

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências

**Efeitos da Ocitocina sistêmica sobre
memórias aversivas em Ratos:
mediação periférica por glicocorticóides e
integração central por receptores muscarínicos M4**

Lucas Fürstenau de Oliveira

Orientador:

Prof. Dr. Jorge Alberto Quillfeldt

Co-orientadora:

Profa. Dra. Angélica Rosat Consiglio

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Neurociências como pré-requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor

Porto Alegre, 2005

Agradecimentos

Queria agradecer:

ao Jorge, por tantos anos de apoio;
à Angélica, por ter sugerido o experimento que deu origem à série;
aos colegas de laboratório, que tanto ajudaram, em especial Clarissa e Felipe, que fizeram uns 95% dos experimentos comigo;
à D. Zelma, por cuidar de nossos ratinhos;
aos próprios ratinhos, involuntariamente usados em nossa pesquisa;
ao PPG Neuro, pela excelente formação que dá a seus alunos
à UFRGS, pela educação de qualidade que me proporcionou.

Índice

1. Introdução	1
1.1 Ocitocina	1
1.1.1 Receptores de ocitocina	3
1.2 Memória	4
1.2.1 Tipos de memória	4
1.2.1.1 Memória Declarativa x Memória Não-Declarativa	4
1.2.1.2 Memória de Longa Duração x Memória de Curta Duração	4
1.2.2 Fases da memória	5
1.2.3 Mecanismos de consolidação	6
1.2.4 Abordagens metodológicas para o estudo da memória	7
1.2.5 Estruturas encefálicas envolvidas na memória explícita	9
1.3 Modulação ocitocinérgica da consolidação da memória	10
1.3.1 Ocitocina intracerebral	10
1.3.2 Ocitocina sistêmica	11
1.4 Modulação colinérgica da consolidação da memória	12
1.5 Modulação adrenérgica e glicocorticóide da consolidação da memória	12
1.6 Modulação ocitocinérgica da evocação da memória	13
1.7 Modulação colinérgica da evocação da memória	14
1.8 Modulação adrenérgica e glicocorticóide da evocação da memória	14
2. Objetivos	16
3. Material e Métodos	17
3.1 Animais	17
3.2 Anestesia	17
3.3 Cirurgia estereotáxica	17
3.4 Tarefas comportamentais	18
3.4.1 Esquiva inibitória	18
3.4.2 Labirinto aquático de Morris	19
3.4.3 Habituação ao campo aberto	19
3.4.4 Labirinto em cruz elevado	20
3.5 Administração da droga	20
3.6 Verificação da posição das cânulas	21
3.7 Análise estatística	22
3.8 Drogas	22
3.9 Experimentos realizados	23
3.9.1 Esquiva inibitória	23
3.9.2 Labirinto aquático de Morris	23
3.9.3 Habituação ao campo aberto	24
3.9.4 Esquiva inibitória com infusão de ocitocina e mais outra droga	24
3.9.5 Labirinto em cruz elevado	24
4. Resultados	25

4.1 Experimentos relativos ao objetivo 1	25
4.1.1 Ocitocina em quatro doses i.p. pós-treino na esquiiva inibitória (choque de 0,25 mA) com ratos machos	25
4.1.2 Ocitocina em quatro doses i.p. pós-treino na esquiiva inibitória (choque de 0,5 mA) com ratos machos	26
4.1.3 Ocitocina em duas doses i.p. pós-treino na esquiiva inibitória (choque de 0,7 mA) com ratos machos	27
4.2 Experimentos relativos ao objetivo 2	28
4.2.1 Ocitocina em quatro doses i.p. pré-teste na esquiiva inibitória (choque de 0,25 mA) com ratos machos	28
4.2.2 Ocitocina em quatro doses i.p. pré-teste na esquiiva inibitória (choque de 0,5 mA) com ratos machos	29
4.3 Experimento relativo ao objetivo 3	31
4.3.1 Ocitocina em quatro doses i.p. pós-treino na esquiiva inibitória (choque de 0,5 mA) com ratas fêmeas	31
4.4 Experimentos relativos ao objetivo 4	33
4.4.1 Ocitocina em duas doses i.p. pré-teste na esquiiva inibitória (choque de 0,5 mA) com ratas fêmeas	33
4.4.2 Ocitocina em duas doses i.p. pré-teste na esquiiva inibitória (choque de 0,7 mA) com ratas fêmeas	34
4.5 Experimentos relativos ao objetivo 5	35
4.5.1 Ocitocina i.p. 30 minutos no labirinto aquático de Morris com ratos machos	35
4.5.2 Ocitocina em duas doses i.p. pré-teste na habituação ao campo aberto com ratos machos	37
4.6 Experimentos relativos ao objetivo 6	38
4.6.1 Ocitocina em quatro doses i.p. pré-teste no labirinto em cruz elevado com ratos machos	38
4.6.2 Ocitocina em quatro doses i.p. pré-teste no labirinto em cruz elevado com ratas fêmeas	39
4.7 Experimentos relativos ao objetivo 7	40
4.7.1 Ocitocina i.p. e escopolamina intra-hipocampal pré-teste na esquiiva inibitória com ratos machos	40
4.7.2 Ocitocina i.p. e MT3 intra-hipocampal pré-teste na esquiiva inibitória com ratos machos	42
4.8 Experimento relativo ao objetivo 8	43
4.8.1 Ocitocina e dexametasona i.p. pré-teste na esquiiva inibitória com ratos machos	43
4.9 Experimento relativo ao objetivo 9	45
4.9.1 Ocitocina i.p. e timolol intra-hipocampal pré-teste na esquiiva inibitória com ratos machos	45
4.10 Interpretação dos resultados	47
5. Discussão	49
5.1 O papel da ocitocina na consolidação e na evocação da memória em ratos machos	49
5.2 O papel da ocitocina na consolidação e na evocação da memória em ratas fêmeas	50
5.3 O papel da ocitocina na evocação da memória na tarefa do labirinto aquático de Morris e na habituação ao campo aberto em ratos machos	52
5.4 Efeitos da ocitocina na tarefa do labirinto em cruz elevado	53

5.5 O papel da ocitocina e a modulação colinérgica central da evocação da memória	54
5.6 Ocitocina, glicocorticóides e memória	57
5.7 O papel da ocitocina e a modulação adrenérgica central da evocação da memória	59
5.8 Uma possível arquitetura da circuitaria mediadora dos efeitos da OT periférica	60
5.9 Resumo e considerações finais	62
6. Conclusões	63
7. Referências Bibliográficas	64

Resumo

A ocitocina (OT) é um hormônio peptídico cujas funções clássicas incluem a contração uterina durante o parto e o reflexo de liberação do leite. Trabalhos recentes identificaram a participação da OT em outros processos, como no reconhecimento social, no comportamento maternal e na memória. O objetivo desta tese é identificar com maior precisão os efeitos da administração sistêmica de OT sobre os processos de consolidação e evocação da memória, em especial na tarefa de esquivar inibitória (EI), bem como mapear os mecanismos neurofisiológicos através dos quais a OT sistêmica exerce seus efeitos sobre o sistema nervoso central no processo de evocação da memória. A fim de estudar os efeitos da OT sobre a memória, ratos Wistar machos e fêmeas foram treinados na EI e receberam, imediatamente pós-treino ou 30 minutos pré-teste, ocitocina i.p. ou seu veículo (solução salina). A OT não apresentou efeitos sobre os ratos machos que a receberam imediatamente pós-treino, mas apresentou efeito amnésico sobre os outros três grupos - machos com OT pré-teste, fêmeas com OT pós-treino ou pré-teste. Uma vez que a OT tem conhecidos efeitos ansiolíticos, a tarefa do labirinto em cruz elevado foi utilizada para demonstrar que o efeito amnésico encontrados nesses três grupos não tem relação com os níveis de ansiedade, pois a dose consistentemente amnésica de OT não foi ansiolítica. Nas outras duas tarefas testadas, com caráter menos aversivo e mais espacial que a EI, o labirinto aquático e a habituação ao campo aberto, a OT não apresentou qualquer efeito sobre os ratos machos nelas treinados. Para investigar os mecanismos através dos quais a OT exerce seus efeitos sobre a evocação da memória, ratos Wistar machos receberam, 30 minutos pré-teste, administrações concomitantes de ocitocina i.p. (ou seu veículo, salina) e de 1) escopolamina (antagonista colinérgico não-seletivo) intra-hipocampal, ou 2) MT3 (antagonista colinérgico seletivo para M4) intra-hipocampal, ou 3) timolol (antagonista beta-adrenérgico) intra-hipocampal, ou 4) dexametasona (glicocorticóide sintético) i.p., ou ainda de veículo, tampão fosfato-salina para administração hipocampal ou salina para administração i.p.. Em todos estes experimentos, o efeito amnésico da OT sobre a evocação foi revertido por uma dose sem efeito próprio da outra droga. Estes resultados indicam que os efeitos amnésicos da ocitocina sobre a evocação da memória na tarefa da esquivar inibitória envolvem a participação dos sistemas colinérgico e adrenérgico no hipocampo e também dos glicocorticóides circulantes.

Abstract

Oxytocin (OT) is a peptide hormone whose classic functions include uterine contraction during labor and the milk let-down reflex. Recent work have identified OT's role on other processes, such as social recognition, maternal behavior and memory. The objective of this thesis is to identify in greater detail the effects of a systemic administration of OT upon the memory consolidation and retrieval processes, especially on the Inhibitory Avoidance task (IA), and also to map the neurophysiological mechanisms through which systemic OT exerts its effects on the central nervous system on the memory retrieval process. In order to study OT's effects on memory, Wistar male and female rats were trained on the IA task and received, either immediately post-training or 30 minutes pre-test, an i.p. infusion of OT or its vehicle (saline). OT had no effect on male rats which received it immediately post-training, but had amnesic effects on the other three groups – male rats with pre-test OT, female rats with post-training or pre-test OT. Since OT is known for its anxiolytic effects, the elevated plus maze task was used to demonstrate that OT's amnesic effects in these three groups had no relation to anxiety levels, for the consistently amnesic OT dose was not anxiolytic. On the two other tested tasks, the less aversive, more spatial Morris water maze and open field habituation, OT presented no effects on male rats. To investigate the mechanisms through which OT exerts its effects upon the memory retrieval process, Wistar male rats received, 30 minutes pre-test, simultaneous administrations of i.p. OT (or its vehicle, saline) and 1) intra-hipocampal scopolamine (a non-selective cholinergic antagonist), or 2) intra-hipocampal MT3 (an M4-selective cholinergic antagonist), or 3) intra-hipocampal timolol (a beta-adrenergic antagonist), or i.p. dexamethasone (a synthetic glucocorticoid), or their vehicles, phosphate buffer-saline for intra-hipocampal administration or saline for i.p. administration. In all these experiments, OT's amnesic effects upon memory retrieval were reversed with a sub-effective dose of the other drug. These results indicate that oxytocin amnesic effects upon memory retrieval on the inhibitory avoidance task involve cholinergic and adrenergic systems on the hippocampus and also glucocorticoids on the periphery.

Índice de abreviaturas

Aco - Acetilcolina
ACTH - hormônio adrenocorticotrófico
AMPA - ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazola propiônico
AOT – d(CH₂)₅Tyr(Me)-Orn₈-vasotocina
AP – coordenada estereotáxica ântero-posterior
CaMKII – cálcio-calmodulina cinase II
CNQX - 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona
DPAT - (+/-)2-dipropil-amino-8-hidroxil-1,2,3,4-tetrahidronaphaleno
DV – coordenada estereotáxica dorso-ventral
EI – esquiva inibitória
GABA – ácido gama-amino butírico
GC – glicocorticóide
Glu - glutamato
GR – receptor glicocorticóide
i.p. – intra-peritoneal
IP3 – inositol trisfosfato
LC – locus coeruleus
LCE – labirinto em cruz elevado
LL – coordenada estereotáxica látero-lateral
MT3 – toxina muscarínica 3
NA - noradrenalina
NAN – NAN-190, antagonista 5-HT_{1a}
NMDA – N-metil-d-aspartato
NTS – núcleo do trato solitário
OT – ocitocina
OTR – receptor da ocitocina
PIP2 – fosfatidil inositol-4,5-bisfosfato
PKA – proteína-cinase AMPc dependente
PKC – proteína-cinase cálcio-dependente
PVN – núcleo paraventricular
SNC – sistema nervoso central
SON – núcleo supra-óptico
SPT – septo medial

Cuida bem das tuas memórias. Não tens como vivê-las mais uma vez – Bob Dylan

1. Introdução

O tema desta tese são aspectos da capacidade de formação de novas memórias e de evocação de memórias já estabelecidas e o papel do hormônio ocitocina nesses processos. Para permitir uma adequada compreensão do tema, faremos uma pequena revisão sobre o que é memória, seus vários tipos, os mecanismos envolvidos na sua formação e evocação, e a relação da ocitocina com estes processos, assim como algumas das formas de se estudar experimentalmente estes mecanismos.

1.1 Ocitocina

A ocitocina (OT) é um hormônio nonapeptídico (H-Cys-Tyr-Ile-Glu-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH₂) encontrado em todas as classes de vertebrados (Hoyle, 1999). É sintetizada em neurônios magnocelulares dos núcleos paraventricular (PVN) e supra-óptico (SON) do hipotálamo e liberada na circulação a partir da neuro-hipófise. É sintetizada também em neurônios parvocelulares do PVN, que se projetam para várias partes do encéfalo (Mantella *et al.*, 2003).

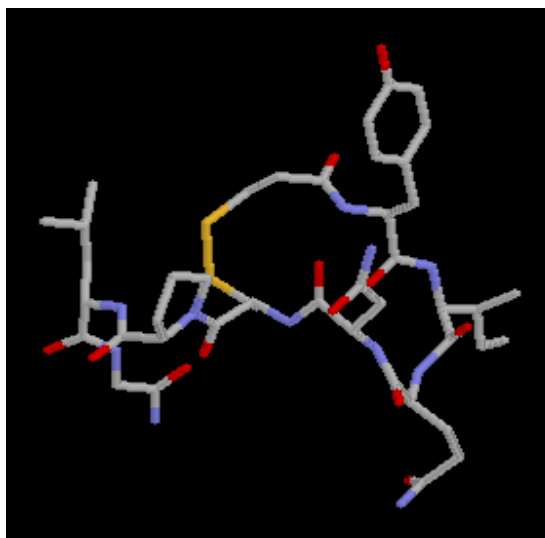


Figura 1: estrutura tridimensional da ocitocina

Os papéis fisiológicos mais conhecidos da ocitocina plasmática são a promoção da contração uterina durante o trabalho de parto e o reflexo de ejeção do leite durante a amamentação (Fuchs, 1988). Por outro lado, a ocitocina liberada no SNC está envolvida nos processos de reconhecimento social (Carter, 1998, Bales *et al.*, 2004, Ferguson *et al.*, 2001), comportamento maternal (Bartels e Zeki, 2004, Consiglio e Lucion, 1996, Giovenardi *et al.*, 1997), afetividade (Young e Wang, 2004), lordose (Arletti e Bertolini, 1985). Além disso, a ocitocina é capaz de influenciar a resposta ao estresse reduzindo a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e a ansiedade (Windle *et al.*, 1997, Neumann *et al.*, 2000, Scantamburlo *et al.*, 2001, Mantella *et al.*, 2004). Em humanos, a OT parece estar envolvida nos processos afetivos, incluindo a resistência ao estresse proporcionada pela interação social (Taylor *et al.*, 2000), e algumas psicopatologias, como o autismo (Insel *et al.*, 1999).

É importante observar que a ocitocina produzida pelos neurônios magnocelulares e liberada via neuro-hipófise não é capaz de influenciar diretamente o sistema nervoso central, uma vez que ela cruza a barreira hematoencefálica muito pobremente (Kang e Park, 2000). Dessa maneira, os efeitos da ocitocina liberada no SNC estão desvinculados de seus efeitos periféricos, e qualquer efeito da ocitocina circulante sobre o SNC deve, necessariamente, se dar de maneira indireta (Porges, 2001, Gibbs, 1986).

1.1.1 Receptores de ocitocina

O receptor de ocitocina (OTR) pertence à família dos receptores hetero-triméricos ligados à proteína G e é encontrado em vários tipos de células, incluindo neurônios, células ósseas, mioblastos, cardiomiócitos e células endoteliais (Gimpl e Fahrenholz, 2001, Zingg e Laporte, 2003). Ele pode estar associado tanto a proteínas G do tipo $G_{q/11}$ como a proteínas G_i , e seus efeitos intracelulares dependem do tipo de acoplamento (Wettschureck *et al.*, 2004, Reversi *et al.*, 2005).

