutamatérgicos que tem como agonista seletivo o ácido alfa-amino-3-hydroxi-4-metil-5-isoxazol propiônico (AMPA) e o ácido N-metil-D-aspartico (NMDA), bem como de outros receptores glutamatérgicos que se encontram associados a proteínas G (metabotrópicos) (BIANCHIN et al., 1994; BONINI et al., 2003; JERUSALINSKY et al., 1992). A ação desses receptores leva ao aumento de cálcio intracelular ativando diferentes cinases, particularmente a proteína cinase dependente de AMPc (do inglês PKA), a proteína cinase dependente de cálcio e fosfolípídeos (do inglês PKC), proteína cinase II dependente de cálcio e calmodulina (do inglês CaMKII) e as proteínas cinases ativadas por mitógeno (do inglês MAPK) (BERNABEU et al., 1997; CAMMAROTA et al., 2000, 2002; VIANNA et al., 2000). Todas estas cinases, por sua vez, ativam diferentes processos intracelulares capazes de induzir a transcrição gênica e a síntese protéica promovendo o remodelamento, necessário para o fortalecimento duradouro das

conexões sinápticas (CAMMAROTA et al., 2000). Acredita-se que esse fortalecimento é requerido para o estabelecimento persistente do traço mnemônico.



**Figura 1.2.** Corte histológico de hipocampo de rato, indicando a região 1 (CA1 – área alvo desse estudo) e 3 (CA3) do corno de Amón e o giro denteado (GD).

#### 1.4. Esquiva inibitória

Muitos dos trabalhos que levaram à descoberta dos mecanismos citados acima utilizaram como paradigma comportamental a esquiva inibitória de uma única sessão. Apesar de não ser possível extrapolar diretamente esses resultados para

outros comportamentos, principalmente os complexos comportamentos humanos, diferentes evidências apontam para o fato de que os mecanismos básicos da aquisição, consolidação e evocação são essencialmente os mesmos nos diferentes tipos de memória (CAREW, 1996; IZQUIERDO & MCGAUGH, 2000).

A esquiva inibitória de uma única sessão é uma tarefa amplamente utilizada na qual, em uma única sessão de treino, o animal aprende a inibir uma resposta para evitar um estímulo aversivo levando à formação de uma memória declarativa. Esse paradigma foi escolhido para a realização dos experimentos que compõem esta dissertação, pois apresenta diversas vantagens para o estudo farmacológico dos mecanismos envolvidos nas memórias de curta e longa duração (IZQUIERDO & MEDINA, 1997). Por ser adquirido em uma única sessão de treino o aprendizado da esquiva inibitória de uma única sessão permite isolar cada uma das fases do processamento da memória, aquisição, consolidação e evocação. Nesse sentido, paradigmas de múltiplas sessões apresentam problemas para a interpretação dos resultados, pois cada sessão envolve uma interação complexa entre as distintas etapas em que se sub divide o processamento e armazenado de nova informação.

### 1.5. Modulação da memória

Além dos mecanismos expostos acima, todo o processamento da memória pode ser modulado por fatores externos. É sabido que o estado de ânimo, ansiedade e estresse, por exemplo, podem alterar a intensidade da formação ou evocação de

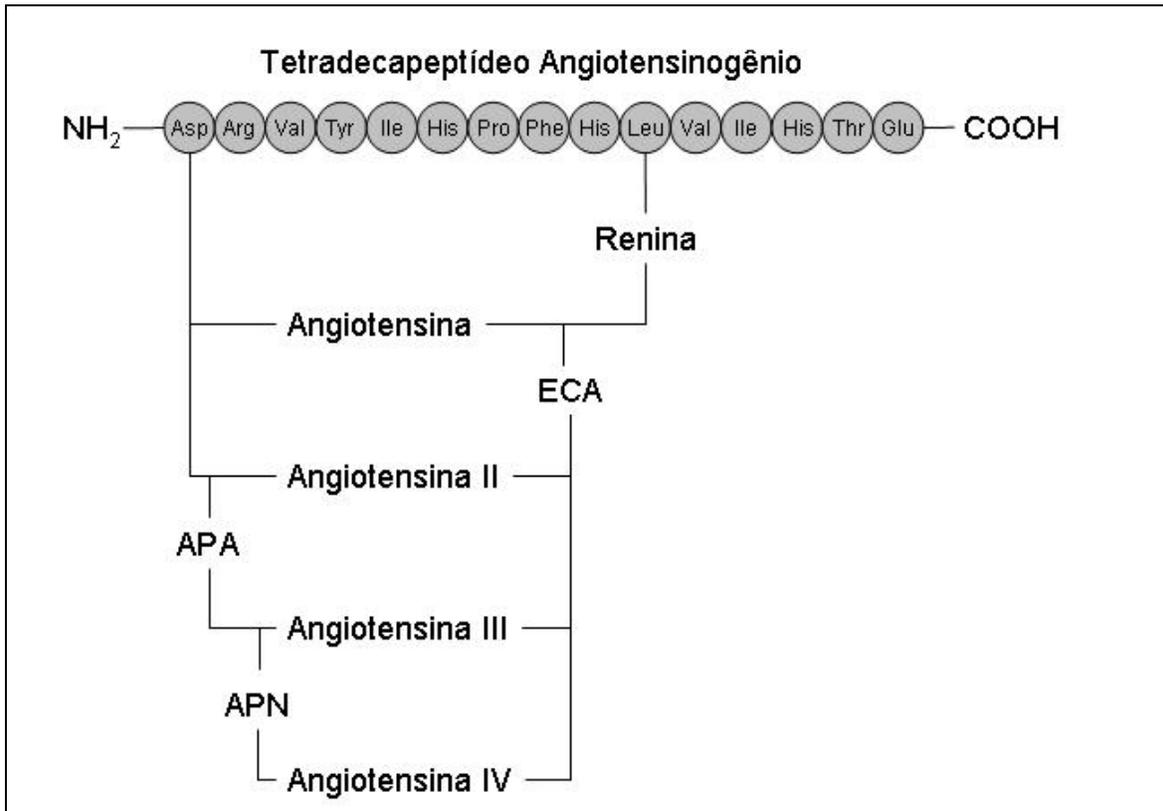
uma memória (CAHILL & MCGAUGH, 1998). Nos recordamos melhor das disciplinas com que tínhamos mais afinidade, ou cujos professores conseguiam despertar o nosso interesse. Da mesma forma quantos não sofreram do famoso “branco” durante uma prova particularmente importante, só se lembrando das respostas no momento em que relaxava após o teste. Hoje sabemos que o núcleo chave envolvido na modulação emocional das memórias é a amígdala (PARE, 2003). Variações do estado de alerta, estresse e ansiedade levam à estimulação ou inibição da hipófise anterior e posterior e medula e córtex da glândula supra-renal levando a alterações na liberação de hormônio adrenocorticotrófico, vasopressina, adrenalina e glucocorticóides, respectivamente. A amígdala monitora os níveis circulantes desses hormônios por meio de sinapses colinérgicas e noradrenérgicas aferentes e exerce seu papel modulador sobre a memória por meio de conexões com o hipocampo e o córtex entorrinal (CAHILL & MCGAUGH, 1998).

Além da modulação pela amígdala sabe-se que a fase inicial da LTM pode ser modulada pela ação direta de receptores dopaminérgicos, noradrenérgicos e serotoninérgicos no córtex entorrinal e hipocampo (FERRY et al., 1999; SETLOW & MCGAUGH, 2000; IZQUIERDO, 1999).

Outros sistemas hormonais podem estar envolvidos direta ou indiretamente com o processo de aprendizado. Existem hoje fortes evidências que o sistema renina-angiotensina (SRA) possa exercer diretamente um papel modulador sobre a memória (GARD, 2002).

## 1.6. Sistema Renina - Angiotensina

O SRA tem um conhecido papel na regulação do sistema cardiovascular. Sabe-se que normalmente o SRA é ativado quando o organismo apresenta: insuficiência cardíaca, baixas concentrações de sódio, contração do compartimento intravascular (desidratação, hemorragia, diarreia), aumento do tônus simpático, ou outra alteração que leve à hipotensão arterial. Essa hipotensão é detectada na artéria renal e funciona como sinal para a produção de renina. A renina é produzida pelos rins e liberada na corrente sanguínea, onde ela converte o angiotensinogênio produzido pelo fígado em angiotensina I; esta é a etapa limitante da via de síntese do SRA. A angiotensina I, por sua vez, será convertida em angiotensina II (All) numa reação catalisada pela enzima conversora de angiotensina (ECA) (DZAU, 1991). A All é o peptídeo ativo do SRA de efeito biológico melhor descrito. All ainda pode ser metabolizada por aminopeptidases endógenas sendo convertida, em passos subseqüentes, em angiotensina III e angiotensina IV (AIV) (Figura 1.3), mediante reações catalisadas pela aminopeptidase A e aminopeptidase N, respectivamente (WRIGHT & HARDING, 1997).



**Figura 1.3. Sistema renina angiotensina – via de síntese e enzimas envolvidas.** ECA – enzima conversora de angiotensina, APA – aminopeptidase A, APN – aminopeptidase N. Adaptado de WRIGHT & HARDING, 1997.

Agindo sobre receptores de angiotensina do tipo 1 (AT1) a Angiotensina II promove, entre outros efeitos, vasoconstrição e produção aumentada de aldosterona e vasopressina. A aldosterona e a vasopressina induzem a retenção de sódio e água, respectivamente, e dessa maneira têm um importante papel na homeostase de líquidos no organismo. Existem outros dois receptores de angiotensina descritos, tipo 2 (AT2) e tipo 4 (AT4), ainda que o papel fisiológico desses receptores não está bem caracterizado (ALLEN et al., 1998). Existem indícios que o receptor AT2 antagonize os efeitos do receptor AT1 (HUANG et al., 1996;

NAKAJIMA et al., 1995). O receptor AT4 parece ser específico para AIV e tem diversas ações tanto centrais quanto sistêmicas (WRIGHT et al., 1995).

Verificou-se a presença de AII (SIRETT et al., 1981) e seus receptores (ALLEN et al., 1998) no sistema nervoso central (SNC) de mamíferos, especialmente no hipocampo, sugerindo a existência de um SRA local, dado que AII não cruza facilmente a barreira hemato-encefálica (HARDING et al., 1988).