Receptores associados a proteína $G_{q/11}$ promovem a ativação de uma fosfolipase C capaz de quebrar o fosfatidil inositol-4,5-bisfosfato (PIP_2) em inositol trisfosfato (IP_3) e diacilglicerol, que, por sua vez, medeiam uma série de efeitos intra-celulares, incluindo a liberação de cálcio de estoques no retículo endoplasmático (Alberts *et al.*, 1994). Por outro lado, os receptores associados a proteína G_i promovem a inibição da enzima adenilato-ciclase, com a consequente redução dos níveis intracelulares de AMP cíclico, a abertura de canais de potássio e o fechamento de canais de cálcio. Deste modo, receptores associados a G_i têm um caráter inibitório (Alberts *et al.*, 1994).

Ou seja, os efeitos intracelulares da ocitocina podem ser bem variados dependendo da proteína G com a qual seus receptores estão associados em um determinado tipo celular (Reversi *et al.*, 2005).

Além disso, o OTR apresenta-se comumente oligomerizado na superfície da célula, mesmo na ausência de ligantes, e pode também ser encontrado oligomerizado com receptores da família da vasopressina (V_{1a} e V_2). Não se compreende bem, entretanto, o impacto dessa oligomerização do OTR sobre a transdução de sinal (Devost e Zingg, 2004).

1.2 Memória

1.2.1 Tipos de memória

Há mais de um tipo de memória, e esses podem ser classificados de acordo com vários critérios.

1.2.1.1 Memória Declarativa x Memória Não-Declarativa

Um dos critérios para classificar memórias as divide em “declarativas” e “não-declarativas”. O primeiro tipo, também chamado de “memória explícita”, inclui todas as memórias que um ser humano é capaz de trazer à consciência e transmitir verbalmente. A memória não-declarativa, ou “implícita”, não passa necessariamente pela consciência, nem pode ser transmitida verbalmente com facilidade a outras pessoas, pois é o tipo de memória mais fácil de *demonstrar* do que de *relatar*. Nessa categoria de memória estão incluídas a maioria das memórias motoras. Pode-se entender melhor essa diferença imaginando-se a situação em que um indivíduo quer ensinar a outro a coreografia de uma dança: é mais fácil demonstrar os movimentos do que descrevê-los (Squire, 1992).

A classificação em memórias declarativas x não-declarativas tem maior utilidade quando o assunto são memórias em humanos. A definição do que seja declarativo ou não em um animal é algo mais difícil: de um modo geral, a única maneira de se avaliar a existência de uma memória em um animal é quando este expressa um comportamento modificado. Por exemplo, um animal que receba um choque ao descer de uma plataforma, quando colocado de novo sobre a mesma, passará a demorar mais tempo para descer (ou nem descerá). A alteração de um comportamento inato, como descer rapidamente, indica que o animal se “lembra” de que há algo “ruim” abaixo da plataforma.

Neste trabalho, sempre que usamos a palavra “memória” estaremos nos referindo à memória declarativa.

1.2.1.2 Memória de Longa Duração x Memória de Curta Duração

A organização da memória segundo critérios temporais pode ser mais útil do que os critérios acima quando estudamos animais. Segundo este enfoque, as memórias são classificadas de acordo com o tempo que permanecem disponíveis (ou armazenadas) após terem sido adquiridas. Se uma memória pode ser evocada dias, semanas ou anos após ter sido formada, dir-se-á que é uma “memória de longa duração”. Entretanto, se ela puder ser evocada apenas por um curto período de tempo após a aquisição (algumas horas ou

minutos, no caso de humanos), é chamada de “memória de curta duração” (McGaugh, 1966).

Uma das questões importantes no estudo da memória sempre foi: será que o mecanismo de armazenamento da memória de curta duração é o mesmo da de longa duração (McGaugh, 1966, McGaugh, 2000) ? Essa questão, entretanto, foi esclarecida pelo grupo de Ivan Izquierdo (1998). O experimento que realizaram demonstrou que a infusão no hipocampo imediatamente após o treino do agonista serotoninérgico DPAT teve o efeito de abolir a memória da tarefa uma hora e meia após o animal ter sido treinado (memória de curta duração), mas não afetou a memória que o animal exibia 24 horas após o treino (considerada memória de longa duração no rato). Os mesmos resultados foram encontrados com a infusão de muscimol, NAN e CNQX no córtex entorrinal. Ou seja, é possível haver a formação de uma memória de longa duração mesmo que a memória de curta duração tenha tido sua formação/expressão impedida. A conclusão a que chegaram é que há um certo grau de independência entre os mecanismos envolvidos na formação das memórias de longa e de curta duração, mas que essas rotas, ainda assim, se comunicam, visto que há tratamentos que impedem o estabelecimento de ambos tipos de memória, como a infusão de CNQX no hipocampo (Izquierdo *et al.*, 1998).

1.2.2 Fases da memória

Os experimentos realizados até hoje indicam que, como seria de se esperar, a memória de uma experiência não é algo que se estabelece de modo instantâneo no encéfalo de um indivíduo. É necessário um certo tempo, no qual a memória vai como que amadurecendo, para, só então, se tornar algo mais duradoura (McGaugh, 1966). Classicamente, tem-se dividido as fases de formação da memória em “aquisição” e “consolidação/armazenamento”. O primeiro momento refere-se ao período de tempo em que o indivíduo está exposto às condições que levarão à formação de uma memória. É quando todas as informações são ainda apenas estímulos sensoriais aos quais o indivíduo reage ou observa. A consolidação/armazenamento é o período em que o traço de memória ainda é instável, e está sendo complementado e modulado por várias informações acerca do estado interno do indivíduo (McGaugh, Roozendaal e Cahill, 1999). Esta fase termina

quando o traço de memória já se estabilizou e está armazenado no encéfalo (Quillfeldt, 1994). Uma vez que uma memória esteja armazenada, ela está disponível para a “evocação”, ou seja, pode ser lembrada.

1.2.3 Mecanismos de consolidação

Das fases da formação da memória, a mais bem estudada é a consolidação. É consenso na literatura que os mecanismos de consolidação/armazenamento e evocação da memória são processos que ocorrem primariamente nas sinapses, mesmo que envolvam eventos localizados no soma, como a transcrição gênica e síntese protéica durante a consolidação (Quillfeldt, 1994, Vianna *et al.*, 2003, Quevedo *et al.*, 2004).

O momento crucial para o início do processo de consolidação parece coincidir com a entrada de íons cálcio através do receptor glutamatérgico do tipo NMDA (*N*-metil-D-aspartato). Esse cálcio participa da ativação de várias proteínas-quinases, entre elas a Proteína Quinase Cálcio-dependente (PKC) e a Cálcio-Calmodulina Quinase do tipo II (CaMKII), além de permitir a liberação de mais cálcio a partir dos estoques intracelulares do íon. Essas quinases, por sua vez, fosforilarão uma série de outras proteínas e, ao fim dessa cadeia de eventos, terão produzido mudanças nos níveis de expressão e na atividade de várias proteínas, inclusive de alguns canais iônicos de membrana (Colley *et al.*, 1990, Jerusalinsky *et al.*, 1994).

O receptor NMDA, entretanto, não é capaz de abrir-se sozinho em resposta à ligação do glutamato em seu sítio. Este receptor normalmente tem um íon Mg^{2+} posicionado na entrada do canal, impedindo a passagem de qualquer outro íon. Para que este cálcio possa entrar pelo receptor NMDA, é necessário que a membrana no neurônio seja despolarizada por algum outro receptor. Para este papel, normalmente considera-se como responsáveis os receptores glutamatérgicos ionotrópicos não-NMDA, como o AMPA (ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazola propiônico) e o Kainato (Nowak *et al.*, 1984).

Além dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos, também são importantes os receptores metabotrópicos, tanto glutamatérgicos (Bashir *et al.*, 1993) como não-

glutamatérgicos (Izquierdo *et al.*, 1998), envolvidos na ativação ou inativação de várias proteínas-cinases (Wolfman *et al.*, 1994).

1.2.4 Abordagens metodológicas para o estudo da memória

Há basicamente quatro metodologias que podem ser utilizadas para a investigação do papel de uma determinada estrutura do SNC ou de uma molécula na memória ou em outros processos cerebrais: estudos através de lesões, imageamento *in vivo*, manipulação genética ou tratamentos farmacológicos.

A observação do efeito de lesões no SNC é a metodologia mais antiga, sendo usada há praticamente um século e meio. Através desse método, Scoville e Millner (1957), por exemplo, identificaram a importância das estruturas do lobo temporal medial (hipocampo e amígdala entre elas) para a formação de novas memórias. O uso de lesões intencionais em animais como ferramenta investigativa apresenta, porém, alguns problemas; em primeiro lugar, o dano é, normalmente, irreversível; além disso, dificilmente a lesão de um animal é idêntica à de outro (Pu *et al.*, 1993); por fim, é possível que, com o passar do tempo, algumas regiões do SNC do animal lesado assumam parte das funções que eram executadas na região atingida (Pu *et al.*, 1993).

Uma segunda técnica, na verdade, bastante recente, a obtenção de imagens *in vivo*, tem se mostrado bastante promissora. A utilização da tomografia de emissão de pósitrons (PET *scan*) e/ou da ressonância magnética nuclear funcional tem permitido a visualização da atividade de regiões do encéfalo durante a execução das mais variadas atividades. Embora tenham a vantagem de ser facilmente aplicáveis em humanos e permitam testar tarefas relativamente complexas, os equipamentos necessários para esse tipo de investigação ainda são muito caros e também não são capazes de apontar detalhes importantes, como os tipos neuronais em atividade na tarefa sendo testada, indicando apenas a região do encéfalo que é ativada. Outra limitação é que não se pode determinar que uma estrutura é *essencial* para determinada tarefa simplesmente pelo fato de ela estar “ativada” durante a execução da mesma. Sob esse ponto de vista, é interessante notar que as técnicas de imageamento *in vivo* podem sugerir o envolvimento de uma estrutura através da

sua ativação, enquanto que as técnicas de lesão podem indicar se uma estrutura é essencial ou não a um processo, caso este esteja comprometido nos animais lesados.

A terceira metodologia possível, também bastante recente, para a investigação de processos no SNC é a manipulação genética de animais (Silva *et al.*, 1992). Com as técnicas atuais de biologia molecular, é quase rotineira a produção de animais com a deleção (ou “nocaute”, no original) de um determinado gene, o que permitiria, em princípio, estudar o papel da proteína codificada por ele.

O principal problema é que os animais produzidos com esse tipo de técnica não possuíram, em nenhum momento do seu desenvolvimento, a proteína codificada pelo gene deletado. Isso comumente acarreta alterações na ontogenia e pode levar ao surgimento de mecanismos compensatórios, com outras proteínas executando as funções daquela que teve seu gene deletado. Além disso, não se pode afirmar se as diferenças encontradas em experimentos se devem à ausência da proteína apenas durante a execução deste ou à sua ausência durante o desenvolvimento (Routenberg, 1996, Gingrich e Hen, 2000). Por fim, na maior parte dos casos, todas as células do animal não terão a proteína deletada, o que pode complicar a interpretação dos resultados.

A quarta metodologia disponível, anterior às duas últimas, e quase tão antiga quanto a primeira, é a manipulação farmacológica, que consiste na administração de substâncias, local ou sistemicamente, aos animais. As principais vantagens desse tipo de técnica são:

- 1) os animais utilizados são, em princípio, normais durante o seu desenvolvimento;
- 2) é possível a administração da droga em uma sub-região de uma estrutura específica;
- 3) a aplicação da substância pode obedecer a um rigoroso critério temporal com relação às fases da memória (aquisição/consolidação/evocação), o que permite a investigação dessas etapas isoladamente na maior parte dos casos;
- 4) os efeitos causados podem ser reversíveis, dependendo da droga utilizada, e;
- 5) havendo drogas adequadas, pode-se estudar o papel de um tipo específico de receptor/enzima/molécula nos processos de interesse.

Uma desvantagem desse tipo de abordagem é o fato do animal precisar passar por um procedimento cirúrgico caso a infusão das drogas seja realizada intra-SNC. Além disso, por vezes não há no mercado uma droga com a atividade ou seletividade necessárias.

1.2.5 Estruturas encefálicas envolvidas na memória explícita

O processamento da memória explícita envolve uma série de estruturas no encéfalo. Algumas delas, entretanto, já foram bastante bem estudadas e têm seu papel bem definido.

A primeira delas é a formação hipocampal, composta por giro denteado, hipocampo (ou “hipocampo propriamente dito”, que inclui as áreas CA1 e CA3), subículo, pré-subículo, para-subículo e córtex entorrinal. O conjunto formado por giro denteado, “hipocampo propriamente dito” e subículo é comumente chamado de “hipocampo” (Paxinos, 1995).

O hipocampo tem um papel importantíssimo na consolidação e na evocação da memória, pois, imediatamente após o treino em uma tarefa comportamental, ele é suscetível à manipulação farmacológica (Izquierdo *et al.*, 1997, por exemplo). O bloqueio dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos NMDA e AMPA hipocampais, assim como o aumento de atividade dos receptores inibitórios GABA_A, é capaz de impedir o processo de consolidação da memória. (Izquierdo *et al.*, 1997). Da mesma maneira, o bloqueio de receptores AMPA hipocampais, de 24 horas a até 26 dias, após o treino impede a evocação da memória, o que indica que o hipocampo ainda é necessário para este processo (Quillfeldt *et al.*, 1994).

Além dos sistemas glutamatérgico e GABAérgico, também estão envolvidos no processamento hipocampal da memória os sistemas colinérgico (Ferreira *et al.*, 2003), serotoninérgico, dopaminérgico e adrenérgico (Izquierdo *et al.*, 1998 e 1998b), todos capazes de influenciar a consolidação e a evocação da memória no hipocampo (Diehl *et al.*, em preparação, Ferreira *et al.*, 2003, Barros *et al.*, 2001, Quillfeldt *et al.*, 1994).

A outra estrutura importante para o processamento da memória é o complexo amigdalóide, mais frequentemente referido como “amígdala”, formado por três agrupamentos de núcleos, a amígdala central, a córtico-medial e a basolateral (Paxinos,

1995). Das três, a mais importante para o processamento da memória parece ser a basolateral (McGaugh, 2000, Roozendaal, 2002).

A amígdala parece ser a estrutura responsável por acrescentar o caráter emocional às memórias formadas, uma vez que tarefas com um reduzido componente aversivo no seu aprendizado parecem não recrutá-la (Diergaarde *et al.*, 2005). Por outro lado, eventos estressores e/ou agradáveis não são capazes de modular a memória se a amígdala não estiver íntegra e funcional (McGaugh, 2000, Roozendaal, 2002).

1.3 Modulação ocitocinérgica da consolidação da memória

1.3.1 Ocitocina intracerebral

Boa parte dos trabalhos investigando o papel da ocitocina na consolidação enfocaram antes o estudo da memória social em ratos, camundongos e outros animais, como os ratos-da-pradaria (*prairie voles*). Winslow e Insel (2002) e Ferguson *et al.* (2000) relatam prejuízo, por parte de camundongos nocaute para o gene que codifica a ocitocina, no reconhecimento de animais previamente apresentados, com a reversão desse déficit após a infusão intracerebroventricular de OT. Usando uma abordagem puramente farmacológica, Benelli e colaboradores (1995) encontraram facilitação da consolidação de memória social após a administração i.c.v. de ocitocina. Uma revisão da literatura indica um consenso em torno do fato de que a ocitocina é essencial para a formação de memória social, e que a administração exógena é capaz de facilitar esse processo.

O papel da ocitocina cerebral com outros tipos de memória, como a espacial, não parece ser tão claro. Wu e Yu (2004) relataram déficits no aprendizado da tarefa do labirinto aquático de Morris após a infusão de ocitocina no núcleo basal de Meynert, estrutura responsável pela produção de 90% da acetilcolina do SNC (Paxinos, 1995). Por outro lado, Tomizawa *et al.* (2003) encontraram facilitação da memória espacial na mesma tarefa após a administração intracerebroventricular de OT em ratas em puerpério. É possível, porém, que a contradição entre os dois achados se deva à diferença entre os sexos, fase estral das fêmeas e área cerebral infundida.

Parece não haver dúvidas, entretanto, de que a administração intracerebral de ocitocina prejudica a consolidação de memórias aversivas. De Wied *et al.* (1991) encontraram esse efeito com a administração intracerebroventricular em animais treinados na esquiva inibitória, e Ibragimov (1990) identificou um efeito amnésico após a administração intra-hipocampal de OT em animais treinados numa tarefa de esquiva ativa.

1.3.2 Ocitocina sistêmica

Os estudos sobre os efeitos da administração sistêmica de ocitocina na consolidação da memória são menos numerosos que os estudos com infusão intracerebral. Um dos primeiros achados foi o de um efeito amnésico sobre a consolidação na tarefa de esquiva inibitória após a administração subcutânea de ocitocina ou de fragmentos peptídicos obtidos a partir desta (Gaffori e de Wied, 1988, de Wied *et al.*, 1987). Mais recentemente, Boccia *et al.* (1998) e Boccia e Baratti (2000) relataram os efeitos amnésicos da administração subcutânea de ocitocina na consolidação da memória da tarefa de esquiva inibitória. Além disso, a $d(\text{CH}_2)_5\text{Tyr}(\text{Me})\text{-Orn}^8\text{-vasotocina}$ (AOT), antagonista dos receptores de ocitocina, promoveu a facilitação da mesma memória (Boccia *et al.*, 1998, Boccia e Baratti, 2000). Boccia e Baratti (2000) também demonstraram que, apesar da ocitocina ter uma certa afinidade pelo receptor V_{1a} da vasopressina, seus efeitos sobre a memória se dão exclusivamente através de seu próprio receptor (OTR), uma vez que a AOT, mas não um antagonista vasopressinérgico, foi capaz de impedir a amnésia provocada pela administração de OT.

O trabalho de Boccia e Baratti (2000) lançou luz sobre os possíveis mecanismos intracerebrais através dos quais a ocitocina periférica exerce seus efeitos sobre a memória. A administração de uma dose sem efeito próprio de fisostigmina, um agente anticolinesterásico que atravessa a barreira hematoencefálica, reverteu os efeitos amnésicos da ocitocina, sugerindo que a ocitocina periférica provavelmente exerce seus efeitos sobre a consolidação da memória modulando negativamente a atividade colinérgica intracerebral. Em contrapartida, a neostigmina, que não cruza a barreira sangue-cérebro, não reverteu os efeitos da ocitocina.

Em humanos, Heinrichs e *et al.* (2004) identificaram um efeito amnésico sobre a consolidação da memória explícita de palavras com a administração intranasal de ocitocina em aerosol. Quando o teste envolvia a consolidação da memória implícita, apenas palavras com significado associado à reprodução tiveram seu aprendizado prejudicado pela ocitocina (Heinrichs *et al.*, 2004).

1.4 Modulação colinérgica da consolidação da memória

Em vista dos achados de Boccia e Baratti (2000), vejamos qual o papel do sistema colinérgico na consolidação da memória.

Miranda e Bermúdez-Rattoni (1999) demonstraram, através da inativação do núcleo basal de Meynert (NBM), principal fonte de acetilcolina no encéfalo, que esta é essencial para o processo de consolidação da memória da tarefa de aversão condicionada ao gosto. Resultados semelhantes foram encontrados com memórias espaciais mediante lesões do NBM (Winkler *et al.*, 1995), cujo efeito foi revertido com o enxerto de fibroblastos modificados para a produção de acetilcolina.

Além de ser essencial para a consolidação, uma maior disponibilidade de acetilcolina no encéfalo é capaz de facilitá-la. A administração de fisostigmina, que impede a degradação da ACh no SNC, promove a facilitação da memória (Meagher *et al.*, 1998). Esse efeito que provavelmente se dá via receptores muscarínicos, uma vez que a escopolamina, um antagonista não-seletivo para estes receptores, prejudica a consolidação da memória em vários tipos de tarefa (Quirarte *et al.*, 1993, Rosat *et al.*, 1992, Izquierdo *et al.*, 1992, Fan *et al.*, 2005). Estudos recentes (Ferreira *et al.*, 2003) identificaram a importância dos receptores muscarínicos M1 e M4 no processo de consolidação da memória da esquila inibitória utilizando ligantes seletivos para os mesmos.

1.5 Modulação adrenérgica e glicocorticóide da consolidação da memória

Experimentos já clássicos (McGaugh, 1966) demonstraram o papel das catecolaminas na consolidação da memória. Doses moderadas de adrenalina sistêmica são capazes de facilitar o processo de formação da memória (McGaugh, 1966), e o mesmo vale

para doses intracerebrais (Ferry *et al.*, 1999). Adrenalina, noradrenalina e agonistas adrenérgicos infundidos em várias estruturas do encéfalo, como amígdala e hipocampo facilitam a memória, enquanto que antagonistas beta-adrenérgicos prejudicam (Ferry *et al.*, 1999, McIntyre *et al.*, 2003). Como as catecolaminas não atravessam a barreira hematoencefálica, quaisquer efeitos resultantes no SNC de uma administração periférica desses hormônios deve se dar de maneira indireta. Ambrogi-Lorenzini *et al.* (1999) sugerem que a ativação de receptores beta-adrenérgicos no nervo vago resulta em um aumento na atividade adrenérgica intracerebral através do *locus coeruleus*, do NTS e da amígdala.

Assim como com as catecolaminas, doses moderadas de glicocorticóides (GC), ou agonistas de seus receptores, são capazes de promover a facilitação da consolidação em um processo dependente da atividade adrenérgica. Antagonistas beta-adrenérgicos infundidos na amígdala ou no hipocampo, por exemplo, bloqueiam o efeito de GC sistêmicos ou intra-hipocampais. Da mesma maneira, antagonistas GC impedem os efeitos facilitatórios de agonistas adrenérgicos (Roozendaal, 1992). Diferentemente das catecolaminas, os glicocorticóides atravessam a barreira hematoencefálica com facilidade, então administrações sistêmicas dos mesmos levam a efeitos intracerebrais sem a necessidade de ativação de estruturas intermediárias como o nervo vago e o núcleo do trato solitário (NTS).

É interessante observar que, assim como os efeitos dos GC na memória requerem a atividade adrenérgica, esta última é capaz de ser modulada pelos GC através de receptores para glicocorticóides (GR) no NTS, promovendo o aumento dos níveis de noradrenalina na amígdala em função da ativação desses GR do tronco encefálico (Markey *et al.*, 1982; McEwen, 1987).

1.6 Modulação ocitocinérgica da evocação da memória

Há bem menos estudos sobre os efeitos da ocitocina sobre a evocação da memória do que sobre a consolidação. Os poucos trabalhos a respeito indicam um papel amnésico para a ocitocina intracerebral pré-teste (Bohus *et al.*, 1978, de Wied, 1980, Bohus, 1980, van Wimersma Greidanus *et al.*, 1985). Com a administração sistêmica de ocitocina, há

relatos de prejuízo na evocação da memória de uma resposta de “congelamento” condicionado após o tratamento com o fragmento OT (4-9) de ocitocina (Stoehr *et al.*, 1992) e de diminuição da evocação de memórias traumáticas em veteranos do Vietnã após inalação de ocitocina (Pitman *et al.*, 1993).

1.7 Modulação colinérgica da evocação da memória

Ao contrário do processo de consolidação da memória, no qual a acetilcolina tem um papel fundamental, os resultados encontrados para a evocação são mais incertos. Alguns trabalhos relatam a facilitação da evocação da memória do medo condicionado (Rogers e Kesner, 2004) e do labirinto de Hebb-Williams (Rogers e Kesner, 2003) com a infusão intra-hipocampal de escopolamina. Outro trabalho (Barros *et al.*, 2001) encontrou uma piora da evocação da esQUIVA inibitória com a mesma droga.

Entretanto, trabalhos recentes (Diehl *et al.*, em preparação) encontraram facilitação da evocação da memória da EI com a infusão intra-hipocampal pré-teste de escopolamina ou de MT3, um antagonista seletivo para os receptores M4. Em face desse achado, é possível sugerir que a ativação do sistema colinérgico hipocampal, em particular dos receptores M4, é prejudicial à evocação da memória desse tipo de tarefa.

1.8 Modulação adrenérgica e glicocorticóide da evocação da memória

Diferentemente do que ocorre na consolidação, os glicocorticóides parecem exercer um papel contrário ao das catecolaminas no processo de evocação da memória. As catecolaminas, em doses moderadas, são capazes de facilitar a evocação, e antagonistas adrenérgicos são amnésicos (Barros *et al.*, 2001). Por outro lado, os glicocorticóides parecem ter um claro efeito amnésico sobre a evocação (Roozendaal, 2002, Roozendaal *et al.*, 2004a), atuando principalmente no hipocampo (Roozendaal *et al.*, 2004b). Os mecanismos através dos quais esse efeito se manifesta ainda não são muito claros, mas possivelmente envolvem alterações na atividade da proteína-cinase A (PKA) e proteínas cinases ativadas por mitógenos (Izquierdo *et al.*, 2000, Szapiro *et al.*, 2000). Além disso, doses sistêmicas de GC levam à diminuição da atividade elétrica no hipocampo (Joëls,

2001) e a uma redução no fluxo sanguíneo no lobo temporal medial, onde se localiza esta estrutura (de Quervain *et al.*, 2003).

É interessante observar que, apesar das diferenças no papel dos GC na consolidação e na evocação, a relação destes com a atividade adrenérgica permanece: assim como na consolidação, os efeitos amnésicos dos glicocorticóides na evocação requerem atividade noradrenérgica no hipocampo e na amígdala (Roosendaal *et al.*, 2004b).

A revisão da literatura feita acima indica a existência de efeitos amnésicos da ocitocina plasmática sobre a memória. Entretanto, os mecanismos específicos responsáveis por estes efeitos ainda não são ainda bem claros. O objetivo desta tese é delimitar com mais precisão os efeitos da administração sistêmica de ocitocina sobre os processos de consolidação e evocação da memória, assim como investigar os mecanismos através dos quais esses efeitos se manifestam.

2. Objetivos

Os objetivos desta tese são:

- 1) estudar os efeitos da administração sistêmica de ocitocina sobre a *consolidação* da memória em ratos machos treinados na tarefa de esquiva inibitória;
- 2) estudar os efeitos da administração sistêmica de ocitocina sobre a *evocação* da memória em ratos machos treinados na tarefa de esquiva inibitória;
- 3) estudar os efeitos da administração sistêmica de ocitocina sobre a *consolidação* da memória em ratas fêmeas treinadas na tarefa de esquiva inibitória;
- 4) estudar os efeitos da administração sistêmica de ocitocina sobre a *evocação* da memória em ratas fêmeas treinadas na tarefa de esquiva inibitória;
- 5) estudar os efeitos da administração sistêmica de ocitocina sobre a *evocação* da memória nas tarefas do labirinto aquático de Morris e da habituação ao campo aberto;
- 6) estudar os efeitos da administração sistêmica de ocitocina sobre a ansiedade de machos e fêmeas na tarefa do labirinto em cruz elevado;
- 7) investigar o papel do sistema colinérgico hipocampal na mediação dos efeitos da administração sistêmica de ocitocina sobre a *evocação* da memória de ratos treinados na tarefa de esquiva inibitória;
- 8) investigar o papel dos glicocorticóides plasmáticos na mediação dos efeitos da administração sistêmica de ocitocina sobre a *evocação* da memória de ratos treinados na tarefa da esquiva inibitória;
- 9) investigar o papel do sistema adrenérgico hipocampal na mediação dos efeitos da administração sistêmica de ocitocina sobre a *evocação* da memória de ratos treinados na tarefa de esquiva inibitória.

3. Material e Métodos

3.1 Animais

A maior parte dos experimentos foi realizada com ratos Wistar machos, com entre dois e três meses, pesando 240 +/- 10% gramas. Alguns experimentos utilizaram fêmeas Wistar, de idade equivalente, pesando 210 +/- 10% gramas. A maioria dos animais foi criada no Centro de Reprodução e Experimentação com Animais de Laboratório (CREAL) do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICBS/UFRGS), e transportada para o ratário de nosso laboratório com idades entre seis e oito semanas. O restante dos animais foi criado no ratário do Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação (LPBNC), do departamento de Biofísica da UFRGS.

Tanto a temperatura como a umidade eram controlados no ratário do LPBNC, e todos os animais provenientes do CREAL eram aclimatados às condições locais antes de serem utilizados nos experimentos. As caixas de moradia era limpas duas vezes por semana, e a ração que os animais recebiam era a mesma do CREAL (Nuvilab).

3.2 Anestesia

Os animais utilizados em experimentos com canulação intra-cerebral foram anestesiados intra-peritonealmente com uma combinação de ketamina (90 mg/kg) e xilazina (12 mg/kg).

3.3 Cirurgia estereotáxica

Após estarem anestesiados, os animais eram colocados em um aparelho de cirurgia estereotáxica. O escalpo era retirado, e orifícios eram abertos no crânio utilizando-se uma broca odontológica. As coordenadas para a implantação das cânulas, cujo alvo era a região hipocampal dorsal, eram: AP= -0,42 cm, LL= +0,30/-0,30 cm, DV= -0,15 cm, com uma inclinação de -0,33 cm (adaptadas de Paxinos e Watson, 1997).

As cânulas eram manufaturadas a partir de agulhas comuns calibre 22, e possuíam um comprimento de nove milímetros. Após estarem colocadas, eram fixadas com acrílico

odontológico, e a massa de acrílico resultante tinha sua fixação reforçada por um parafuso preso ao crânio, em uma posição imediatamente posterior à sutura interaural, levemente deslocado da linha central.

Terminada a cirurgia, os animais eram colocados por algumas horas em uma caixa pós-operatória, sob uma lâmpada incandescente vermelha para prevenção de hipotermia. Após um período de recuperação de três a cinco dias, os animais eram considerados prontos para o experimento.

3.4 Tarefas comportamentais

Foram utilizados quatro tipos de tarefa comportamental: esquiva inibitória, labirinto aquático de Morris, habituação ao campo aberto e labirinto em cruz elevado.

3.4.1 Esquiva inibitória

A esquiva inibitória é uma tarefa amplamente utilizada por sua simplicidade e fácil execução. O treino e o teste eram conduzidos em uma caixa com 49,5 cm de comprimento, 29,5 cm de altura e 25 cm de largura. No fundo da caixa, havia uma grade formada por barras metálicas espaçadas um centímetro, e, na parte esquerda da caixa, uma plataforma não-metálica (25 cm x 10 cm) elevada seis centímetros acima das barras, sobre a qual o animal podia permanecer confortavelmente. A caixa estava instalada em uma sala isolada do resto do laboratório.

No treino, cada animal era colocado sobre a plataforma, voltado para um canto. Após alguns segundos de atividade exploratória, o animal descia da plataforma para a grade. Quando descia com as quatro patas, era aplicado um choque intermitente por três segundos. Em seguida, o animal era devolvido à sua caixa-moradia. O tempo que o animal demorava para descer com as quatro patas (latência de descida) era registrado. Animais que demorassem mais de 20 segundos para descer no treino eram considerados não-válidos. Foram utilizadas três intensidades de choque no treino, 0,25, 0,5 e 0,7 mA, dependendo do grupo experimental.

O intervalo entre treino e teste era de 24 horas. No teste, cada animal era colocado na caixa de tarefa em condições iguais a do treino, e a latência de descida da plataforma no teste era o índice de memória para tarefa. Animais com memória para a tarefa demoravam mais para descer no teste do que animais sem memória para a tarefa. Se o animal demorasse mais do que 180 segundos para descer, era retirado da caixa de tarefa e seu tempo era registrado como 180 s.

3.4.2 Labirinto aquático de Morris

O treino e o teste dos animais no labirinto aquático de Morris eram realizados dentro de um tanque de água circular com diâmetro de 1,80 m. O tanque era cheio com água a uma temperatura de 23 ± 1 graus Celsius, com aproximadamente 40 cm de profundidade. Um centímetro abaixo da linha d'água, não-visível para o animal que estivesse nadando, havia uma plataforma de 10 cm de diâmetro, cuja posição era mantida fixa ao longo de todo o treino.

A cada tentativa de treino, o animal era largado de uma posição diferente na beira do tanque e deixado nadar por um minuto ou até encontrar a plataforma. Se não a achasse nesse tempo, era gentilmente conduzido a ela. Após estar na plataforma, o animal permanecia nela por 20 segundos, sendo então retirado e devolvido para sua caixa-moradia. Aproximadamente 15 minutos após, uma nova tentativa era realizada com o mesmo animal. Foram realizados dois dias de treino, com seis tentativas em cada dia.

No terceiro dia, cada animal era colocado no tanque, desta vez sem plataforma, e deixado nadar por um minuto, sendo então recolhido à sua caixa-moradia. Os índices de memória para a tarefa eram a latência para cruzamento pelo local da plataforma e a comparação entre o tempo dispendido no quadrante do tanque onde a plataforma estava o treino e no quadrante oposto.

Tanto o treino como o teste foram registrados através de um equipamento computadorizado de rastreamento da posição do animal no tanque (VP200 Advanced Tracker, HVS Image Ltd.).

3.4.3 Habituação ao campo aberto

A tarefa de habituação ao campo aberto foi realizada em uma caixa de (60 cm de largura x 40 cm de profundidade x 50 cm de altura), com fundo quadriculado. No treino, o animal era colocado no canto esquerdo do fundo e deixado explorar livremente a caixa. Após dois minutos, era retirado e devolvido à sua caixa-moradia. No teste, o animal era colocado na mesma posição e tinha os mesmo dois minutos para explorar. Tanto no treino como no teste, eram registrados o número respostas de orientação e o número de cruzamentos.

3.4.4 Labirinto em cruz elevado

A tarefa do labirinto em cruz elevado (LCE), diferentemente da outras, não possuía um treino e um teste; os animais são apenas testados, uma vez que ela é, primariamente, uma tarefa de avaliação de ansiedade, e não uma tarefa de aprendizado e memória.