Esse SRA encefálico tem sido relacionado à regulação de pressão arterial e alterações no comportamento da ingestão de líquidos (PHILLIPS & SUMMER, 1998; WRIGHT et al., 1985). A ação da AII no SNC tem sido relacionada, também, com algumas funções cognitivas e mais especificamente com o processamento da memória (GARD, 2002) ainda que, apesar do crescente número de trabalhos sobre o assunto, o papel da AII na memória permanece controverso. Diferentes trabalhos propõem um efeito amnésico da AII (LEE et al., 1995; MORGAN et al., 1977; RAGHAVENDRA et al., 1999) enquanto outros sugerem que esta melhoraria a memória (BELCHEVA et al., 2000; BRASZKO, 2002; GEORGIEV & YONKOV, 1985).

Muitos dos estudos sobre o papel da AII na memória utilizaram paradigmas que requerem mais de uma sessão de treino, em conjunto, ou não, com infusão não localizada de AII. Os paradigmas de múltiplas sessões não permitem definir o evento que dispara o processo de aprendizado e, dessa maneira, impossibilitam a determinação de um curso temporal para a ação do mecanismo estudado. A infusão não localizada, por sua vez, tem uma ação geral, não permitindo delimitar qual o papel de cada estrutura no modelo utilizado.

As doenças do sistema cardiovascular figuram entre as mais preocupantes hoje em dia. Drogas que agem no SRA estão entre as mais utilizadas para o tratamento dessas doenças. Com o aumento no número de casos e concomitante utilização dessas drogas é de grande interesse sabermos como o SRA interage com uma função importante como a memória.

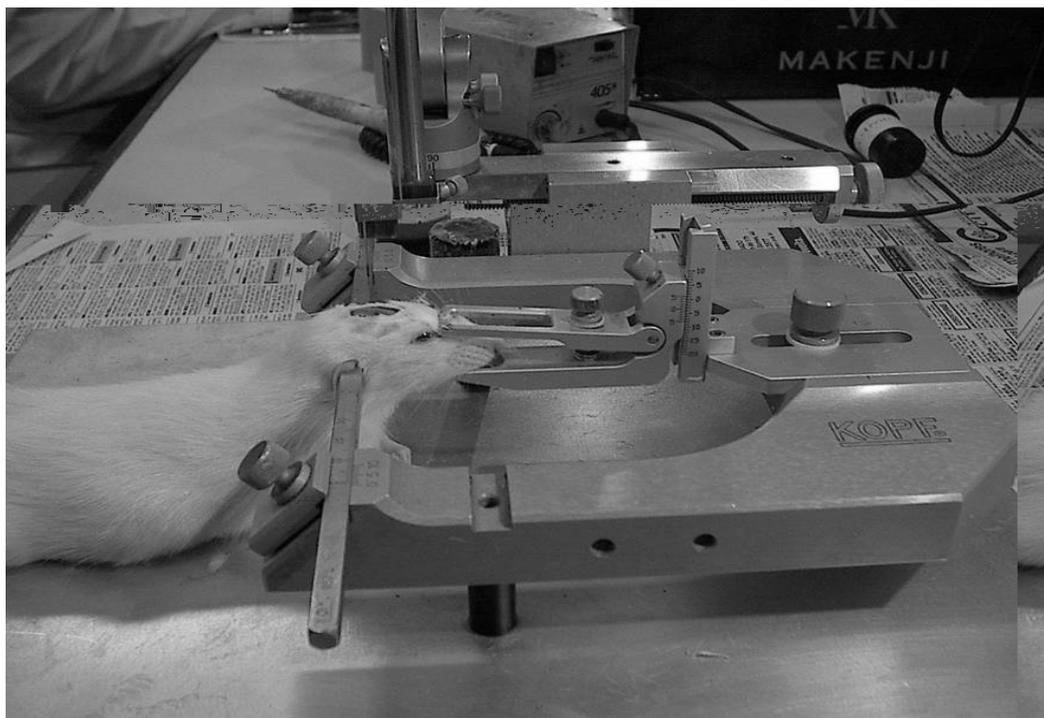
## 2. Objetivos

Diante do exposto acima, este trabalho teve como por objetivo central avaliar farmacologicamente o papel da angiotensina II na consolidação e evocação da memória associada com o aprendizado de uma tarefa de esquiva inibitória de uma única sessão no rato. Para tanto:

- 1) Estudamos o efeito da infusão intra-hipocampal de All e seu metabólito, angiotensina IV, na consolidação e evocação da memória;
- 2) Para avaliar o papel dos receptores de angiotensina do tipo 1 e 2 nos efeitos da All na memória de longa duração, estudamos o efeito da infusão intra-hipocampal de antagonistas específicos dos receptores AT1 e AT2 em conjunto, ou não, com All.

### 3. Materiais e Métodos

Para a realização dos estudos relatados nessa dissertação, utilizamos ratos Wistar machos de três meses de idade, pesando entre 225 e 300 g, provenientes do Biotério do Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para a implantação de cânulas de 0,2 mm de diâmetro posicionadas 1,0 mm acima da região CA1 do hipocampo dorsal (Figura 3.1). As coordenadas utilizadas (AP -4,2 mm, ML 3,0 mm, DV 1,3 mm) foram determinadas a partir do Atlas anatômico de Paxinos e Watson (1986). Todo o procedimento foi realizado com os animais anestesiados com tionembutal (30 mg/kg, intra-peritonial).



**Figura 3.1.** Cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas na região CA1 do hipocampo dorsal. Coordenadas utilizadas (AP -4,2 mm, ML 3,0 mm, DV 1,3 mm).

Dois a quatro dias após a cirurgia, os animais passaram por duas a três sessões de manipulação, para se acostumarem com o procedimento, a sala e o experimentador. Durante cada sessão os animais foram levados do biotério até a sala onde os experimentos seriam conduzidos, retirados da gaiola e manuseados durante 2 min imitando os movimentos que são realizados durante o treino de esquivas inibitórias.

No dia seguinte à última sessão de manipulação os animais foram treinados na esquivas inibitórias. O aparelho utilizado para a esquivas inibitórias de uma única sessão consiste em uma caixa de madeira de 50,0 x 25,0 x 50,0 cm, com a parte frontal feita de acrílico. O assoalho do aparelho é formado por uma série de barras de aço inoxidável, paralelas, com 3,0 mm de diâmetro e afastadas 1,0 cm umas das outras. No lado esquerdo da caixa tem uma plataforma de 2,5 cm de altura, por 7,0 cm de largura (Figura 3.2). Na sessão de treino, os animais foram colocados na plataforma e no momento em que desciam colocando as quatro patas na grade, recebiam um choque elétrico nas patas de 0.5 mA durante 2 segundos (BEVILAQUA et al., 2003a; CAMMAROTA et al., 2003). O tempo de descida era anotado e comparado com o obtido em uma sessão de teste realizada 3 ou 24 h depois, para assim avaliar a STM ou a LTM, respectivamente. O procedimento na sessão de teste foi idêntico ao descrito acima para o treino, exceto que ao descer da plataforma o animal não recebia choque. Para ambas sessões foram adotados tempos máximos de descida, sendo 20 s para a sessão de treino e 180 s para a sessão de teste, após os quais o animal era devolvido à sua gaiola. Caso o animal ultrapassasse esse limite de tempo na sessão de treino

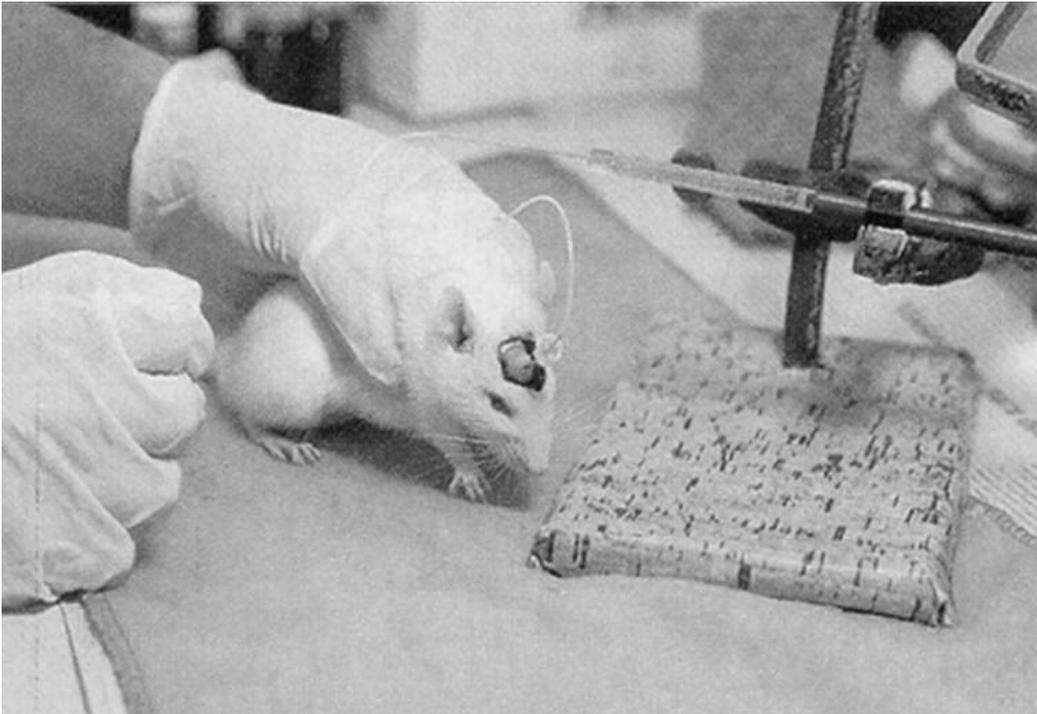
não era mais considerado para o resto do experimento.



**Figura 3.2. Aparelho utilizado para a tarefa da esquiva inibitória de uma única sessão.**

Em diferentes tempos depois do treino os animais recebiam uma infusão de 0,5  $\mu$ L através da cânula implantada (cânula guia). Para tanto se utilizou uma cânula de infusão (0,05 mm de diâmetro), conectada a uma micro-seringa Hamilton por um tubo de polietileno, esse aparato era carregado com o material a ser infundido. A cânula de infusão foi acoplada então à cânula guia e a infusão foi realizada durante 30 s em um lado e depois no outro. Ao termino de cada infusão a cânula foi deixada no local por 15 s adicionais para evitar refluxo (Figura 3.3).

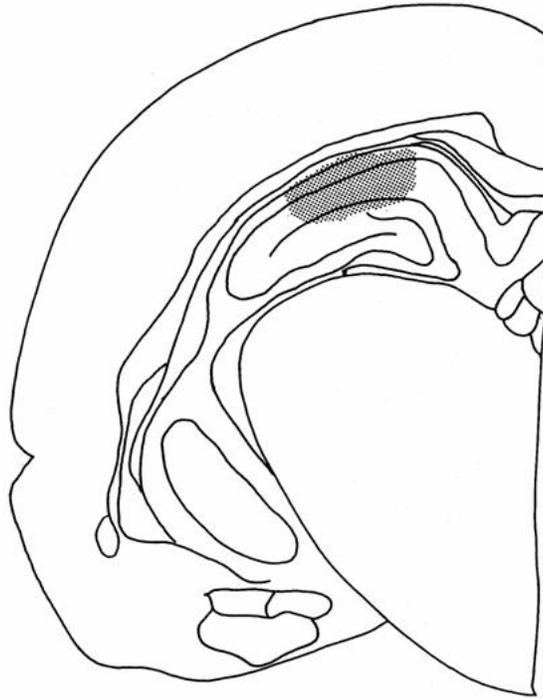
A verificação anatômica do posicionamento das cânulas implantadas foi realizada *post mortem*. Para isso, depois dos procedimentos comportamentais aos quais os



**Figura 3.3. Animal recebendo infusão localizada na região CA1 do hipocampo dorsal.**

animais foram submetidos, estes receberam uma solução de azul de metileno 0,1% através das cânulas como descrito acima. Quinze minutos depois disto foram sacrificados e seus cérebros removidos e colocados em uma solução de formol ao 4% por um período de 4 a 7 dias. Após isto se procedeu a análise histológica. Somente animais com a localização dentro de  $2 \text{ mm}^3$  do local desejado foram considerados (Figura 3.4).

Buscando avaliar o efeito da infusão de All na atividade locomotora bem como no comportamento exploratório dos animais utilizamos a tarefa denominada campo aberto. Para este intuito o aparelho utilizado consiste em uma caixa de madeira de 40 x 60 x 50 cm com a sua parede frontal feita de vidro. O assoalho da caixa é



**Figura 3.4. Representação esquemática de um corte histológico de hemisfério cerebral.** A parte grifada mostra a área alvo das infusões realizadas nos experimentos apresentados nesta dissertação. Animais nos quais a infusão de azul de metileno, realizada durante a verificação de posicionamento das cânulas, estava fora da área indicada acima não foram considerados durante a análise dos dados.

dividido em 12 quadrantes iguais. Durante o testes, os animais foram colocados gentilmente no quadrante esquerdo posterior e deixados para explorar livremente a caixa por 5 min. O número de linhas cruzadas tanto como o número de elevações das patas dianteiras (“rearings”; um comportamento que, nos roedores, denota exploração) foram anotados (IZQUIERDO et al., 2002; VIANNA et al., 2000). Quinze minutos ou 24 h antes da sessão os animais receberam salina ou droga, seguindo o mesmo protocolo de infusão descrito acima.

Para testar possíveis alterações no estado de ansiedade dos animais causadas

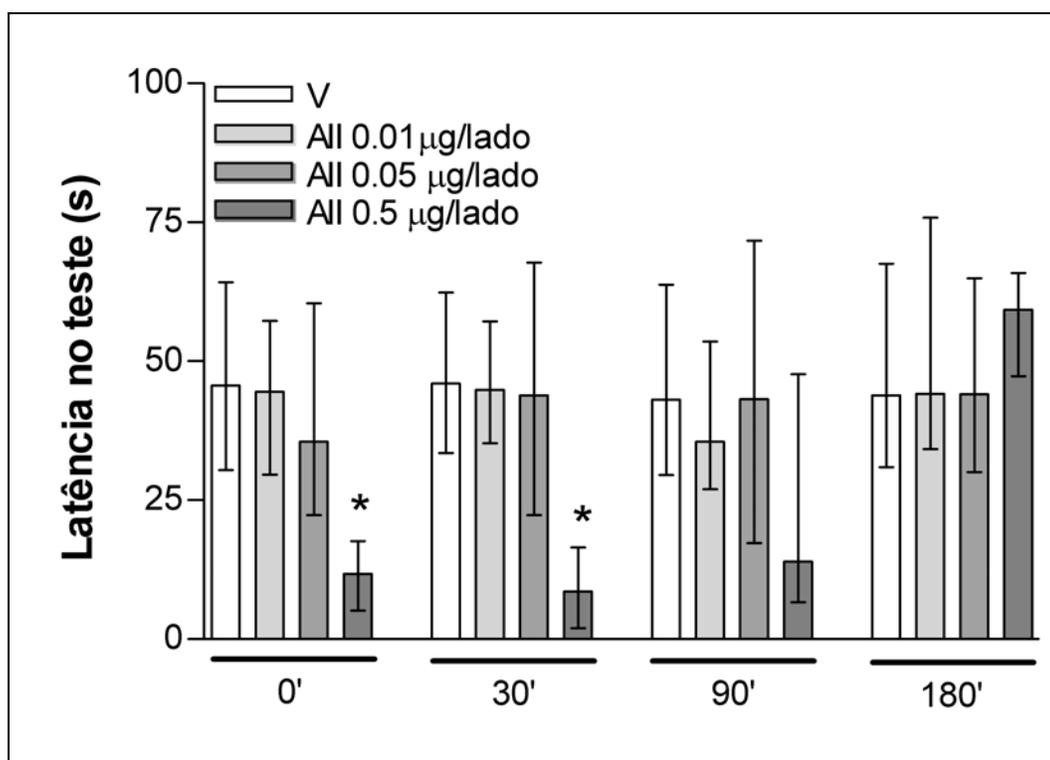
pela infusão de AII, utilizamos um labirinto em cruz elevado. O labirinto em cruz elevado consiste em uma plataforma em cruz com 40 cm cada braço, posicionada a 1 m de altura. Dois braços do labirinto possuem paredes elevadas, sendo denominados fechados, e os outros dois não possuem paredes, portanto denominados abertos. Os animais eram soltos no centro do aparelho e deixados livres para explorar por 5 min. Foram registrados durante a sessão, o tempo de permanência e o número de entradas nos braços abertos e fechados (BARROS et al., 2002; BEVILAQUA et al., 2003b). Quinze minutos ou 24 h antes da sessão os animais receberam salina ou droga, seguindo o mesmo protocolo de infusão descrito acima.

Para a análise estatística dos dados utilizamos o software Graph-Pad Prism. Os dados obtidos na esQUIVA inibitória foram analisados utilizando teste de Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunns ou teste de Mann-Whitney, uma vez que seguem uma distribuição não-paramétrica. Os dados do campo aberto e do labirinto em cruz elevado foram analisados utilizando ANOVA seguido de teste de Dunnet.

Nesse estudo as seguintes drogas foram utilizadas: angiotensina II, angiotensina IV, losartan e PD123319, todas foram obtidas da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Todas as drogas foram dissolvidas em salina, exceto o PD123319 que foi dissolvido em solução 0,1% de dimetil-sulfóxido.

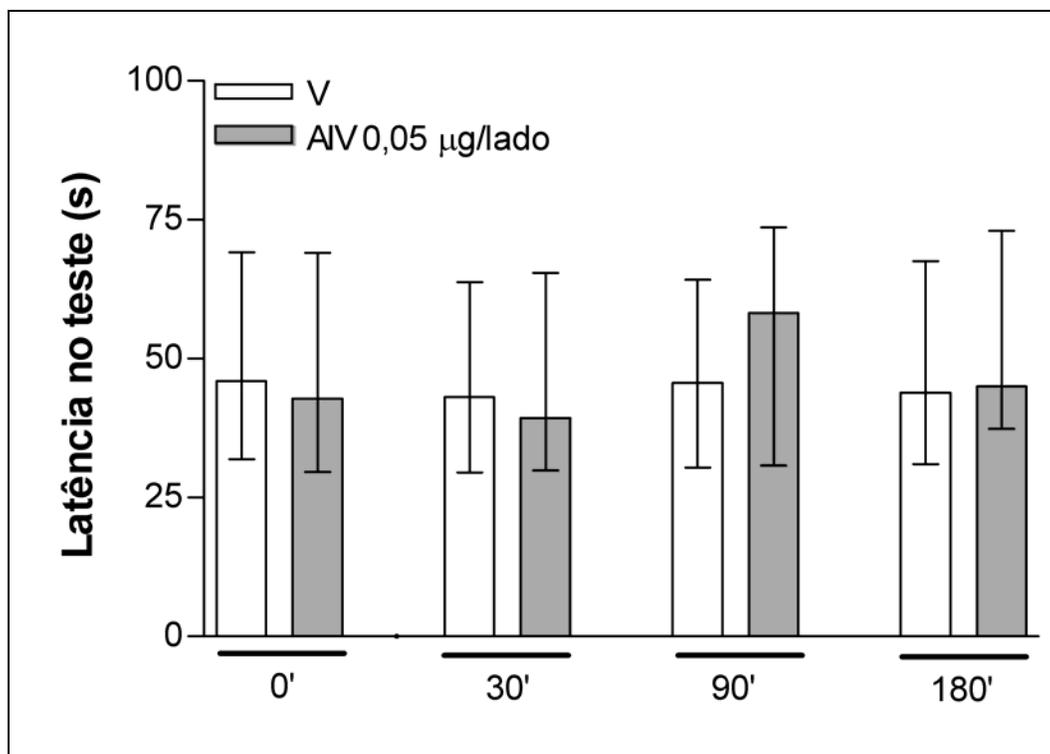
#### 4. Resultados

Para analisar os efeitos da administração de All sobre a consolidação da memória de esQUIVA inibitória nós treinamos os animais na tarefa, como descrito no capítulo anterior, e em diferentes tempos pós-treino infundimos All na região CA1 do hipocampo dorsal. Como pode ser visto na Figura 4.1, nas doses mais baixas utilizadas (0,01 e 0,05  $\mu\text{g/lado}$ ) All não provocou alterações na consolidação da LTM em nenhum dos tempos infundidos; porém, quando administrada em uma dose de 0.5  $\mu\text{g/lado}$ , teve um claro efeito amnésico ao ser infundida imediatamente (0) ou 30, mas não 90 ou 180 min após o treino.