O LCE é um aparato com quatro braços, dois abertos nas laterais e dois com paredes (cada braço com 44,5 x 11,5 cm). A tarefa consistia em colocar o animal no centro do LCE, voltado para um dos braços fechados, e deixá-lo explorar livremente por dois minutos, após o que ele era retirado e devolvido à caixa-moradia. Durante a tarefa, eram contados o número de entradas nos braços fechados (um índice de atividade motora), o tempo gasto nos braços abertos (índice de ansiedade) e o número de avaliações de risco, na qual o animal coloca a cabeça para um dos braços abertos, mas mantém o corpo no centro do LCE.

3.5 Administração da droga

Duas técnicas de administração da droga foram utilizadas, intra-peritoneal (i.p.) e intra-hipocampal. Independentemente da técnica, se o objetivo era estudar a consolidação da memória, a administração da droga era feita imediatamente após o treino. Se o objetivo era estudar a evocação da memória, a infusão era feita 30 minutos antes do teste. Nos casos em que se fez ambos os tipos de tratamento com o animal, a administração intra-hipocampal era imediatamente seguida pela intra-peritoneal.

Para a administração i.p., o animal era pego pelas costas e recebia uma injeção de 0,5 ml no abdômen, levemente deslocado da linha central. Para o tratamento intrahipocampal, o animal era imobilizado com uma toalha, procedendo-se com a infusão da droga.

Esta era feita com a utilização de micro-seringas (Hamilton Co., de 10 microlitros) com um pequeno tubo plástico flexível preso à agulha. Na outra extremidade da mangueira, havia uma agulha do tipo “mizzy”, calibre 30, com 10 milímetros de comprimento. No momento da infusão, a agulha “mizzy” era introduzida na cânula, projetando-se um milímetro além desta e atingindo o local-alvo. A infusão era feita ao longo de 90 segundos, e um volume de 0,5 microlitros era administrado.

3.6 Verificação da posição das cânulas

Após o teste, os animais eram mortos por guilhotinamento, e aqueles animais que tinham passado por cirurgia estereotáxica recebiam uma solução de Azul Tripán através das cânulas para marcar o local onde a droga fora originalmente administrada. Em seguida, seus cérebros eram retirados e acondicionados em formol 10% para posterior verificação da posição das cânulas.

Após um período de alguns dias, para permitir a fixação do tecido, cada cérebro era cortado manualmente, e a posição das cânulas era observada à lupa, com aumento de duas a seis vezes, e registrada. Apenas os animais corretamente canulados e infundidos tiveram seus dados computados.

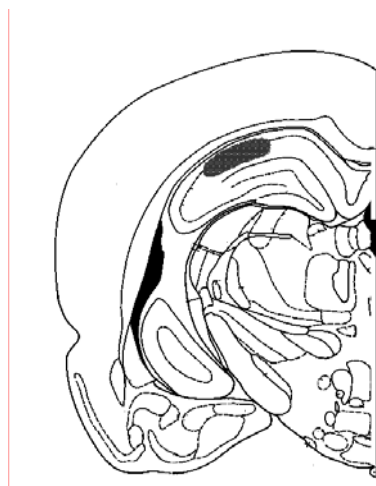


Figura 3.1 – posição típica da marca do corante injetado para visualização do local de infusão da droga (retirado de Mello e Souza *et al.*, 2000).

3.7 Análise estatística

Como era imposto um teto de tempo (180 s) para a descida dos animais da plataforma no teste da EI, não se pôde utilizar testes estatísticos paramétricos. Dessa maneira, para a comparação entre dois grupos foi utilizado o teste U de Mann-Whitney. Para a comparação do desempenho de um mesmo grupo no treino e no teste foi utilizado o teste de Wilcoxon. Para a comparação entre múltiplos grupos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. Por fim, foi utilizado o teste de Dunn como *post-hoc* ao Kruskal-Wallis. Da mesma maneira, os resultados do labirinto aquático de Morris também foram analisados com testes não-paramétricos.

A comparação entre múltiplos grupos de animais nas tarefas de habituação ao campo aberto e labirinto em cruz elevado foram feitas com o teste t de Student ou com o teste ANOVA (dependendo do número de grupos), com o teste de Dunnet como *post-hoc* ao ANOVA. As comparações entre o desempenho no treino e no teste de cada grupo de animais na habituação ao campo aberto foram feitas com o teste t pareado.

3.8 Drogas

A principal droga utilizada nesta tese foi a ocitocina, em quatro doses, 0,04, 0,4, 4 e 40 µg/kg. Seu veículo era uma solução de cloreto de sódio a 0,9%. Em todos os experimentos, a ocitocina foi administrada intra-peritonealmente.

Além disso, foram utilizados em administração intra-hipocampal a metil-escolamina, antagonista muscarínico não-seletivo, na dosagem de 0,5 µg/lado, a MT3, antagonista seletivo para o receptor muscarínico M4, na dose de 0,5 µg/lado, e o timolol, um antagonista seletivo para os receptores beta-adrenérgicos, na dosagem de 0,0125 µg/lado. Como veículo, utilizou-se tampão fosfato-salina. Foi utilizada também a dexametasona, um agonista glicocorticóide, na dosagem de 0,02 mg/kg, administrada intra-peritonealmente.

3.9 Experimentos realizados

3.9.1 Esquiva inibitória

Na tabela abaixo estão representados os experimentos realizados na tarefa de esquiva inibitória e quais as doses de ocitocina utilizadas em cada um deles.

Tabela 3.1 – Doses de ocitocina administradas i.p. nos experimentos com a tarefa de esquiva inibitória (sempre em µg/kg)

	Machos		Fêmeas	
	OT pós-treino	OT pré-teste	OT pós-treino	OT pré-teste
Choque				
0,25 mA	0,04; 0,4; 4; 40	0,04; 0,4; 4; 40	---	---
0,5 mA	0,04; 0,4; 4; 40	0,04; 0,4; 4; 40	0,04; 0,4; 4; 40	0,04; 0,4; 4; 40
0,7 mA	0,4 e 4	---	---	0,4 e 4

3.9.2 Labirinto aquático de Morris

Foi realizado um experimento com a administração pré-teste de 0,4 µg/kg de ocitocina i.p. com ratos machos.

3.9.3 Habituação ao campo aberto

Foi realizado um experimento com a administração pré-teste de 0,4 e 4 µg/kg de ocitocina i.p. com ratos machos.

3.9.4 Esquiva inibitória com infusão de ocitocina e mais outra droga

Foram realizados quatro experimentos, todos com ratos machos. Em cada experimento, a administração i.p. de 0,4 µg/kg de ocitocina era precedida pela infusão de uma outra droga. Essas drogas foram: escopolamina 0,5 µg/lado intra-hipocampal, MT3 0,5 µg/lado intra-hipocampal, dexametasona 0,02 mg/kg i.p. e timolol, 0,0125 µg/lado intra-hipocampal.

3.9.5 Labirinto em cruz elevado

Foram realizados dois experimentos, um com machos e o outro com fêmeas. Em ambos, foram utilizadas as doses de 0,04, 0,4, 4 e 40 µg/kg de ocitocina.

Todos os experimentos foram realizados de acordo com a legislação brasileira sobre o uso de animais em pesquisa (Lei n.º 6.638/1979), com as recomendações da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento e com a diretiva 86/609/EEC de 24 de Novembro de 1986 do Conselho das Comunidades Européias.

4. Resultados

4.1 Experimentos relativos ao objetivo 1

4.1.1 Ocitocina em quatro doses i.p. pós-treino na esquiva inibitória (choque de 0,25 mA) com ratos machos

A figura 4.1 apresenta os efeitos da ocitocina sobre a consolidação da EI com um choque de 0,25 mA.

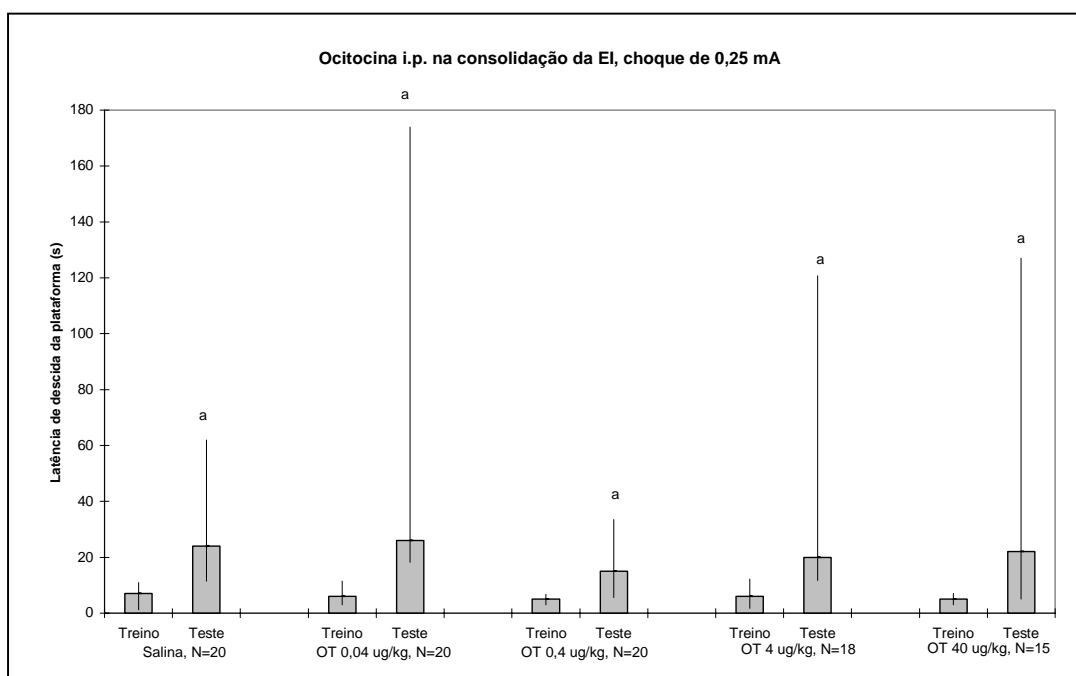


Fig. 4.1 - efeitos da administração intra-peritoneal de quatro doses de ocitocina na consolidação da memória de ratos machos treinados na esquiva inibitória com um choque de 0,25 mA. a: diferença significativa com relação ao treino ($P < 0,05$, teste de Wilcoxon).

Não houve diferença significativa entre os desempenhos dos grupos no treino ($P = 0,916$, teste de Kruskal-Wallis) e no teste ($P = 0,256$, teste de Kruskal-Wallis). Houve diferença significativa na comparação dos desempenhos no treino e no teste para todos os grupos ($P < 0,05$, teste de Wilcoxon).

4.1.2 Ocitocina em quatro doses i.p. pós-treino na esquiva inibitória (choque de 0,5 mA) com ratos machos

A figura 4.2 apresenta os efeitos da ocitocina sobre a consolidação da EI com um choque de 0,5 mA.

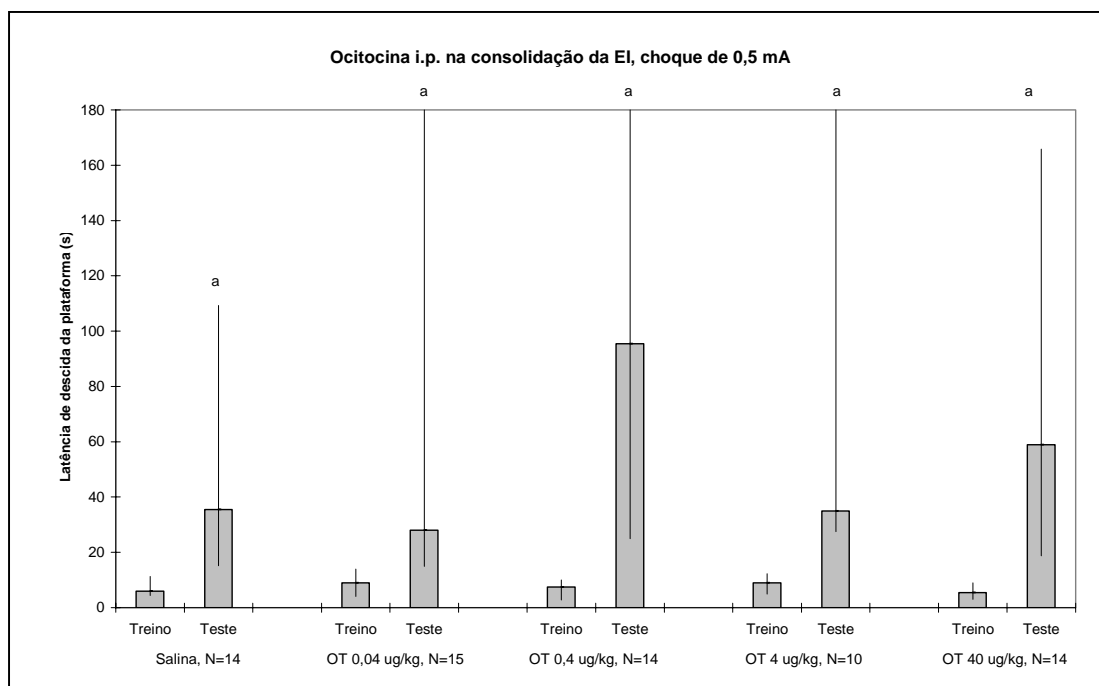


Fig. 4.2 - efeitos da administração intra-peritoneal de quatro doses de ocitocina na consolidação da memória de ratos machos treinados na esquiva inibitória com um choque de 0,5 mA. a: diferença significativa com relação ao treino ($P < 0,05$, teste de Wilcoxon).

Não houve diferença significativa entre os desempenhos dos grupos no treino ($P = 0,554$, teste de Kruskal-Wallis) e no teste ($P = 0,457$, teste de Kruskal-Wallis). Houve diferença significativa na comparação dos desempenhos no treino e no teste para todos os grupos ($P < 0,05$, teste de Wilcoxon).

4.1.3 Ocitocina em duas doses i.p. pós-treino na esquiva inibitória (choque de 0,7 mA) com ratos machos

A figura 4.3 apresenta os efeitos da ocitocina sobre a consolidação da EI com um choque de 0,7 mA.

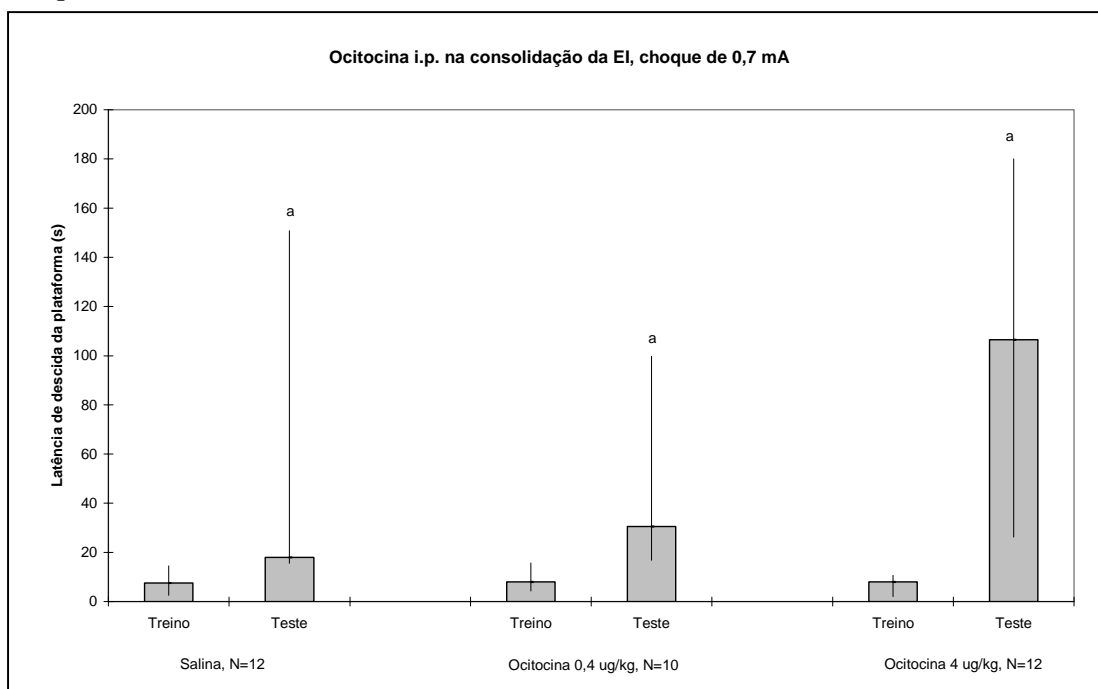


Figura 4.3 - efeitos da administração intra-peritoneal de duas doses de ocitocina na consolidação da memória de ratos machos treinados na esquiva inibitória com um choque de 0,7 mA. a: diferença significativa com relação ao treino ($P < 0,05$, teste de Wilcoxon).