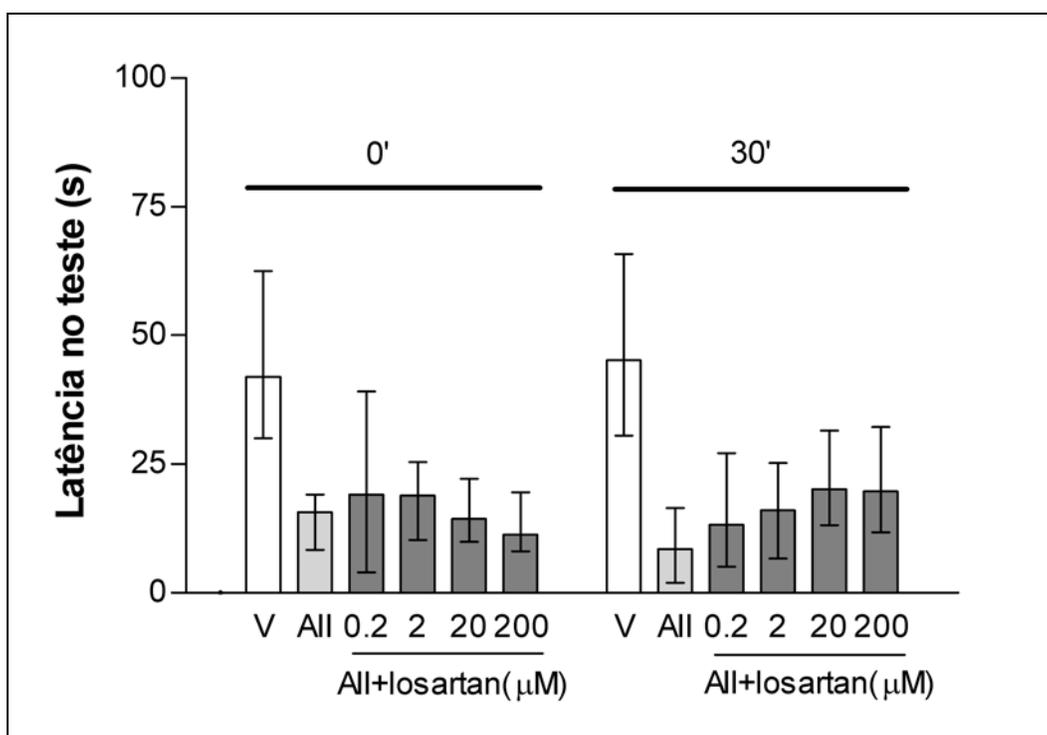
**Figura 4.1.** A infusão intra-hipocampal de angiotensina II (All) prejudica a consolidação da memória de longa duração associada à tarefa de esQUIVA inibitória – All (0,01; 0,05 ou 0,5  $\mu\text{g/lado}$ ) foi infundida na região CA1 do hipocampo dorsal, em diferentes tempos (0, 30, 90 ou 180 min) após o treino na tarefa da esQUIVA inibitória. Barras representam a mediana ( $\pm$  desvio interquartil) das latências de descida medidas numa sessão de teste realizado 24 h após o treino; n = 7-12 por grupo; \* p < 0,05 com respeito ao respectivo controle (V) no teste de Dunns após Kruskal-Wallis.

Sabe-se que All pode ser convertida em AIV por aminopeptidases endógenas (WRIGHT & HARDING, 1997). A AIV age principalmente sobre receptores AT4 pelos quais All apresenta baixa afinidade. Além disso, receptores AT4 estão presentes em grande número no hipocampo de mamíferos (ALLEN et al., 1998), uma região cerebral intimamente relacionada com a formação da memória. Para verificar se os efeitos da All descritos neste trabalho estão relacionados com sua conversão em AIV e subsequente atuação sobre receptores AT4, AIV foi infundida na região CA1 na mesma dose na qual All provocara amnésia retrógrada (0,5



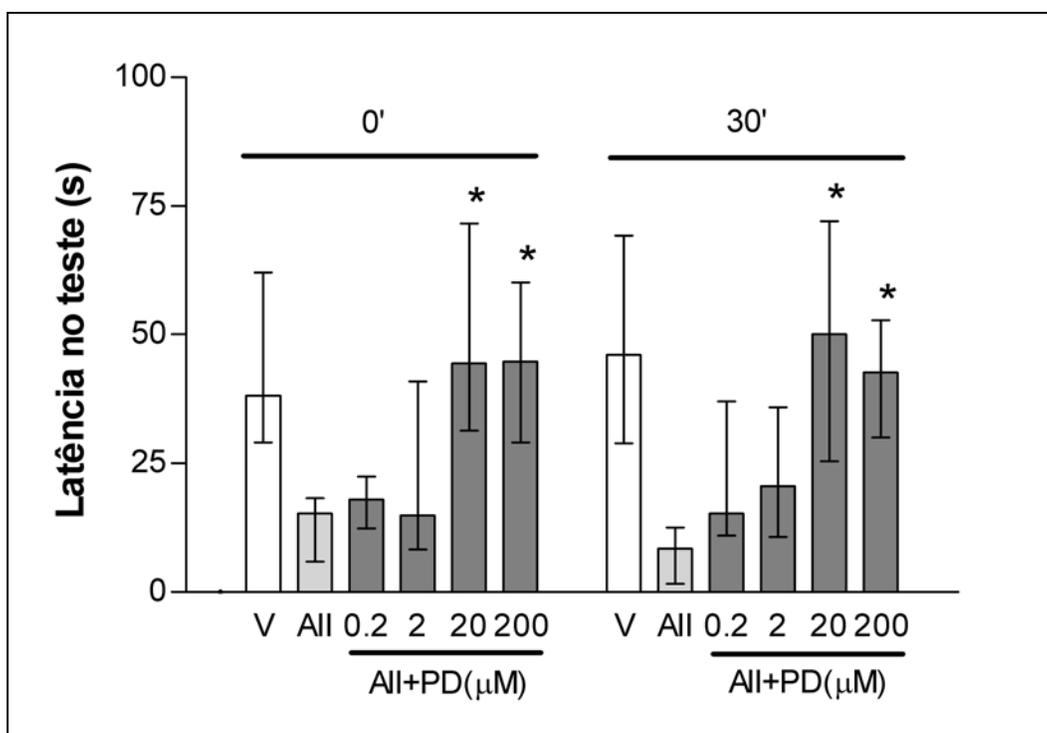
**Figura 4.2. A infusão intra-hipocampal de angiotensina IV (AIV) não tem efeito sobre a consolidação da memória associada à tarefa de esquiva inibitória** – AIV (0,5 µg/lado) foi infundida na região CA1 do hipocampo dorsal em diferentes tempos (0, 30, 90 ou 180 min) após o treino na tarefa da esquiva inibitória. Barras representam a mediana ( $\pm$  desvio interquartil) das latências de descida medidas em uma sessão de teste realizada 24 h após o treino; n = 6-15 por grupo. V=veículo.

$\mu\text{g/lado}$ ). Essa dose foi escolhida já que seria a concentração máxima de AIV que poderia ser alcançada a partir da total conversão da AII exógena. Como pode ser visto na Figura 4.2, a AIV não apresentou efeito sobre a consolidação da memória para a tarefa de esquiva inibitória em nenhum dos tempos pós-treino nos quais foi infundida. Isto indica claramente que a amnésia induzida pela administração intra-hipocampal de AII é independente da conversão desta em AIV e sugere, portanto, que este efeito deve estar relacionado com a ação do hormônio sob seus receptores de tipo AT1 ou AT2. Para avaliar a possível contribuição destes receptores no efeito amnésico da AII, infundimos na região CA1 do hipocampo



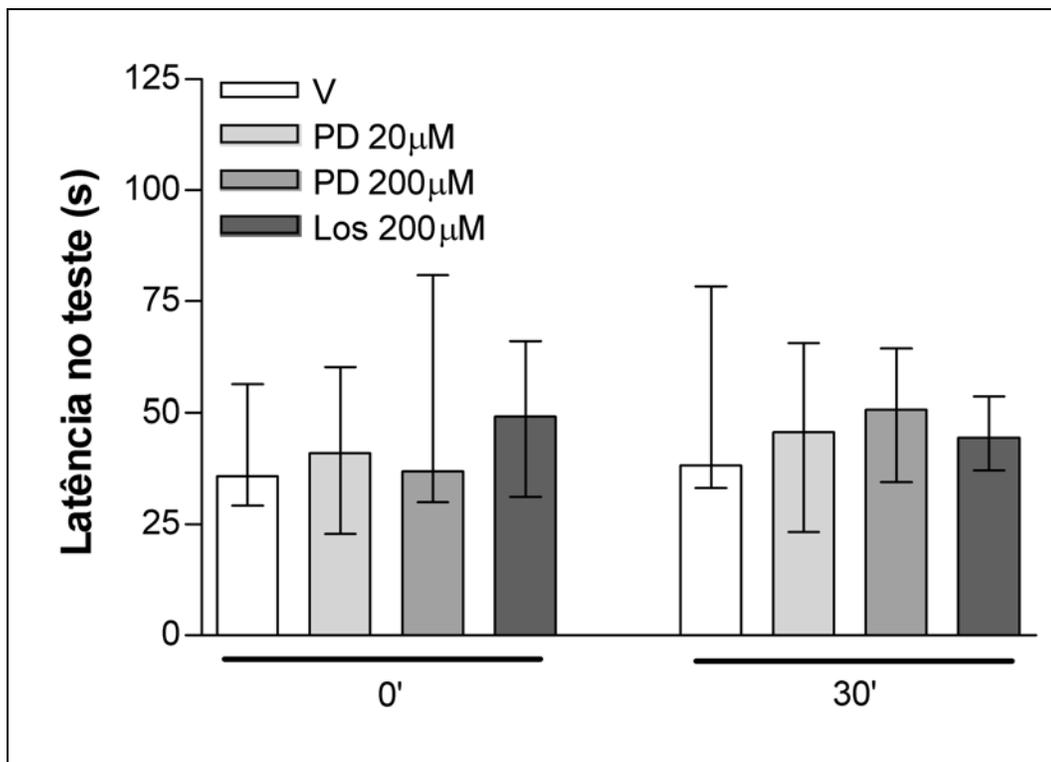
**Figura 4.3.** O efeito amnésico da infusão intra-hipocampal de angiotensina II (AII) não é bloqueado pela administração de antagonistas do receptor AT1 – Losartan (0,2; 2, 20 ou 200  $\mu\text{M}$ ) foi infundido em conjunto com AII (0.5  $\mu\text{g/lado}$ ) na região CA1 do hipocampo dorsal, imediatamente (0) ou 30 min após o treino de esquiva inibitória. Barras representam medianas ( $\pm$  desvio interquartil) das latências de descida apresentadas em uma sessão de teste realizada 24 h pós-treino. n= 7-12 por grupo. V=veículo