Não houve diferença significativa entre os desempenhos dos grupos no treino ($P = 0,787$, teste de Kruskal-Wallis) e no teste ($P = 0,245$, teste de Kruskal-Wallis). Houve diferença significativa na comparação dos desempenhos no treino e no teste para todos os grupos ($P < 0,05$, teste de Wilcoxon).

4.2 Experimentos relativos ao objetivo 2

4.2.1 Ocitocina em quatro doses i.p. pré-teste na esQUIVA inibitória (choque de 0,25 mA) com ratos machos

A figura 4.4 apresenta os efeitos da ocitocina sobre a evocação da EI com um choque de 0,25 mA.

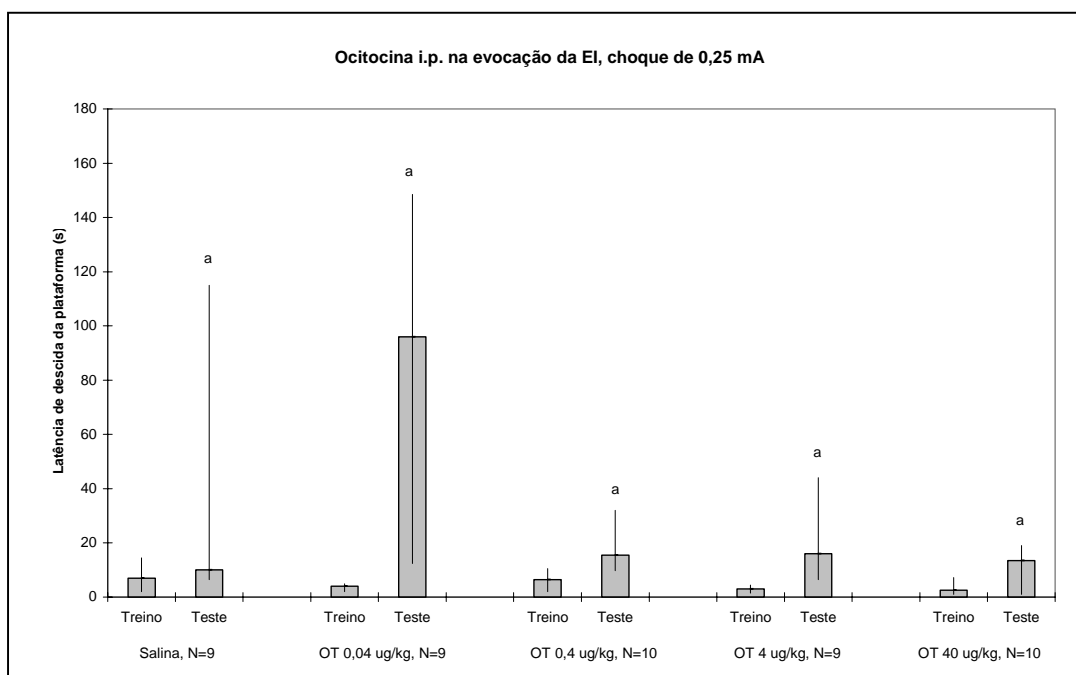


Fig. 4.4 - efeitos da administração intra-peritoneal de quatro doses de ocitocina na evocação da memória de ratos machos treinados na esQUIVA inibitória com um choque de 0,25 mA. a: diferença significativa com relação ao treino ($P < 0,05$, teste de Wilcoxon).

Não houve diferença significativa entre os desempenhos dos grupos no treino ($P = 0,279$, teste de Kruskal-Wallis) e no teste ($P = 0,389$, teste de Kruskal-Wallis). Houve diferença significativa na comparação dos desempenhos no treino e no teste para todos os grupos ($P < 0,05$, teste de Wilcoxon).

4.2.2 Ocitocina em quatro doses i.p. pré-teste na esquiva inibitória (choque de 0,5 mA) com ratos machos

A figura 4.5 apresenta os efeitos da ocitocina sobre a evocação da EI com um choque de 0,5 mA.

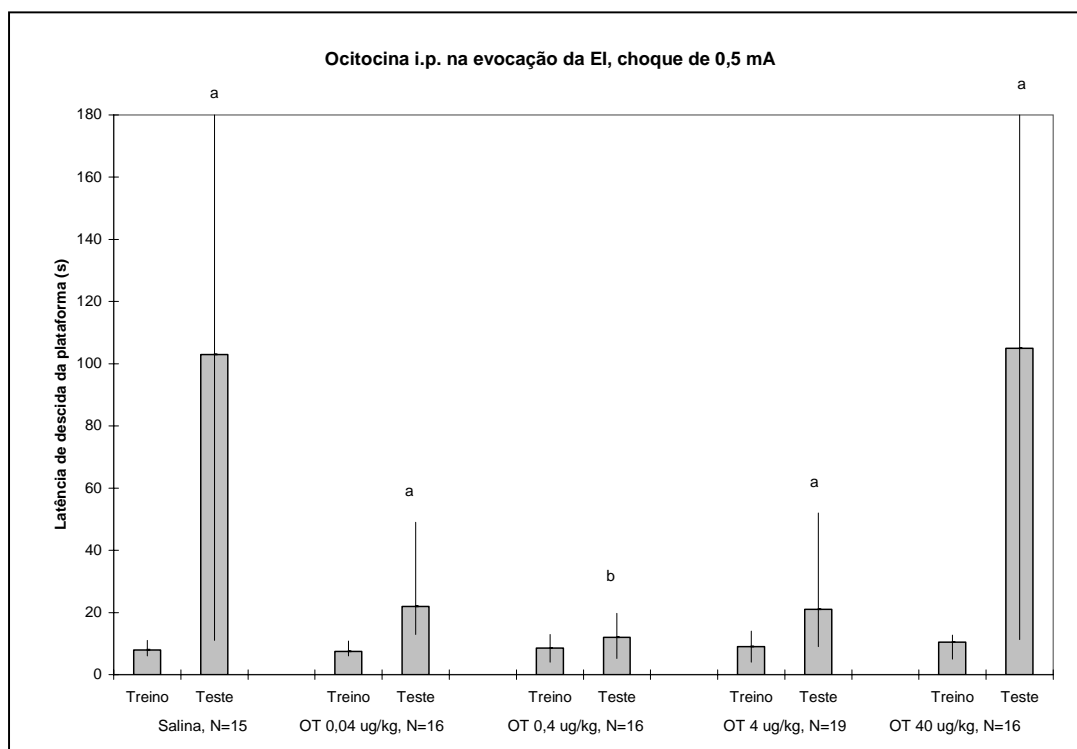


Fig. 4.5 - efeitos da administração intra-peritoneal de quatro doses de ocitocina na evocação da memória de ratos machos treinados na esquiva inibitória com um choque de 0,5 mA. a: diferença significativa com relação ao treino ($P < 0,05$, teste de Wilcoxon); b: diferença significativa com relação ao veículo ($P < 0,02$, teste de Dunn).

Não houve diferença significativa entre os desempenhos dos grupos no treino ($P = 0,795$, teste de Kruskal-Wallis), mas houve pelo menos um grupo diferente dos outros no teste ($P = 0,023$, teste de Kruskal-Wallis). O teste *post-hoc* indica que o grupo que recebeu OT 0,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ difere do controle ($P < 0,02$, teste de Dunn).

Houve diferença significativa na comparação dos desempenhos no treino e no teste para todos os grupos ($P < 0,05$, teste de Wilcoxon) com exceção do que recebeu OT 0,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($P = 0,050$, teste de Wilcoxon).

4.3 Experimento relativo ao objetivo 3

4.3.1 Ocitocina em quatro doses i.p. pós-treino na esQUIVA inibitória (choque de 0,5 mA) com ratas fêmeas

A figura 4.6 apresenta os efeitos da ocitocina sobre a consolidação da EI em fêmeas com um choque de 0,5 mA.

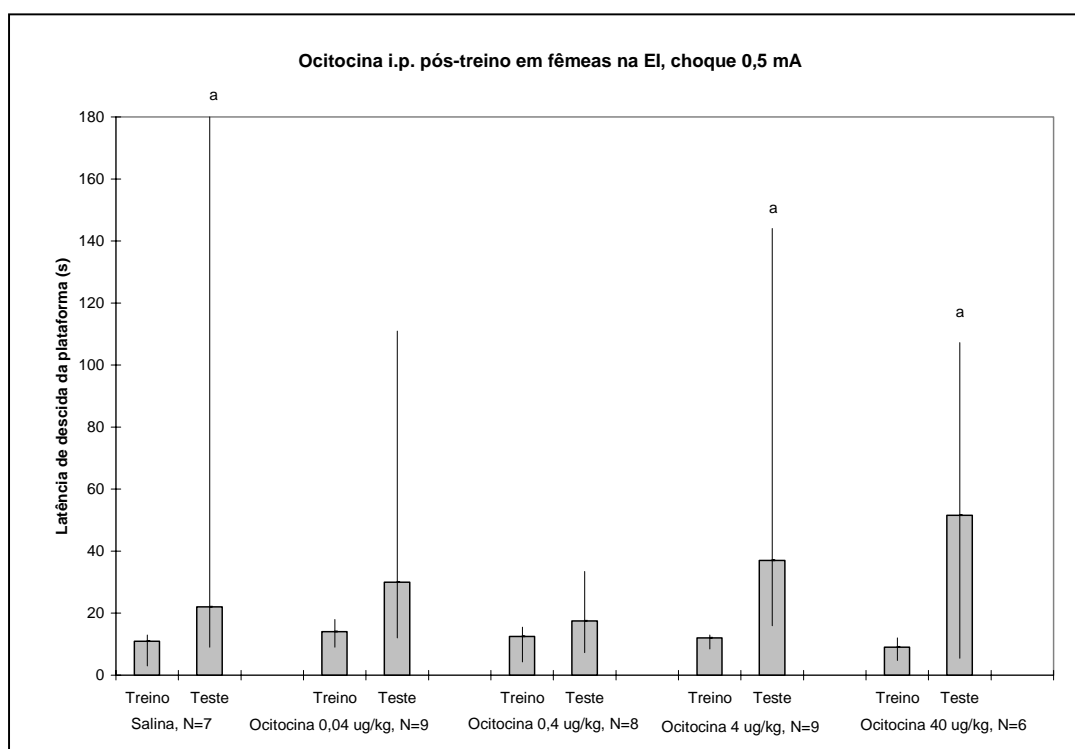


Fig. 4.6 - efeitos da administração intra-peritoneal de quatro doses de ocitocina em fêmeas na consolidação da memória de ratas fêmeas treinadas na esQUIVA inibitória com um choque de 0,5 mA. a: diferença significativa com relação ao treino ($P < 0,05$, teste de Wilcoxon).

Não houve diferença significativa entre os desempenhos dos grupos no treino ($P = 0,443$, teste de Kruskal-Wallis) e no teste ($P = 0,673$, teste de Kruskal-Wallis). Houve diferença significativa na comparação dos desempenhos no treino e no teste para os grupos que receberam Salina, OT 4 e 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($P < 0,05$, teste de Wilcoxon), mas não houve

diferença significativa para os grupos que receberam OT 0,04 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($P=0,051$, teste de Wilcoxon) e 0,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($P=0,183$, teste de Wilcoxon).

4.4 Experimentos relativos ao objetivo 4

4.4.1 Ocitocina em duas doses i.p. pré-teste na esQUIVA inibitória (choque de 0,5 mA) com ratas fêmeas

A figura 4.7 apresenta os efeitos da ocitocina sobre a evocação da EI em fêmeas com um choque de 0,5 mA.

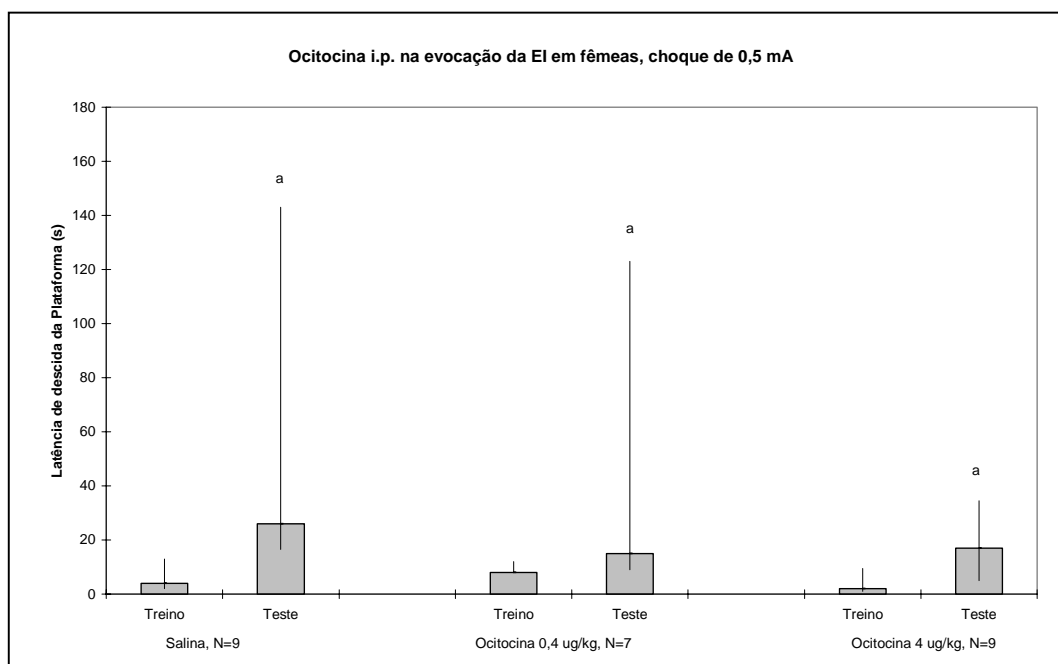


Fig. 4.7 - efeitos da administração intra-peritoneal de duas doses de ocitocina em fêmeas na evocação da memória de ratas fêmeas treinadas na esQUIVA inibitória com um choque de 0,5 mA. a: diferença significativa com relação ao treino ($P < 0,05$, teste de Wilcoxon).

Não houve diferença significativa entre os desempenhos dos grupos no treino ($P = 0,224$, teste de Kruskal-Wallis) e no teste ($P = 0,345$, teste de Kruskal-Wallis). Houve diferença significativa na comparação dos desempenhos no treino e no teste para todos os grupos ($P < 0,05$, teste de Wilcoxon).

4.4.2 Ocitocina em duas doses i.p. pré-teste na esquiva inibitória (choque de 0,7 mA) com ratas fêmeas

A figura 4.8 apresenta os efeitos da ocitocina sobre a evocação da EI em fêmeas com um choque de 0,7 mA.

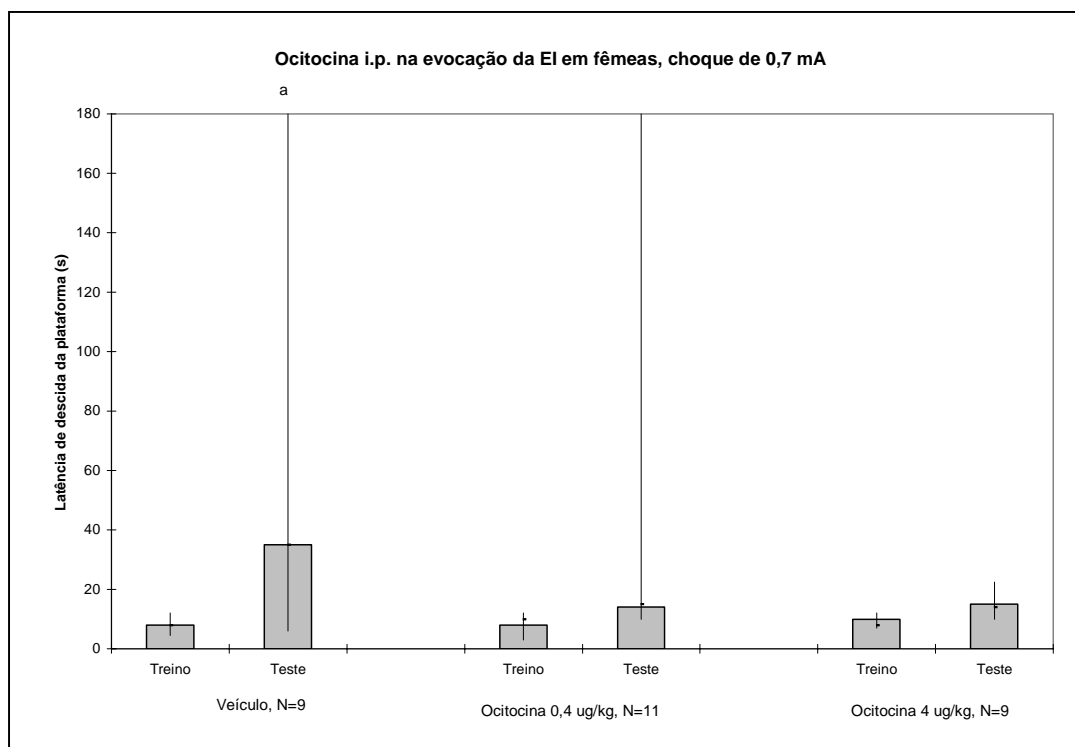


Fig. 4.8 - efeitos da administração intra-peritoneal de duas doses de ocitocina em fêmeas na evocação da memória de ratas fêmeas treinadas na esquiva inibitória com um choque de 0,7 mA. a: diferença significativa com relação ao treino ($P < 0,05$, teste de Wilcoxon).