dorsal o peptídeo (0,5 µg/lado) juntamente com antagonistas específicos para cada subtipo de receptor, imediatamente ou 30 min após o treino na tarefa de esquila inibitória. O antagonista AT1, losartan, foi incapaz de reverter o efeito amnésico de All, mesmo quando utilizado em uma concentração de 200 µM (Figura 4.3). Por outro lado, animais treinados que receberam junto com All infusões intra-hipocampais (20 ou 200 µM) do antagonista AT2, PD123319, não apresentaram déficits de memória (Figura 4.4), o que indica que o efeito amnésico deste hormônio é mediado pela ativação de receptores AT2.



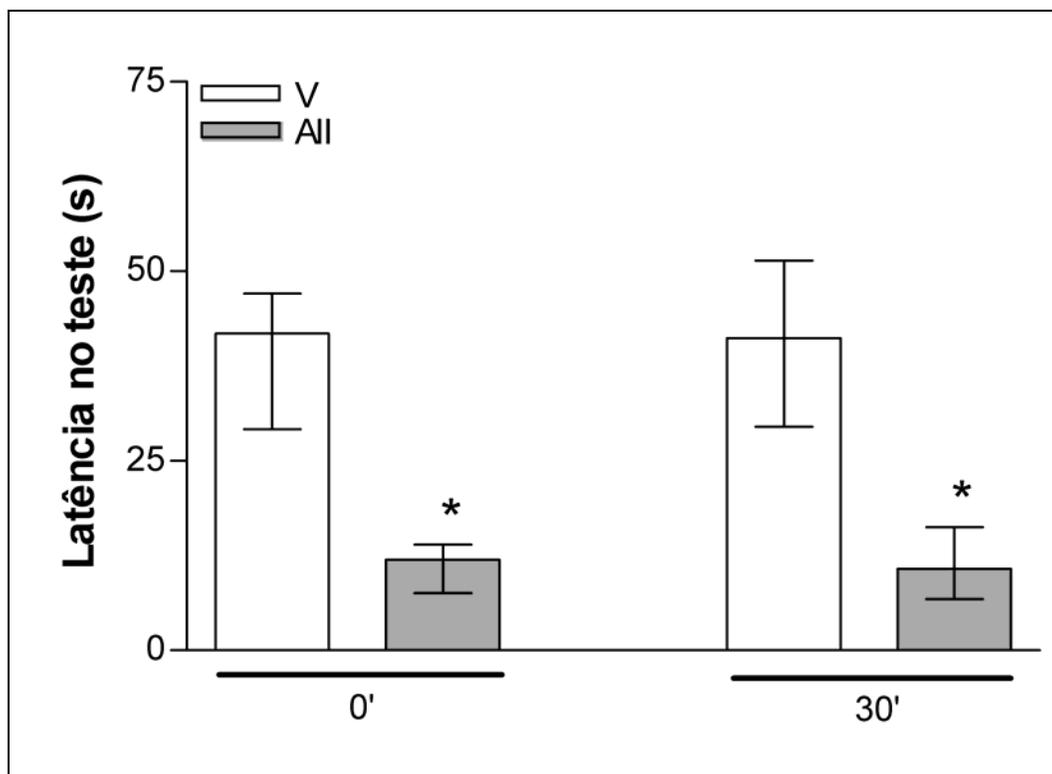
**Figura 4.4. O efeito amnésico da infusão intra-hipocampal de angiotensina II (All) é revertido pela co-administração do antagonista AT2 PD123319 (PD)**– PD (0,2; 2, 20 ou 200 µM) foi infundido juntamente com All (0.5 µg/lado) na região CA1 do hipocampo dorsal, imediatamente (0) ou 30 min após o treino de esquila inibitória. Barras representam medianas (± desvio interquartil) das latências de descida apresentadas em uma sessão de teste realizada 24 h pós-treino; n = 7-16 por grupo. \* p<0,05 com respeito ao respectivo grupo tratado com All no de teste de Dunns após Kruskal-Wallis. V=veículo.

Com o intuito de complementar os experimentos apresentados acima, bem como para analisar o papel do SRA endógeno hipocampal na consolidação de memórias, verificamos o efeito que o losartan e o PD123319 tem sob a retenção do traço mnemônico quando administrados sozinhos a distintos tempos após o treino. Tal como pode observar-se na Figura 4.5, quando infundidos na região CA1 do hipocampo dorsal imediatamente ou 30 min após o treino (tempos nos quais a administração de All produz uma amnésia retrógrada clara e dependente de AT2; ver Figura 4.4) nem o losartan (200  $\mu\text{M}$ ) nem o PD123319 (20 ou 200  $\mu\text{M}$ ) produziram efeito algum na consolidação da LTM para a tarefa sob estudo, sugerindo que a All endógena não desempenha nenhum papel central no



**Figura 4.5. A consolidação da memória associada à tarefa de esquiiva inibitória não é modulada pela angiotensina II hipocampal endógena** – Os antagonistas AT1 (losartan, Los) ou AT2 (PD123319, PD) foram infundidos na região CA1 do hipocampo dorsal, imediatamente (0) ou 30 min após o treino em uma tarefa de esquiiva inibitória. Barras representam medianas ( $\pm$  desvio interquartil) das latências de descida em uma sessão de teste realizada 24 h após o treino; n=8-11 por grupo. V=veículo.

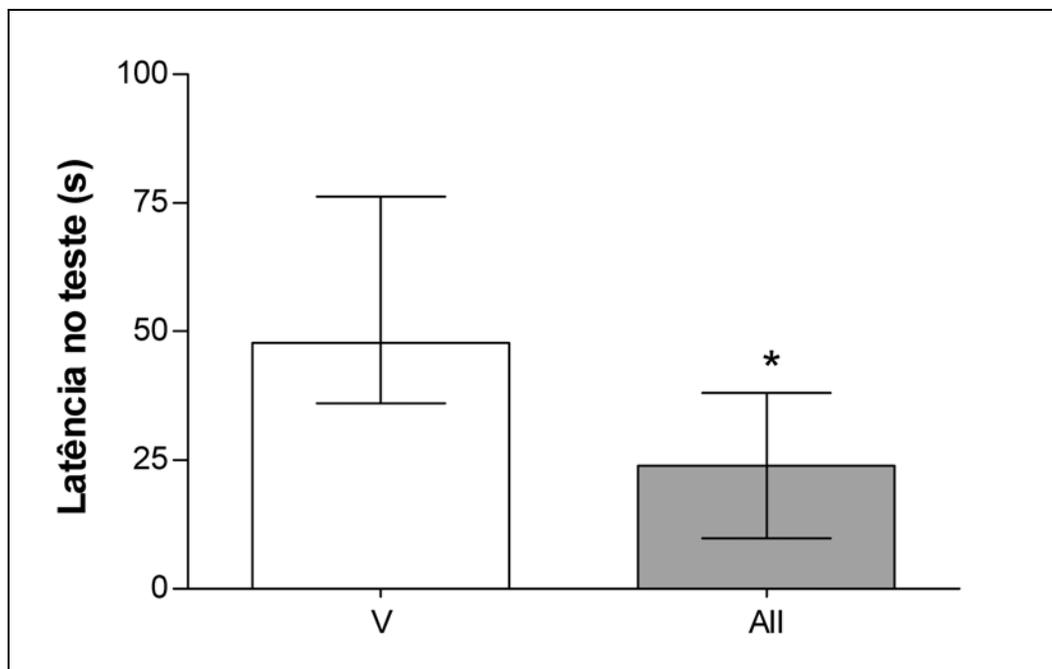
processo consolidatório, pelo menos na estrutura e nos tempos aqui estudados. Como comentado anteriormente, a LTM e a STM, apesar de compartilharem alguns mecanismos, são eventos paralelos. Para verificar se All também tem algum efeito sobre a consolidação da STM da esQUIVA inibitória, administramos All na dose que foi amnésica para LTM ( $0,5 \mu\text{g/lado}$ ) imediatamente (0) ou 30 min após o treino e testamos os animais 3 h depois da sessão comportamental. Da mesma forma que ocorreu no caso da LTM, e como pode ser observado na Figura 4.6, a All provocou um claro efeito amnésico na STM em ambos os tempos de infusão.



**Figura 4.6. A infusão intra-hipocampal de angiotensina II (All) inibe a formação da memória de curta duração associada à tarefa de esQUIVA inibitória de uma única sessão** – All ( $0,5 \mu\text{g/lado}$ ) foi infundida na região CA1 do hipocampo dorsal, imediatamente (0) ou 30 min após o treino na tarefa da esQUIVA inibitória. Barras representam a mediana ( $\pm$  desvio interquartil) das latências de descida medidas numa sessão de teste realizada 3 h após o treino;  $n = 8$  por grupo. \* $p < 0,05$  com respeito ao grupo controle (V) no teste de Mann-Whitney.

Também verificamos o efeito da All sobre a evocação da memória de esQUIVA inibitória. Para tanto, os animais foram treinados e 15 min antes de uma sessão de teste realizada 24 h após o treino, infundimos a dose efetiva de All (0,5 µg/lado) na região CA1. A Figura 4.7 mostra um claro déficit na evocação provocado pela infusão de All.