Não houve diferença significativa entre os desempenhos dos grupos no treino ($P = 0,750$, teste de Kruskal-Wallis) e no teste ($P = 0,958$, teste de Kruskal-Wallis). Houve diferença significativa na comparação dos desempenhos no treino e no teste para o grupo-controle ($P = 0,038$, teste de Wilcoxon), mas não houve diferença significativa para os grupos que receberam ocitocina ($P = 0,075$ em ambos os casos, teste de Wilcoxon).

4.5 Experimentos relativos ao objetivo 5

4.5.1 Ocitocina i.p. 30 minutos no labirinto aquático de Morris com ratos machos

A figura 4.9 apresenta os efeitos da ocitocina 0,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ sobre a evocação na tarefa do labirinto aquático de Morris.

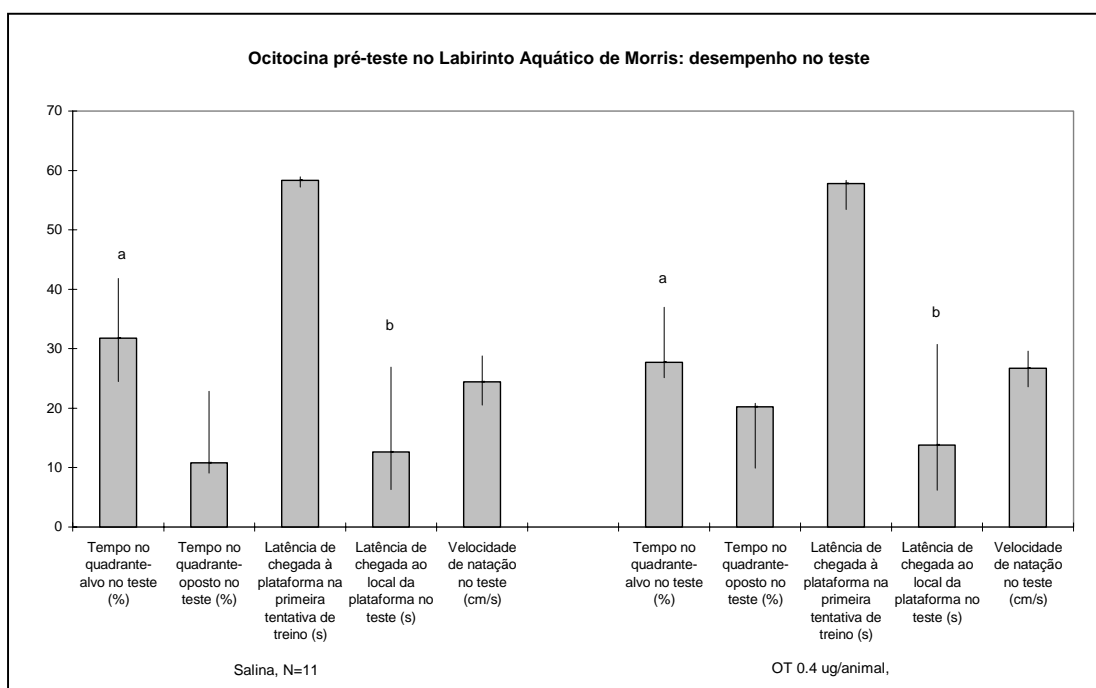


Fig. 4.9 - efeitos da administração i.p. de ocitocina 0,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ no desempenho de ratos machos treinados na tarefa do labirinto aquático de Morris. a: diferença significativa com relação ao tempo no quadrante-alvo ($P < 0,05$, teste de Wilcoxon); b: diferença significativa com relação ao tempo na primeira tentativa de treino ($P < 0,05$, teste de Wilcoxon).

Não houve diferença significativa entre os grupos em qualquer um dos parâmetros: tempo no quadrante-alvo no teste ($P = 0,748$, teste U de Mann-Whitney), tempo no quadrante oposto no teste ($P = 0,519$, teste U de Mann-Whitney), latência de chegada a plataforma na primeira tentativa de treino ($P = 0,217$, teste U de Mann-Whitney), latência de

chegada ao local da plataforma no teste ($P=0,898$, teste U de Mann-Whitney) e velocidade de natação no teste ($P=0,300$, teste U de Mann-Whitney).

Houve diferença significativa na comparação da latência de chegada ao local da plataforma na primeira tentativa de treino e no teste ($P=0,003$ para ambos os grupos, teste de Wilcoxon). Também houve diferença significativa no tempo gasto no quadrante-alvo no teste em comparação ao quadrante-oposto ($P=0,021$ para o grupo-controle e $P=0,006$ para o grupo que recebeu OT $0,4 \mu\text{g}/\text{kg}$, teste de Wilcoxon)

4.5.2 Ocitocina em duas doses i.p. pré-teste na habituação ao campo aberto com ratos machos

A figura 4.10 apresenta os efeitos da ocitocina 0,4 e 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ sobre a evocação na tarefa de habituação ao campo aberto.

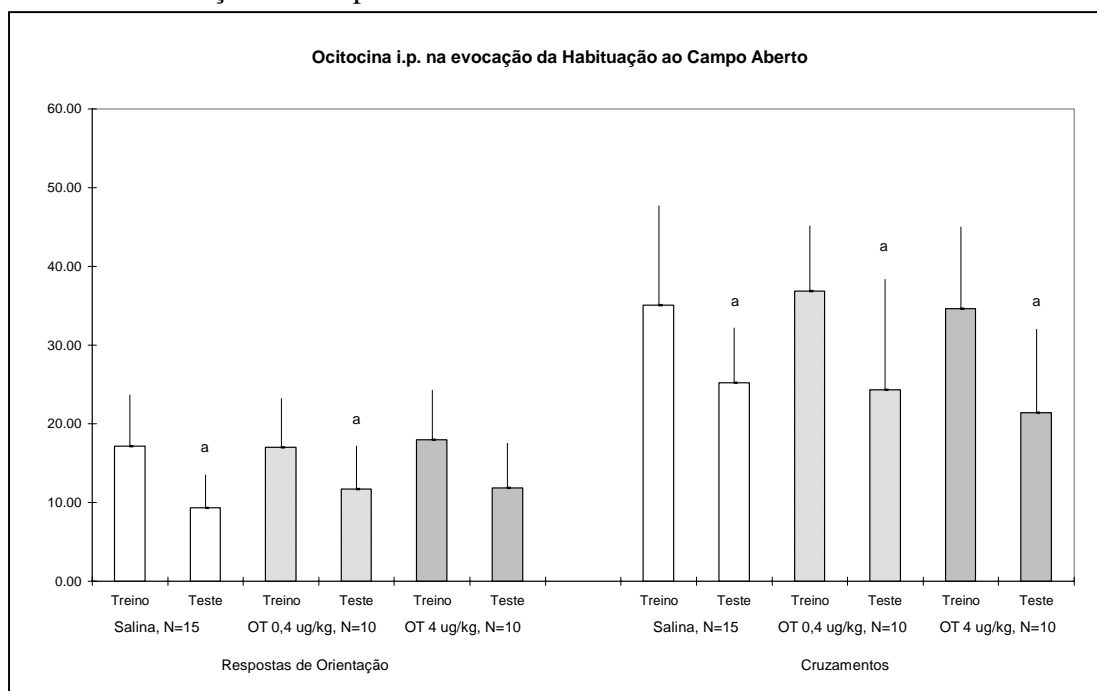


Fig. 4.10 - efeitos da administração i.p. de duas doses de ocitocina no desempenho de ratos machos treinados na tarefa da habituação em campo aberto. a: diferença significativa com relação ao treino ($P < 0,05$, teste t pareado).

Não houve diferença entre os grupos em nenhum parâmetro no teste ($P = 0,365$ para respostas de orientação, $P = 0,666$ para cruzamentos, ANOVA). Na comparação entre o desempenho no treino e no teste de cada grupo, houve diferença em todos os casos ($P < 0,05$, teste t pareado), com exceção do grupo que recebeu ocitocina 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($P = 0,052$, teste t pareado).

4.6 Experimentos relativos ao objetivo 6

4.6.1 Ocitocina em quatro doses i.p. pré-teste no labirinto em cruz elevado com ratos machos

A figura 4.11 apresenta os efeitos da ocitocina na tarefa do labirinto em cruz elevado.

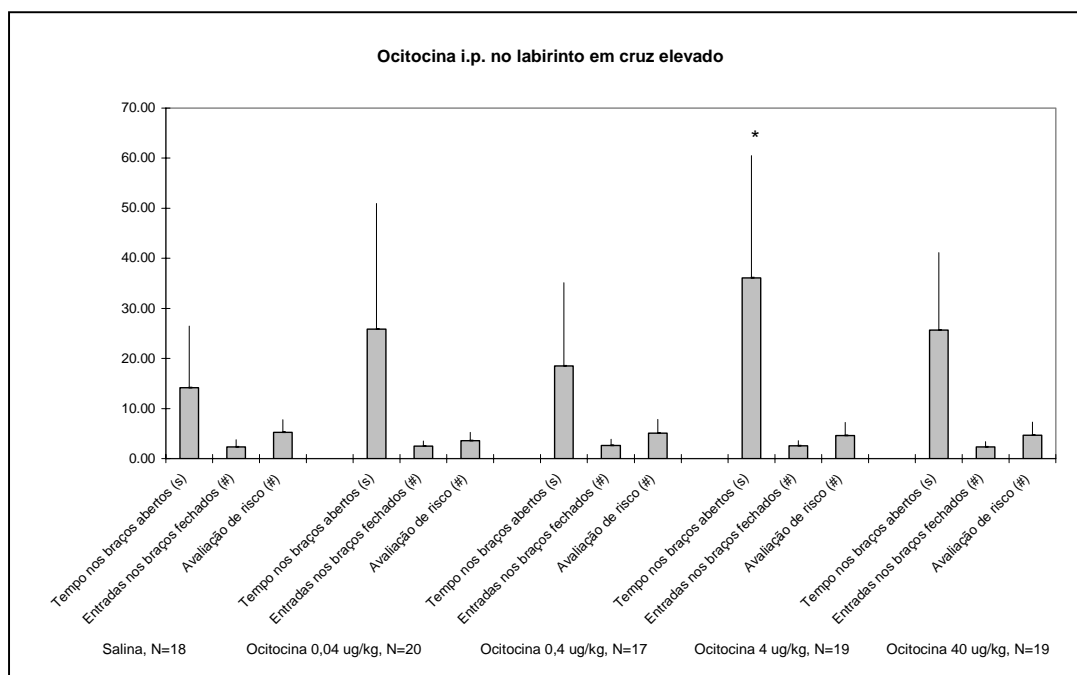


Fig. 4.11 - efeitos da administração i.p. de quatro doses de ocitocina em machos testados no labirinto em cruz elevado. *: diferença significativa com relação ao treino ($P=0,004$, teste de Dunnet).

O teste ANOVA indica que pelo menos um grupo foi diferente dos outros com relação ao tempo nos braços abertos ($P=0,014$). O teste *post-hoc* indica que o grupo que recebeu ocitocina 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ foi diferente do grupo-controle ($P=0,004$, teste de Dunnet). Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos com relação ao número de entradas nos braços fechados ($P=0,905$, ANOVA) ou no número de avaliações de risco ($P=0,290$, ANOVA).

4.6.2 Ocitocina em quatro doses i.p. pré-teste no labirinto em cruz elevado com ratas fêmeas

A figura 4.12 apresenta os efeitos da ocitocina na tarefa do labirinto em cruz elevado com fêmeas.

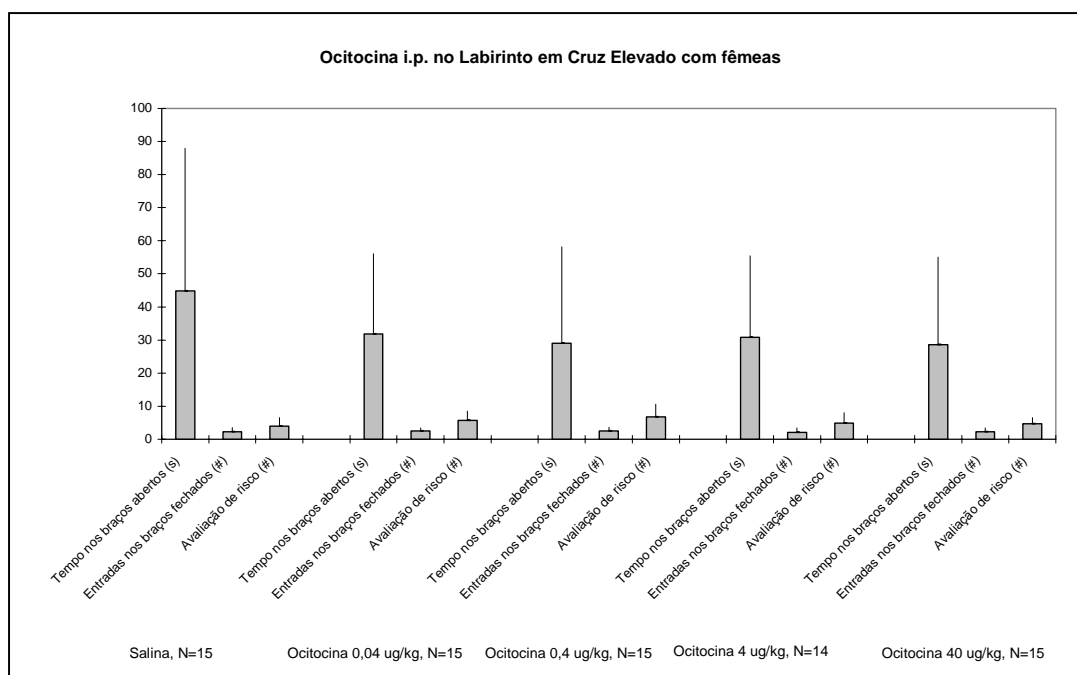


Fig. 4.12 - efeitos da administração i.p. de quatro doses de ocitocina em fêmeas testadas no labirinto em cruz elevado.

Não houve diferença significativa na comparação entre os grupos em nenhum dos parâmetros testados: tempo nos braços abertos ($P=0,572$, ANOVA), número de entradas nos braços fechados ($P=0,842$, ANOVA) e número de avaliações de risco ($P=0,101$, ANOVA).

4.7 Experimentos relativos ao objetivo 7

4.7.1 Ocitocina i.p. e escopolamina intra-hipocampal pré-teste na esQUIVA inibitória com ratos machos

A figura 4.13 apresenta os efeitos da administração conjunta ou isolada de ocitocina 0,4 µg/kg i.p. e metil-escopolamina 0,5 µg/lado intra-hipocampal sobre a evocação da EI com um choque de 0,5 mA.

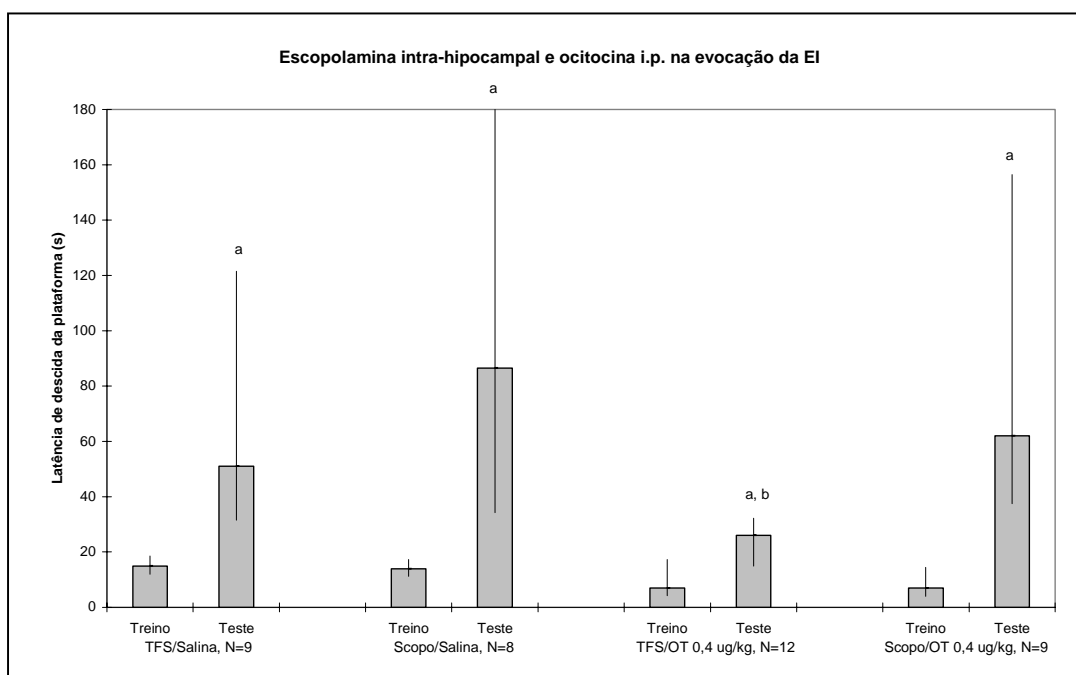


Fig. 4.13 - efeitos da administração i.p. de ocitocina e intra-hipocampal de metil-escopolamina na evocação da memória de ratos machos treinados na esQUIVA inibitória com um choque de 0,5 mA. a: diferença significativa com relação ao treino ($P < 0,05$, teste de Wilcoxon); b: diferença significativa com relação ao veículo ($P < 0,05$, teste de Dunn).

Não houve diferença significativa entre os desempenhos dos grupos no treino ($P = 0,065$, teste de Kruskal-Wallis), mas houve pelo menos um grupo diferente dos outros no teste ($P = 0,005$, teste de Kruskal-Wallis). O teste *post-hoc* indica que o grupo que recebeu OT 0,4 µg/kg difere do controle ($P < 0,05$, teste de Dunn).

Houve diferença significativa na comparação dos desempenhos no treino e no teste para todos os grupos ($P < 0,05$, teste de Wilcoxon).

4.7.2 Ocitocina i.p. e MT3 intra-hipocampal pré-teste na esquiiva inibitória com ratos machos

A figura 4.14 apresenta os efeitos da administração conjunta ou isolada de ocitocina 0,4 µg/kg i.p. e MT3 0,5 µg/lado intra-hipocampal sobre a evocação da EI com um choque de 0,5 mA.

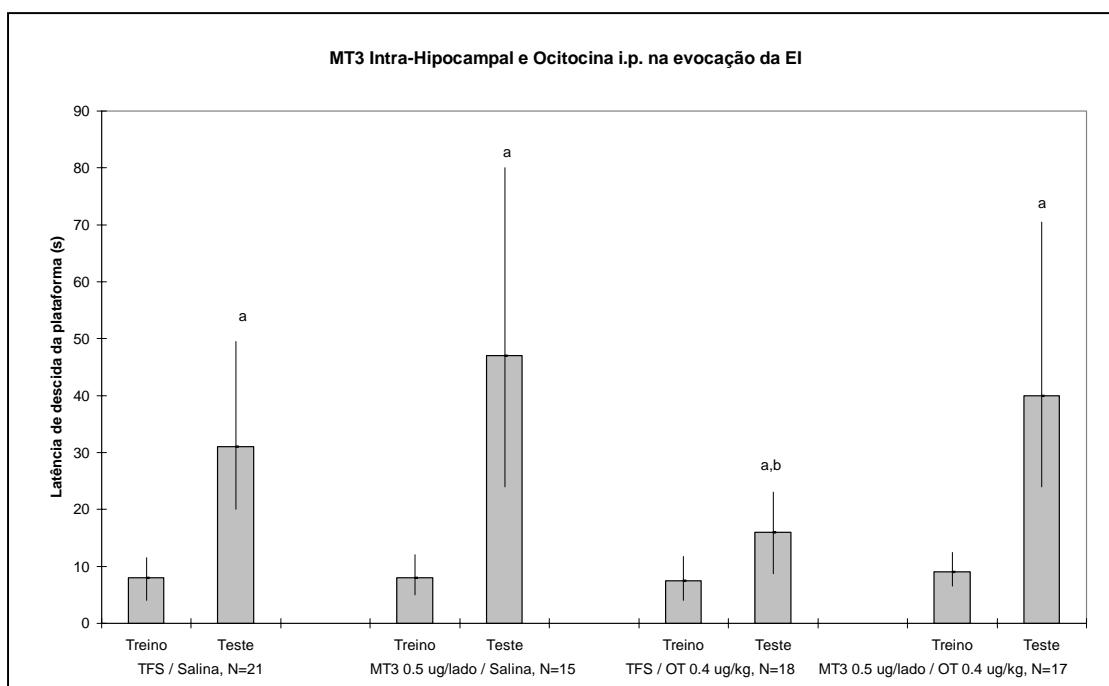


Fig. 4.14 - efeitos da administração i.p. de ocitocina e intra-hipocampal de MT3 na evocação da memória de ratos machos treinados na esquiiva inibitória com um choque de 0,5 mA. a: diferença significativa com relação ao treino ($P < 0,05$, teste de Wilcoxon); b: diferença significativa com relação ao veículo ($P < 0,05$, teste de Dunn).

Não houve diferença significativa entre os desempenhos dos grupos no treino ($P = 0,941$, teste de Kruskal-Wallis), mas houve pelo menos um grupo diferente dos outros no teste ($P = 0,002$, teste de Kruskal-Wallis). O teste *post-hoc* indica que o grupo que recebeu OT 0,4 µg/kg difere do controle ($P < 0,05$, teste de Dunn).

Houve diferença significativa na comparação dos desempenhos no treino e no teste para todos os grupos ($P < 0,05$, teste de Wilcoxon).

4.8 Experimento relativo ao objetivo 8

4.8.1 Ocitocina e dexametasona i.p. pré-teste na esquiiva inibitória com ratos machos

A figura 4.15 apresenta os efeitos da administração conjunta ou isolada de ocitocina 0,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.p. e dexametasona 0,02 mg/kg i.p. sobre a evocação da EI com um choque de 0,5 mA.

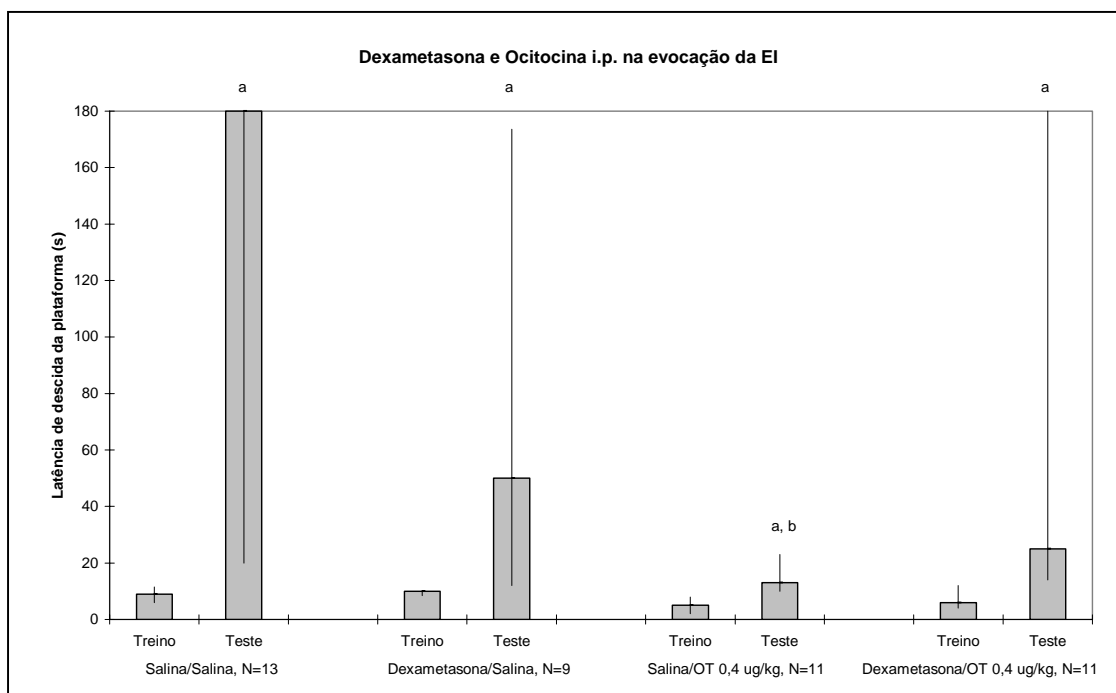


Fig. 4.15 - efeitos da administração i.p. de ocitocina e/ou dexametasona na evocação da memória de ratos machos treinados na esquiiva inibitória com um choque de 0,5 mA. a: diferença significativa com relação ao treino ($P < 0,05$, teste de Wilcoxon); b: diferença significativa com relação ao veículo ($P < 0,02$, teste de Dunn).

Não houve diferença significativa entre os desempenhos dos grupos no treino ($P = 0,072$, teste de Kruskal-Wallis), mas houve pelo menos um grupo diferente dos outros no teste ($P = 0,034$, teste de Kruskal-Wallis). O teste *post-hoc* indica que o grupo que recebeu OT 0,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ difere do grupo-controle ($P < 0,02$, teste de Dunn).

Houve diferença significativa na comparação dos desempenhos no treino e no teste para todos os grupos ($P < 0,05$, teste de Wilcoxon).

4.9 Experimento relativo ao objetivo 9

4.9.1 Ocitocina i.p. e timolol intra-hipocampal pré-teste na esQUIVA inibitória com ratos machos

A figura 4.16 apresenta os efeitos da administração conjunta ou isolada de ocitocina 0,4 µg/kg i.p. e timolol 0,0125 µg/lado intra-hipocampal sobre a evocação da EI com um choque de 0,5 mA.

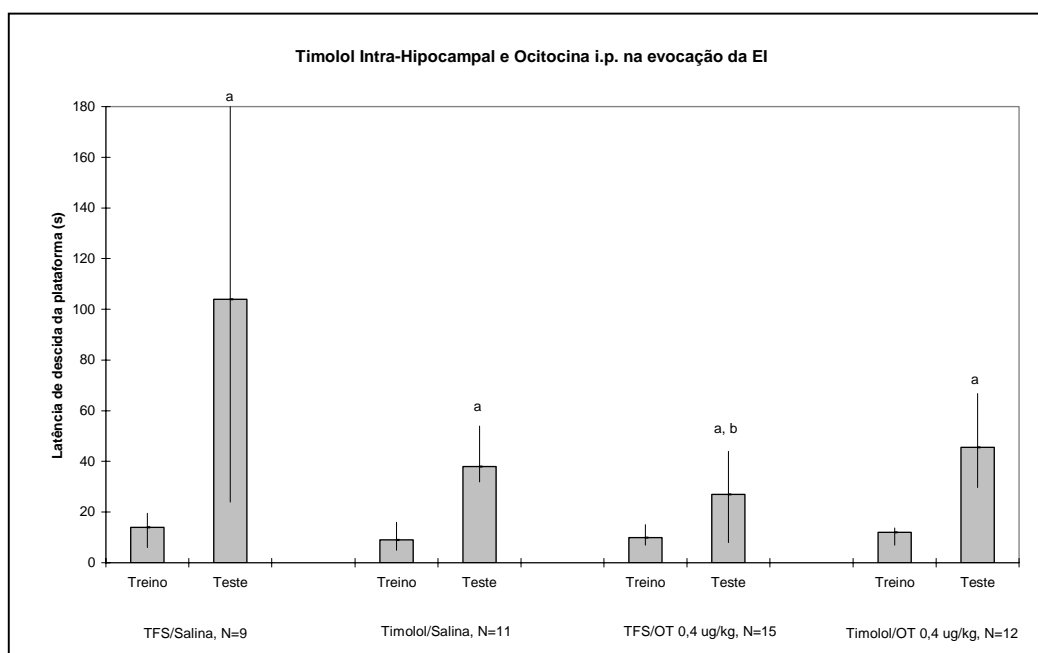


Fig. 4.16 - efeitos da administração i.p. de ocitocina e intra-hipocampal de timolol na evocação da memória de ratos machos treinados na esQUIVA inibitória com um choque de 0,5 mA. a: diferença significativa com relação ao treino ($P < 0,05$, teste de Wilcoxon); b: diferença significativa com relação ao veículo ($P < 0,02$, teste de Dunn).

Não houve diferença significativa entre os desempenhos dos grupos no treino ($P = 0,940$, teste de Kruskal-Wallis), mas houve pelo menos um grupo diferente dos outros no teste ($P = 0,022$, teste de Kruskal-Wallis). O teste *post-hoc* indica que o grupo que recebeu OT 0,4 µg/kg difere do controle ($P < 0,02$, teste de Dunn).

Houve diferença significativa na comparação dos desempenhos no treino e no teste para todos os grupos ($P < 0,05$, teste de Wilcoxon).

4.10 Interpretação dos resultados

As figuras 4.1, 4.2 e 4.3 indicam que, independentemente da intensidade do choque utilizada no treino, não houve quaisquer efeitos da ocitocina i.p. sobre a consolidação da memória da EI em ratos machos. Todos os grupos aprenderam a tarefa. **(Objetivo 1)**

A figura 4.4 indica que a ocitocina i.p. não apresentou efeito sobre a evocação da memória da EI quando os animais foram treinados com um choque de 0,25 mA, e todo grupos aprenderam a tarefa. Entretanto, quando a intensidade de choque no treino foi de 0,5 mA (experimento 4.5), a dose de 0,4 µg/kg foi capaz de prejudicar a evocação de maneira robusta, pois os animais que receberam esta dose foram estatisticamente diferentes do controle e não apresentaram diferenças treino-teste significativas em seu desempenho. **(Objetivo 2)**

A figura 4.6 indica que a ocitocina i.p., nas doses de 0,04 e 0,4 µg/kg, teve um efeito amnésico sobre a consolidação da memória da EI em ratas. **(Objetivo 3)**

A figura 4.7 indica que a ocitocina i.p. não apresentou efeito sobre a evocação da memória da EI de ratas fêmeas quando os animais foram treinados com um choque de 0,5 mA. Entretanto, quando a intensidade de choque foi de 0,7 mA (figura 4.8), a OT foi capaz de impedir a evocação. **(Objetivo 4)**

A figura 4.9 indica que, pelo menos na dose testada, 0,4 µg/kg, a ocitocina i.p. não apresentou efeitos sobre a evocação da memória de ratos machos treinados no labirinto aquático de Morris. **(Objetivo 5)**

A figura 4.10 mostra que a ocitocina i.p., na dose de 4 µg/kg, parece ter tido um efeito amnésico parcial em ratos machos treinados na tarefa de habituação ao campo aberto, identificado pela ausência de diferença no número respostas de orientação entre treino e teste. A dose de 0,4 µg/kg não teve qualquer efeito. **(Objetivo 5)**

A figura 4.11 indica que a dose de 4 µg/kg de ocitocina i.p. resultou em efeitos ansiolíticos em machos no labirinto em cruz elevado. As outras doses não apresentaram efeito. **(Objetivo 6)**

A figura 4.12 indica que a ocitocina não apresentou efeitos em fêmeas no labirinto em cruz elevado. **(Objetivo 6)**

A figura 4.13 mostra a reversão do efeito amnésico da ocitocina 0,4 µg/kg i.p. sobre a evocação da memória da EI com uma dose sem efeito próprio de escopolamina intra-hipocampal, um antagonista não-seletivo dos receptores muscarínicos. Todos os grupos aprenderam a tarefa. **(Objetivo 7)**

A figura 4.14 mostra a reversão do efeito amnésico da ocitocina 0,4 µg/kg i.p. sobre a evocação da memória da EI com uma dose sem efeito próprio de MT3 intra-hipocampal, um antagonista seletivo para os receptores muscarínicos do tipo M4. Todos os grupos aprenderam a tarefa. **(Objetivo 7)**

A figura 4.15 mostra a reversão do efeito amnésico da ocitocina 0,4 µg/kg i.p. sobre a evocação da memória da EI com uma dose sem efeito próprio de dexametasona i.p., um glicocorticoide sintético. Todos os grupos aprenderam a tarefa. **(Objetivo 8).**

A figura 4.16 mostra a reversão do efeito amnésico da ocitocina 0,4 µg/kg i.p. sobre a evocação da memória da EI com uma dose sem efeito próprio de timolol intra-hipocampal, um antagonista não-seletivo dos receptores beta-adrenérgicos. Todos os grupos aprenderam a tarefa. **(Objetivo 9)**

5. Discussão

5.1 O papel da ocitocina na consolidação e na evocação da memória em ratos machos

Os resultados obtidos com a administração pré-teste de ocitocina i.p. em ratos machos treinados na tarefa de esQUIVA inibitória sugerem um efeito amnésico deste hormônio sobre a evocação da esQUIVA inibitória quando administrado 30 minutos antes do teste. Esse efeito foi encontrado com animais treinados com um choque de 0,5 mA, mas não com aqueles treinados com um estímulo menos intenso (0,25 mA). Isto sugere que é necessário um certo grau de “aversividade” durante a fase de aquisição para que a ocitocina seja capaz de exercer seu efeito amnésico sobre a evocação. A explicação para tal necessidade pode estar relacionada aos efeitos da ocitocina sobre a percepção do perigo.