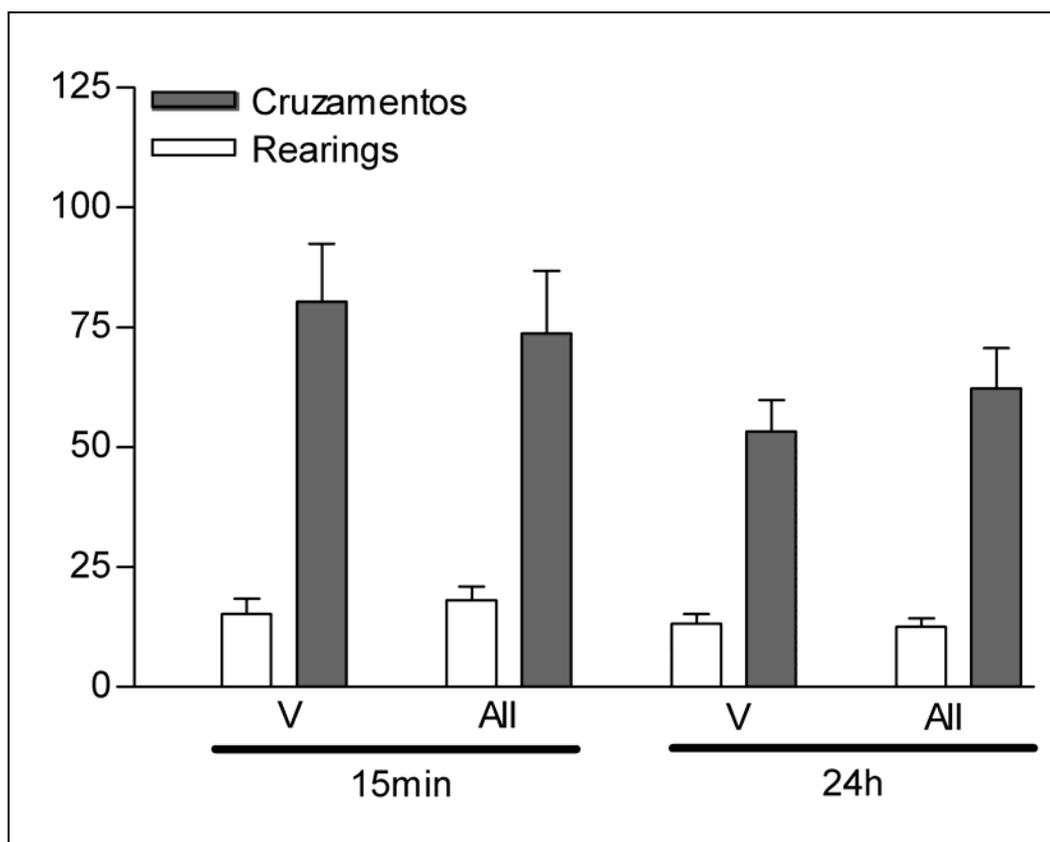
Diversos estudos sugerem que a All está relacionada com alterações no estado de ansiedade e ânimo de mamíferos (GARD, 2002). Essas alterações podem levar a mudanças nas atividades locomotora e exploratória dos animais o que possivelmente induziria uma interpretação errada dos resultados anteriores. Para avaliar se os efeitos provocados pela All aqui observados estão ou não



**Figura 4.7.** A infusão intra-hipocampal de angiotensina II (All) bloqueia a evocação da memória de longa duração associada à tarefa de esQUIVA inibitória de uma única sessão – All (0,5 µg/lado) foi infundida na região CA1 do hipocampo dorsal, 15 min antes de uma sessão de teste realizada 24 h após o treino. Barras representam a mediana ( $\pm$  desvio interquartil) das latências de descida no teste; n = 8 por grupo. \*p<0,05 com respeito ao grupo controle (V) no teste de Mann-Whitney.

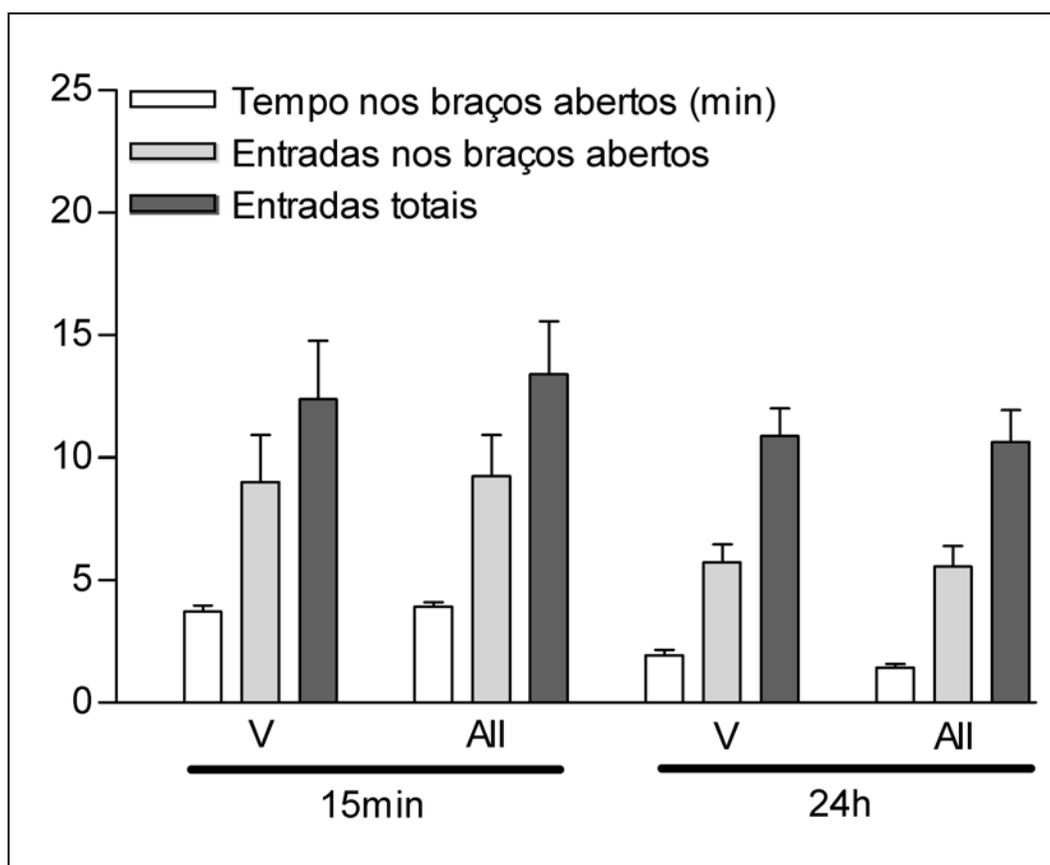
relacionados com alterações no estado de ansiedade ou ânimo dos animais, utilizamos os testes do campo aberto e do labirinto em cruz elevado. AII (0,5  $\mu\text{g/lado}$ ) infundida na região CA1 do hipocampo dorsal, 15 min ou 24 h antes de uma sessão de campo aberto não teve efeito nem sobre o número de linhas cruzadas, nem sobre a quantidade de “rearings” realizados, indicando que, quando administrada no hipocampo, a AII não exerce efeito algum nas atividades locomotora e exploratória dos animais (Figura 4.8).

Da mesma maneira, a infusão do peptídeo na região CA1, 15 min ou 24 h antes de uma sessão de labirinto em cruz elevado não alterou o número de entradas ou



**Figura 4.8.** As atividades locomotora e exploratória não são afetadas pela infusão intra-hipocampal de angiotensina II (AII) – AII (0,5  $\mu\text{g/lado}$ ) foi infundida na região CA1 do hipocampo dorsal, 15 min ou 24 h antes de uma sessão de campo aberto. Barras representam a média ( $\pm$  erro padrão) dos respectivos parâmetros indicados no gráfico;  $n = 9-24$  por grupo. V=veículo.

o tempo de permanência nos braços abertos e fechados (Figura 4.9), permitindo-nos assumir que, quando infundida no hipocampo dorsal, a AII não produz efeito algum no estado de ansiedade dos animais, pelo menos não nos tempos e dose utilizados.



**Figura 4.9.** O estado de ansiedade do animal não é alterado pela infusão intra-hipocampal de angiotensina II (AII) – AII (0,5 µg/lado) foi infundida na região CA1 do hipocampo dorsal, 15 min ou 24 h antes de uma sessão de labirinto em cruz elevado. Barras representam a média ( $\pm$  erro padrão) dos respectivos parâmetros indicados no gráfico; n = 8-16 por grupo. V=veículo.

## 5. Discussão

A modulação da memória por fatores externos ao seu processo de formação tem sido assunto de diversos estudos (IZQUIERDO et al., 2002; IZQUIERDO & GRAUDENZ, 1980; FERRY et al., 1999).

Aqui mostramos que, quando administrada na região CA1 do hipocampo dorsal imediatamente ou 30 min após o treino, mas não em tempos mais tardios, a All causa amnésia retrograda para as memórias de curta e longa duração, associadas com uma tarefa de esquiva inibitória de uma única sessão. Estes resultados sugerem que, quando infundida no hipocampo, a All dispara mecanismos intracelulares que se contrapõem àqueles necessários inicialmente para o processo de consolidação da memória.

Apesar do grande número de trabalhos sobre o assunto o papel da All no processo de aprendizagem ainda é controverso (WRIGHT & HARDING, 1997). Diversos autores têm sugerido que All melhora a aquisição de nova informação. Infusão intraventricular de All já foi descrita como tendo efeito pró-mnésico em tarefas de esquiva ativa (GEORGIEV & YONKOV, 1985), esquiva passiva ou inibitória, e reconhecimento de objetos (KULAKOWSKA, 1996). Da mesma forma, administração de All no ventrículo (BRASZKO, 2002) ou no hipocampo (BELCHEVA et al., 2000) melhorou a aquisição e evocação em alguns paradigmas de condicionamento aversivo. Entretanto, aqui mostramos um claro efeito amnésico para a infusão intra-hipocampal de All sobre a consolidação da memória da tarefa da esquiva inibitória de uma sessão. O provável efeito amnésico da All já

foi sugerido previamente. Formação da memória de esquiva inibitória foi prejudicada pela infusão de All no neocórtex (MORGAN et al., 1977) e giro dentado (LEE et al., 1995). Déficits de aprendizado também foram relacionados à infusão intra-ventricular de renina, a qual por sua vez levaria ao aumento de All no SNC (KOLLER et al., 1979; DENOBLE et al., 1991).

A hipótese do papel amnésico da infusão intra-hipocampal de All é apoiada por trabalhos envolvendo a potenciação de longa duração (LTP). A LTP é um fenômeno eletro-fisiológico, pelo qual se induz uma alteração duradoura na excitabilidade sináptica e que apresenta diversas semelhanças com o processo proposto para a formação das memórias. Dadas suas características a LTP foi considerada um possível mecanismo para a formação das memórias; servindo, até hoje, de base para o estudo destas (BLISS & COLLINGRIDGE, 1993; IZQUIERDO & MEDINA, 1997). Tratamento com All bloqueia a indução da LTP no hipocampo *in vivo* (WAYNER et al., 1993), em fatias hipocampais (ARMSTRONG et al., 1996) e em fatias do núcleo lateral da amígdala (VON BOHLEN UND HALBACH et al., 1998).

A administração de inibidores da enzima responsável pela conversão de angiotensina I em All (ECA), tem apresentado resultados pró-mnésicos tanto em roedores, quanto em humanos (COSTALL, 1989; MONDADORI & ETIENNE, 1990; RAGHAVENDRA, 2001; SUDILOVSKY, 1987 e 1988). Captopril, um inibidor da ECA bastante utilizado clinicamente e que foi utilizado em alguns dos trabalhos citados acima, atravessa a barreira hemato-encefálica em quantidade suficiente para reduzir a atividade da enzima (GEPPETTI et al., 1987). Esses dados também

parecem apontar para um efeito deletério da All sobre a memória.

Existem indícios que alguns dos efeitos relacionados com a All devem-se à sua conversão em AIV e posterior atuação desta em receptores AT4. Wright (1999), mostraram que AIV atua na formação da memória relacionada à tarefa do labirinto aquático de Morris, uma tarefa que avalia a memória espacial. AIV tem sido também relacionada com a modulação da LTP (KRAMAR et al., 2001; WAYNER et al., 2001). Além disso, receptores AT4 estão amplamente distribuídos pelo SNC de mamíferos e, particularmente, no hipocampo (ALLEN et al., 1998). Com base nessas evidências, buscamos verificar se o efeito observado para a All é devido à sua conversão em AIV. Como a infusão intra-hipocampal de AIV não provocou alterações observáveis na consolidação da memória relacionada à tarefa de esquiva inibitória, podemos sugerir que o efeito amnésico da All não é modulado por receptores AT4.

Uma vez que a ação da All não parece envolver receptores AT4, decidimos avaliar a participação dos receptores AT1 e AT2 no efeito da All na memória de esquiva inibitória. A administração do antagonista AT2 na região CA1 do hipocampo dorsal, juntamente com All, bloqueou o efeito amnésico do peptídeo, enquanto que nenhum efeito foi observado com a utilização de um antagonista AT1. Esse resultado indica que o efeito amnésico da All exógena se deve à sua ação em receptores AT2, mas não em receptores AT1.

Nakajima (1995) mostrou que a ativação de receptores AT2 antagoniza a ação de AT1 em células de musculatura lisa vascular levando entre outros efeitos a inibição de MAPK. O mesmo já foi observado em culturas de neurônios (HUANG,

1996). Ativação de MAPK tem sido mostrada como um passo importante na consolidação da memória de esquiva inibitória de uma sessão (BEVILAQUA et al., 2003; CAMMAROTA et al., 2000). Dado que o efeito amnésico resultante da infusão de All no hipocampo aparentemente se dá por sua atuação em receptores AT2 e que a ativação desses receptores leva à inibição de MAPK, uma via importante para o processo de consolidação da memória, podemos sugerir que essa inibição é um provável mecanismo para o efeito observado.

A infusão dos antagonistas específicos dos receptores AT1 ou AT2, por si só, não provocou alterações na consolidação da LTM associada à esquiva inibitória, sugerindo que a All endógena presente no hipocampo não possui um papel importante na formação da memória para essa tarefa, pelo menos não nas condições utilizadas nesse estudo. Existem trabalhos mostrando que camundongos *knock-out* para o gene do angiotensinogênio não apresentaram déficits de performance em testes de memória (OKUYAMA, 1999; WALTHER, 1999) o que dá suporte a hipótese que a All endógena não possui efeito por si só. All administrada 15 minutos antes do teste, também resultou amnésica, indicando que esta também tem um efeito deletério sobre a evocação da memória de esquiva inibitória. O funcionamento adequado de MAPK no hipocampo também é importante para a correta evocação da memória (SZAPIRO et al., 2000). Logo, é possível que o prejuízo da evocação, decorrente da infusão pré-teste de All no hipocampo, seja causada pela ativação de receptores AT2 e inibição de MAPK. Para avaliar se os efeitos observados para a All exógena na formação e evocação da memória de esquiva inibitória não se deviam a efeitos do peptídeo sobre

processos não relacionados diretamente com o armazenado de nova informação, tais como a locomoção e a ansiedade (GARD, 2002), avaliamos a performance de animais infundidos com All em testes de campo aberto e labirinto em cruz elevado. Animais infundidos com All na região CA1 do hipocampo dorsal, 15 min ou 24 h antes de uma sessão de campo aberto apresentaram resultados semelhantes ao grupo controle. Esse resultado sugere que os efeitos da infusão intra-hipocampal de All na consolidação e evocação da memória de esquia inibitória, relatados acima, não estão relacionados com alterações na atividade locomotora ou exploratória dos animais. Da mesma forma, a All não provocou alterações no comportamento dos animais, quando infundida no hipocampo, 15 min ou 24h antes da sessão de labirinto em cruz elevado. Sugerindo que os efeitos observados para a All exógena na memória não se devem a alterações no estado de ansiedade dos animais.

## 6. Conclusões

A administração na região CA1 do hipocampo dorsal de All imediatamente (0) ou 30 min após o treino, mas não 90 ou 180 min após o treino, bloqueia a consolidação das memórias de curta e de longa duração da esquiva inibitória de uma sessão. Da mesma forma, a evocação da memória dessa tarefa é prejudicada pela infusão intra-hipocampal de All 15 min pré-teste.

O efeito da All exógena no hipocampo sob a consolidação da memória de longa duração da esquiva inibitória é devido à ação do peptídeo sobre receptores AT2; aparentemente, nem a ativação de receptores AT1, nem mecanismos que levem à conversão endógena de All em AIV estão envolvidos nesse efeito.

A All hipocampal endógena, no estado fisiológico normal, não apresenta efeito sobre a consolidação da memória associada à tarefa da esquiva inibitória.

## 7. Bibliografia

ALLEN AM, MOELLER I, JENKINS TA, ZHUO J, ALDRED GP, CHAI SY, MENDELSON FA. Angiotensin receptors in the nervous system. **Brain Research Bulletin** 47 (1): 17-28, 1998.

BARROS DM, MELLO E SOUZA T, DE DAVID T, CHOI H, AGUZZOLI A, MADCHE C, ARDENGHI P, MEDINA JH, IZQUIERDO I. Simultaneous modulation of retrieval by dopaminergic D(1), beta-noradrenergic, serotonergic-1A and cholinergic muscarinic receptors in cortical structures of the rat. **Behavioural Brain Research** 124 (1): 1-7, 2001.

BELCHEVA I, TERNIANOV A, GEORGIEV V. Lateralized learning and memory effects of angiotensin II microinjected into the rat CA1 hippocampal area. **Peptides** 21 (3): 407-411, 2000.

BERNABEU R, BEVILAQUA L, ARDENGHI P, BROMBERG E, SCHMITZ P, BIANCHIN M, IZQUIERDO I, MEDINA JH. Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America** 94 (13): 7041-7046, 1997.

BEVILAQUA LR, KERR DS, MEDINA JH, IZQUIERDO I, CAMMAROTA M.

Inhibition of hippocampal Jun N-terminal kinase enhances short-term memory but blocks long-term memory formation and retrieval of an inhibitory avoidance task. **European Journal of Neuroscience** **17** (4): 897-902, 2003a.

BEVILAQUA LR, ROSSATO JI, MEDINA JH, IZQUIERDO I, CAMMAROTA M.

Src kinase activity is required for avoidance memory formation and recall. **Behavioural Pharmacology** **14** (8): 649-652, 2003b.

BIANCHIN M, DA SILVA RC, SCHMITZ PK, MEDINA JH, IZQUIERDO I. Memory

of inhibitory avoidance in the rat is regulated by glutamate metabotropic receptors in the hippocampus. **Behavioural Pharmacology** **5** (3): 356-359, 1994.

BLISS TV, COLLINGRIDGE GL. A synaptic model of memory: long-term

potentiation in the hippocampus. **Nature** **361** (6407): 31-39, 1993.

BONINI JS, RODRIGUES L, KERR DS, BEVILAQUA LR, CAMMAROTA M,

IZQUIERDO I. AMPA/kainate and group-I metabotropic receptor antagonists infused into different brain areas impair memory formation of inhibitory avoidance in rats. **Behavioural Pharmacology** **14** (2): 161-166, 2003.

BRASZKO JJ. AT(2) but not AT(1) receptor antagonism abolishes angiotensin II increase of the acquisition of conditioned avoidance responses in rats.

**Behavioural Brain Research 131** (1-2): 79-86, 2002.

CAHILL L, MCGAUGH JL. Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. **Trends in Neurosciences 21** (7): 294-299, 1998.

CAMMAROTA M, BEVILAQUA LR, ARDENGHI P, PARATCHA G, LEVI DE STEIN M, IZQUIERDO I, MEDINA JH. Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade. **Molecular Brain Research 76** (1): 36-46, 2000.

CAMMAROTA M, BEVILAQUA LR, VIOLA H, KERR DS, REICHMANN B, TEIXEIRA V, BULLA M, IZQUIERDO I, MEDINA JH. Participation of CaMKII in neuronal plasticity and memory formation. **Cellular and Molecular Neurobiology 22** (3): 259-267, 2002.

CAMMAROTA M, BEVILAQUA LR, KERR D, MEDINA JH, IZQUIERDO I. Inhibition of mRNA and protein synthesis in the CA1 region of the dorsal hippocampus blocks reinstatement of an extinguished conditioned fear response. **Journal of Neuroscience 23** (3): 737-41, 2003.

CAREW TJ. Molecular enhancement of memory formation. **Neuron** **16** (1): 5-8, 1996.

COSTALL B, COUGHLAN J, HOROVITZ ZP, KELLY ME, NAYLOR RJ, TOMKINS DM. The effects of ACE inhibitors captopril and SQ29,852 in rodent tests of cognition. **Pharmacology, Biochemistry and Behaviour** **33** (3): 573-579, 1989.

DENOBLE VJ, DENOBLE KF, SPENCER KR, CHIU AT, WONG PC, TIMMERMANS PB. Non-peptide angiotensin II receptor antagonist and angiotensin-converting enzyme inhibitor: effect on a renin-induced deficit of a passive avoidance response in rats. **Brain Research** **561** (2): 230-235, 1991.

DZAU, V. Renin-angiotensin system. **The heart and cardiovascular system**. Raven Press, New York: 1817-1850, 1991.

ENGLISH JD, SWEATT JD. A requirement for the mitogen-activated protein kinase cascade in hippocampal long term potentiation. **Journal of Biological Chemistry** **272** (31): 19103-19106, 1997.

FERRY B, ROOZENDAAL B, MCGAUGH JL. Role of norepinephrine in mediating stress hormone regulation of long-term memory storage: a critical involvement of the amygdala. **Biological Psychiatry** **46** (9): 1140-1152, 1999.

GARD PR. The role of angiotensin II in cognition and behaviour. **European Journal of Pharmacology** 438 (1-2): 1-14, 2002.

GEORGIEV V, YONKOV D. Participation of angiotensin II in learning and memory. I. Interaction of angiotensin II with saralasin. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology** 7 (8): 415-418, 1985.

GEPPETTI P, SPILLANTINI MG, FRILLI S, PIETRINI U, FANCIULLACCI M, SICUTERI F. Acute oral captopril inhibits angiotensin converting enzyme activity in human cerebrospinal fluid. **Journal of Hypertension** 5 (2): 151-154, 1987.

HARDING JW, SULLIVAN MJ, HANESWORTH JM, CUSHING LL, WRIGHT JW. Inability of [<sup>125</sup>I]Sar<sup>1</sup>, Ile<sup>8</sup>-angiotensin II to move between the blood and cerebrospinal fluid compartments. **Journal of Neurochemistry** 50 (2): 554-557, 1988.

HUANG XC, RICHARDS EM, SUMNERS C. Mitogen-activated protein kinases in rat brain neuronal cultures are activated by angiotensin II type 1 receptors and inhibited by angiotensin II type 2 receptors. **Journal of Biological Chemistry** 271 (26): 15635-15641, 1996.

IZQUIERDO I, GRAUDENZ M. Memory facilitation by naloxone is due to release of dopaminergic and beta-adrenergic systems from tonic inhibition. *Psychopharmacology (Berl)* 67 (3): 265-268, 1980.

IZQUIERDO I, MEDINA JH. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. ***Neurobiology of Learning and Memory*** 68 (3): 285-316, 1997.

IZQUIERDO I, MEDINA JH, IZQUIERDO LA, BARROS DM, DE SOUZA MM, MELLO E SOUZA T. Short- and long-term memory are differentially regulated by monoaminergic systems in the rat brain. ***Neurobiology of Learning and Memory*** 69 (3): 219-224, 1998a.

IZQUIERDO I, BARROS DM, MELLO E SOUZA T, DE SOUZA MM, IZQUIERDO LA, MEDINA JH. Mechanisms for memory types differ. ***Nature*** 393 (6686): 635-636, 1998b.

IZQUIERDO I, MEDINA JH, VIANNA MR, IZQUIERDO LA, BARROS DM. Separate mechanisms for short- and long-term memory. ***Behavioural Brain Research*** 103 (1): 1-11, 1999.

IZQUIERDO I, MCGAUGH JL. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. **Behavioural Pharmacology** 11 (7-8): 517-534, 2000.

IZQUIERDO LA, BARROS DM, MEDINA JH, IZQUIERDO I. Stress hormones enhance retrieval of fear conditioning acquired either one day or many months before. **Behavioural Pharmacology** 13 (3): 203-213, 2002.

JERUSALINSKY D, FERREIRA MB, WALZ R, DA SILVA RC, BIANCHIN M, RUSCHEL AC, ZANATTA MS, MEDINA JH, IZQUIERDO I. Amnesia by post-training infusion of glutamate receptor antagonists into the amygdala, hippocampus, and entorhinal cortex. **Behavioural and Neural Biology** 58 (1): 76-80, 1992.

KANDEL, ER. KUPFERMANN, I., IVERSEN, S. Learning and Memory. **Principles of Neural Science**, 4<sup>a</sup> ed. McGraw Hill, New York, 2000.

KOLLER M, KRAUSE HP, HOFFMEISTER F, GANTEN D. Endogenous brain angiotensin II disrupts passive avoidance behavior in rats. **Neuroscience Letters** 14 (1): 71-75, 1979.

KRAMAR EA, ARMSTRONG DL, IKEDA S, WAYNER MJ, HARDING JW, WRIGHT JW. The effects of angiotensin IV analogs on long-term potentiation

within the CA1 region of the hippocampus in vitro. **Brain Research** **897** (1-2): 114-121, 2001.

KULAKOWSKA A, KARWOWSKA W, WISNIEWSKI K, BRASZKO JJ. Losartan influences behavioural effects of angiotensin II in rats. **Pharmacological Research** **34** (3-4): 109-115, 1996.

LEE EH, MA YL, WAYNER MJ, ARMSTRONG DL. Impaired retention by angiotensin II mediated by the AT1 receptor. **Peptides** **16** (6): 1069-1071, 1995.

MONDADORI C, ETIENNE P. Nootropic effects of ACE inhibitors in mice. **Psychopharmacology (Berl)** **100** (3): 301-307, 1990.

MORGAN JM, ROUTTENBERG A. Angiotensin injected into the neostriatum after learning disrupts retention performance. **Science** **196** (4285): 87-89, 1977.

NAKAJIMA M, HUTCHINSON HG, FUJINAGA M, HAYASHIDA W, MORISHITA R, ZHANG L, HORIUCHI M, PRATT RE, DZAU VJ. The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain-of-function study using gene transfer. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America** **92** (23): 10663-10667, 1995.

OKUYAMA S, SAKAGAWA T, SUGIYAMA F, FUKAMIZU A, MURAKAMI K.

Reduction of depressive-like behavior in mice lacking angiotensinogen.

**Neuroscience Letters** **261** (3): 167-170, 1999.

PARE D. Role of the basolateral amygdala in memory consolidation. **Progress in**

**Neurobiology** **70** (5): 409-420, 2003.

PAVLOV IP. **Conditioned reflexes**. Dover: New York. 1926.

PAXINOS, G. AND WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 2<sup>nd</sup>

ed. Academic Press, San Diego, 1986.

PHILLIPS MI, SUMNERS C. Angiotensin II in central nervous system physiology.

**Regulatory Peptides** **78** (1-3): 1-11, 1998.

RAGHAVENDRA V, CHOPRA K, KULKARNI SK. Brain renin angiotensin system

(RAS) in stress-induced analgesia and impaired retention. **Peptides** **20** (3):

335-342, 1999.

RAGHAVENDRA V, CHOPRA K, KULKARNI SK. Comparative studies on the

memory-enhancing actions of captopril and losartan in mice using inhibitory

shock avoidance paradigm. **Neuropeptides** **35** (1): 65-69, 2001.

SETLOW B, MCGAUGH JL. D2 dopamine receptor blockade immediately post-training enhances retention in hidden and visible platform versions of the water maze. **Learning and Memory** 7 (3): 187-191, 2000.

SIRETT NE, BRAY JJ, HUBBARD JI. Localization of immunoreactive angiotensin II in the hippocampus and striatum of rat brain. **Brain Research** 217 (2): 405-411, 1981.

SQUIRE LR, ZOLA-MORGAN S. The medial temporal lobe memory system. **Science** 253 (5026):1380-1386, 1991.

SQUIRE LR. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. **Psychological Review** 99 (2): 195-231, 1992.

SQUIRE LR, ZOLA SM. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America** 93 (24): 13515-13522, 1996.

SUDILOVSKY A, TURNBULL B, CROOG SH, CROOK T. Angiotensin converting enzyme and memory: preclinical and clinical data. **International Journal of Neurology** 21-22: 145-162, 1987-88.

SZAPIRO G, IZQUIERDO LA, ALONSO M, BARROS D, PARATCHA G, ARDENGHI P, PEREIRA P, MEDINA JH, IZQUIERDO I. Participation of hippocampal metabotropic glutamate receptors, protein kinase A and mitogen-activated protein kinases in memory retrieval. **Neuroscience** **99** (1): 1-5, 2000.

VIANNA MR, BARROS DM, SILVA T, CHOI H, MADCHE C, RODRIGUES C, MEDINA JH, IZQUIERDO I. Pharmacological demonstration of the differential involvement of protein kinase C isoforms in short- and long-term memory formation and retrieval of one-trial avoidance in rats. **Psychopharmacology** **150** (1): 77-84, 2000.

WALTHER T, VOIGT JP, FUKAMIZU A, FINK H, BADER M. Learning and anxiety in angiotensin-deficient mice. **Behavioural Brain Research** **100** (1-2): 1-4, 1999.

WAYNER MJ, ARMSTRONG DL, PHELIX CF, WRIGHT JW, HARDING JW. Angiotensin IV enhances LTP in rat dentate gyrus in vivo. **Peptides** **22** (9): 1403-1414, 2001.

WRIGHT JW, MORSETH SL, ABHOLD RH, HARDING JW. Pressor action and dipsogenicity induced by angiotensin II and III in rats. **American Journal of Physiology** **249** (5 Pt 2): R514-R521, 1985.

WRIGHT JW, KREBS LT, STOBBS JW, HARDING JW. The angiotensin IV system: functional implications. **Frontiers in Neuroendocrinology** **16** (1): 23-52, 1995.

WRIGHT JW, HARDING JW. Important role for angiotensin III and IV in the brain renin-angiotensin system. **Brain Research Reviews** **25** (1): 96-124, 1997.