A literatura aponta para um papel da ocitocina sobre a percepção de situações perigosas ou estressantes (Porges, 2001). Doses sistêmicas de ocitocina são capazes de diminuir a liberação de glicocorticóides a partir da adrenal (Scantamburlo *et al.*, 2001), promovendo um estado de relaxamento e de resposta reduzida a agentes estressores (Uvnas-Moberg, 1997), além de diminuir os níveis circulantes de ACTH (Legros *et al.*, 1987, Legros *et al.*, 1988). Da mesma maneira, estímulos não-aversivos, como toque, leve pressão e temperatura morna, resultam em um aumento na liberação de ocitocina (Uvnas-Moberg, 1997). Ou seja, a OT parece fazer parte de uma alça de retroalimentação que é ativada em situações não-estressantes: ela seria liberada em resposta a estímulos não-aversivos e promoveria um *milieu* hormonal anti-estresse. Desse modo, podemos sugerir a hipótese de que, no experimento com um choque de 0,25 mA, o estímulo não tenha sido aversivo o suficiente para mobilizar o sistema de hormônios de estresse, e, deste modo, a ocitocina não teria substrato sobre o qual atuar durante a evocação da memória da EI.

Pode-se observar ainda que, no experimento em que os animais foram treinados com um choque de 0,5 mA, apenas a dose de 0,4 µg/kg de ocitocina foi amnésica. A dose mais baixa, 0,04 µg/kg, provavelmente não foi alta o suficiente para exercer qualquer efeito, enquanto que a ocitocina em doses maiores, 4 e 40 µg/kg, possivelmente já estivesse atuando no receptor da vassopressina, pelo qual a ocitocina também possui afinidade, ainda

que mais reduzida (Gimpl e Farenholz, 2001), e que apresenta efeitos sabidamente opostos aos da ocitocina sobre a memória (Kovacs *et al.*, 1979, Bohus, 1980).

Por outro lado, não encontramos quaisquer efeitos da ocitocina i.p. sobre a consolidação da memória da EI em machos, independentemente da intensidade do estímulo usado no treino (0,25, 0,5 ou 0,7 mA). Este resultado aponta para uma diferença entre os papéis da ocitocina i.p. na consolidação e na evocação da memória, pelo menos em ratos machos.

A ausência de efeitos sobre a consolidação na EI contrasta com o relatado pela literatura com camundongos. Como mencionado na introdução, a ocitocina i.p., nas doses de 0,1 e 0,3 µg/kg, tem efeito amnésico sobre a consolidação da memória da EI em camundongos machos (Boccia *et al.*, 1998, Boccia e Baratti, 2000). Uma vez que a ocitocina parece exercer seus efeitos sobre a memória modulando a percepção do medo durante a tarefa, pode-se sugerir que, em camundongos machos, a administração de OT imediatamente após o treino faz com que os animais percebam a situação de treino como menos estressante do que os animais que receberam solução salina, e consolidem a memória de maneira menos intensa. Por outro lado, ratos machos podem ser menos sensíveis à sinalização de ambiente seguro pela ocitocina na consolidação, e/ou outros mecanismos podem estar ativos indicando que o aparato de treino é estressante/perigoso (McIntyre *et al.*, 2003, Roozendaal, 2002, McGaugh e Roozendaal, 2002), anulando quaisquer efeitos da ocitocina.

Este também pode ser o motivo pelo qual encontramos um efeito amnésico para a ocitocina sobre a evocação da memória da EI, mas não sobre a consolidação. É possível que, durante a consolidação, algum sistema, ativado em resposta ao choque recebido no treino, esteja sinalizando “ambiente perigoso” e contra-balançando a sinalização de “ambiente seguro” da ocitocina exógena, o que resultaria na consolidação da memória apesar da administração da OT. Esta hipótese, porém, ainda depende de confirmação experimental.

5.2 O papel da ocitocina na consolidação e na evocação da memória em ratas fêmeas

Assim como com os machos, a ocitocina i.p teve um efeito amnésico sobre a evocação da memória da EI, mas apenas quando as ratas fêmeas foram treinadas com um choque de 0,7 mA. No experimento com a intensidade de 0,5 mA, a ocitocina não teve qualquer efeito sobre a evocação.

É importante observar que o efeito amnésico da ocitocina sobre a evocação da EI em fêmeas foi identificado pela ausência de diferença significativa na comparação, com o teste de Wilcoxon, entre o desempenho no treino e no teste dos animais que receberam OT. Porém, a comparação do desempenho dos vários grupos no teste da EI pelo teste estatístico de Kruskal-Wallis não apontou diferença entre os grupos. Por outro lado, o grupo-controle apresentou diferença significativa na comparação, pelo teste de Wilcoxon, do seu desempenho no treino e no teste da EI, indicando que estes animais aprenderam a tarefa. Os animais que receberam ocitocina i.p. 30 minutos antes do teste da EI não apresentaram diferença treino-teste, ou seja, não aprenderam a tarefa. Nos experimentos com machos, o efeito amnésico é mais comumente identificado na comparação dos desempenhos no teste da EI de todos os grupos pelo teste estatístico de Kruskal-Wallis. A menor eficiência deste teste no caso das fêmeas provavelmente se deve à maior dispersão dos dados decorrente dos efeitos cognitivos característicos das diferentes fases do ciclo estral (Sfikakis *et al.*, 1978, Jonasson, 2005). Apesar das diferenças nas intensidade de choque no treino necessárias para que a ocitocina tivesse efeito amnésico, pode-se traçar um paralelo com os resultados obtidos com machos na evocação da memória da EI. Em fêmeas treinadas com um estímulo intenso (0,7 mA), a ocitocina teve efeitos amnésicos; em ratas treinadas com um choque menor (0,5 mA), nenhum efeito foi encontrado. Em machos, uma correlação análoga entre intensidade de choque no treino e efeitos da OT na evocação foi identificada. Dessa maneira, independente do sexo, a ocitocina parece requerer um certo nível de aversividade durante a fase de aquisição da memória para que possa exercer seus efeitos sobre a evocação. Estímulos aversivos pouco intensos durante a aquisição fazem com que a ocitocina não apresente efeitos sobre a evocação.

Entretanto, ao contrário do verificado com ratos machos, a ocitocina produziu efeitos amnésicos também sobre a consolidação da memória da EI. Novamente, tais efeitos foram identificados pela ausência de diferença significativa entre o desempenho no treino e no teste dos animais que receberam ocitocina (nas doses de 0,04 e 0,4 µg/kg). É importante

observar que a dose de 0,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de OT é a mesma que teve um efeito consistente sobre a evocação da memória, tanto em machos como em fêmeas, e é próxima de uma das doses (0,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$) relatada como amnésica em camundongos na consolidação (Boccia *et al.*, 1998, Boccia e Baratti, 2000).

O efeito amnésico da ocitocina i.p. encontrado para fêmeas sobre a consolidação da EI, similar ao encontrado com camundongos machos por Boccia e colaboradores (1998), reforça a idéia de que, especificamente em ratos machos, algum outro mecanismo (McIntyre *et al.*, 2003, Roozendaal, 2002, McGaugh e Roozendaal, 2002) deve estar contra-balançando os efeitos anti-estresse da OT e indicando o ambiente da caixa EI como estressante/perigoso.

A tabela abaixo resume os resultados discutidos até aqui.

Tabela 5.1 - efeitos da ocitocina sistêmica sobre a memória na Esquiva Inibitória

Momento da administração	Machos	Fêmeas
Pós-treino	Sem efeito	Amnésica
Pré-teste	Amnésica	Amnésica

5.3 O papel da ocitocina na evocação da memória na tarefa do labirinto aquático de Morris e na habituação ao campo aberto em ratos machos

Diferentemente do que encontramos para a evocação da EI, a dose de 0,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pré-teste não teve quaisquer efeitos no labirinto aquático de Morris (fig. 4.9).

Poderíamos sugerir que o labirinto aquático não tem um componente suficientemente aversivo durante suas aquisição e consolidação para que a ocitocina apresente efeitos sobre a evocação. Essa possibilidade é coerente com os resultados encontrados para a administração pré-teste de ocitocina na EI: a ocitocina não teve efeito quando os animais foram treinados com uma intensidade de choque reduzida, menos aversiva (0,25 mA para ratos machos, 0,5 mA para fêmeas). É possível, porém, que não

tenhamos encontrado efeito para a OT no labirinto aquático por termos utilizado apenas uma única dose no experimento.

Os resultados do experimento de habituação ao campo aberto são coerentes com os do labirinto aquático. Com relação ao parâmetro do número de cruzamentos, os três grupos experimentais (Salina, OT 0,4 e 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$) demonstraram ter aprendido a tarefa, pois os animais realizaram menos cruzamentos no teste do que no treino. O outro parâmetro que indica aprendizado, o número de respostas de orientação, foi significativamente menor no teste do que no treino para os animais que receberam salina ou OT 0,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, mas apresentou apenas tendência à diferença significativa para o grupo que recebeu OT 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Uma vez que o P do teste de Wilcoxon para este grupo foi igual a 0,052 e o número de animais é relativamente baixo, é possível que, neste caso, esteja ocorrendo um erro beta ou de Tipo II, ou seja, uma diferença real não esteja sendo detectada. Também é possível que, já que a dose de 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de OT apresentou efeitos ansiolíticos em ratos machos (ver discussão a respeito na seção 5.4), o aparente efeito amnésico parcial para esta dose na habituação ao campo aberto seja, na realidade, a manifestação da redução da ansiedade dos animais infundidos com ela, e não um efeito específico sobre a memória. Dessa maneira, permaneceria válida a observação de que a ocitocina não possui efeitos sobre a memória de tarefas não-aversivas

Mas é importante ressaltar que, além da ocitocina não ter tido efeitos marcantes sobre a evocação da memória nessas tarefas, ela também não afetou o nível de atividade motora dos animais. No labirinto aquático, a velocidade de natação no teste foi igual para ambos os grupos, Salina e OT; no campo aberto, o número de cruzamentos também foi igual em todos os grupos. Ou seja, a ocitocina nas doses testadas, incluindo a dose que promove amnésia na EI, não afeta a atividade locomotora dos animais.

5.4 Efeitos da ocitocina na tarefa do labirinto em cruz elevado

A tarefa do labirinto em cruz elevado é comumente utilizada para a avaliação do nível de ansiedade dos animais (Rodgers e Dalvi, 1997). Neste trabalho, ela foi utilizada para afastar a possibilidade que um efeito ansiolítico da ocitocina pudesse ser o responsável pelos seus efeitos sobre a memória.

De fato, encontramos um efeito ansiolítico apenas para a dose 4 µg/kg em machos, identificado por um maior tempo gasto nos braços abertos em comparação com os outros grupos. Este achado reproduz dados da literatura (McCarthy *et al.*, 1996), mas não compromete a interpretação dos outros resultados, uma vez que esta dose teve apenas um aparente efeito sobre o número de respostas de orientação na tarefa de habituação ao campo aberto com ratos machos. A dose de 0,4 µg/kg de ocitocina, que foi consistente amnésica sobre a evocação da EI, tanto em machos como em fêmeas, não apresentou qualquer efeito ansiolítico detectável no labirinto em cruz elevado.

Por outro lado, a ocitocina não teve qualquer efeito sobre a ansiedade em fêmeas testadas nessa tarefa. Este resultado sugere que, assim como há diferenças entre machos e fêmeas com relação ao papel da OT na consolidação, também há diferenças no que se refere ao efeito ansiolítico. Mais uma vez, isto se deve possivelmente a diferenças na percepção do perigo e na sensação de segurança entre machos e fêmeas.

5.5 O papel da ocitocina e a modulação colinérgica central da evocação da memória

Dois experimentos foram realizados para investigar o papel do sistema colinérgico, mais especificamente o dos receptores muscarínicos, no efeito amnésico da ocitocina sobre a evocação da memória da EI.

No primeiro, a infusão intra-hipocampal de metil-escopolamina, um antagonista não-seletivo dos receptores muscarínicos, em uma dose sem efeito próprio, reverteu o déficit na evocação da memória produzido pela ocitocina i.p. na dose de 0,4 µg/kg. Ou seja, o efeito amnésico da OT sistêmica sobre a evocação da EI parece se dar através do aumento da atividade colinérgica muscarínica hipocampal, uma vez que o bloqueio parcial dos receptores pela escopolamina foi capaz de reverter esse efeito.

Esse achado é contrário ao que se esperaria em virtude dos resultados de Boccia e Baratti (2000), em que os efeitos amnésicos da ocitocina sistêmica pós-treino sobre a consolidação da memória da EI foram revertidos com a administração de uma dose sem efeito próprio de fisostigmina, um agente anticolinesterásico de ação central. Ou seja, no caso da consolidação da memória, a ocitocina sistêmica pós-treino parece atuar diminuindo

a atividade colinérgica no sistema nervoso central, e a fisostigmina, ao aumentar a disponibilidade de acetilcolina, reverteria o efeito.

Entretanto, parece realmente haver diferenças fundamentais no papel do sistema colinérgico muscarínico entre a consolidação e a evocação, uma vez que, em nosso laboratório, a escopolamina, uma droga classicamente amnésica sobre a consolidação (Jerusalinsky *et al.*, 1998, entre outros trabalhos), teve um efeito robusto de facilitação da evocação da memória na EI (Diehl *et al.*, em preparação).

Na tentativa de verificar com maior precisão qual receptor muscarínico seria o responsável pelos efeitos amnésicos da ocitocina sobre a evocação, foi feita a administração intra-hipocampal de MT3, uma toxina extraída da peçonha da serpente *Dendroaspis angusticeps* (Mamba-Verde Africana), um antagonista seletivo para os receptores M4 (Jerusalinsky *et al.*, 1998). Assim como com a escopolamina, o efeito amnésico da ocitocina i.p. foi revertido com uma dose sem efeito próprio de MT3 infundida no hipocampo, o que sugere que é o aumento da ligação da acetilcolina nos receptores M4 hipocampais o responsável pela amnésia causada pela OT na evocação da memória da EI. Dados recentes de nosso laboratório também corroboram este achado, uma vez que a MT3 foi claramente facilitatória na evocação da memória da EI (Diehl *et al.*, em preparação). Já na consolidação, a literatura aponta para efeitos amnésicos tanto da escopolamina como da MT3 na EI (Ferreira *et al.*, 2003).

Essa diferença no papel da acetilcolina na consolidação e na evocação da memória parece se dever à localização dos receptores M4. Lanziotti *et al.* (em preparação) obtiveram a reversão do efeito amnésico da MT3 pós-treino intra-hipocampal na consolidação através da administração concomitante de bicuculina, um antagonista gabaérgico, em dose sub-efeito. Uma vez que os M4 são receptores pré-sinápticos metabotrópicos associados à proteína G_i (Felder, 1995), estes achados de nosso laboratório sugerem que, durante a consolidação da memória para a tarefa, os receptores se localizam em neurônios gabaérgicos e que sua função normal é a de diminuir a liberação de GABA quando ligado à acetilcolina. Seu bloqueio pela MT3 permite o aumento da liberação desse neurotransmissor, o que resulta no efeito amnésico dessa toxina na consolidação. A administração de bicuculina, em uma dose sem efeito próprio, simultaneamente à MT3 bloqueia os receptores gabaérgicos que seriam ocupados pela liberação aumentada de

GABA ocasionada pela MT3, revertendo, assim, o efeito desta (Lanziotti *et al.*, em preparação).

Com relação à evocação, uma vez que a MT3 tem efeito contrário, é facilitatória, Diehl *et al.*(em preparação) sugerem que o receptor M4 passaria, após a consolidação, a ser expresso em neurônios glutamatérgicos, possivelmente nos terminais axonais (já que é um receptor pré-sináptico) das células piramidais de CA3 que projetam para CA1, a região visada em nossos experimentos intra-hipocampais. Nesse caso, o efeito da MT3, ao bloquear os receptores M4, seria o de aumentar a liberação de glutamato, promovendo a facilitação da memória. Tal hipótese, entretanto, ainda carece de confirmação experimental.

Os resultados desta tese, tomados em conjunto com a literatura e os dados recentes mencionados acima (Lanziotti *et al.*, em preparação, Diehl *et al.*, em preparação), permitem traçar o seguinte quadro:

	Consolidação	Evocação
Ocitocina sistêmica	↓ACo ↓Memória (camundongos machos: Boccia e Baratti, 2000; ratas fêmeas: nesta tese)	↑ ACo ↓ Memória (esta tese)
MT3 intra-hipocampal	↓ Lig. ACo em M4 ↓Memória (Ferreira et al., 2003)	↓ Lig. ACo em M4 ↑Memória (Diehl et al., em prep.)

Se este quadro é válido, pode-se sugerir que a ação da ocitocina i.p. sobre a consolidação da memória também se daria através dos receptores muscarínicos M4. Na consolidação, a diminuição da atividade colinérgica após a administração sistêmica de OT (Boccia e Baratti, 2000) resultaria em uma menor ocupação dos receptores M4, localizados em neurônios gabaérgicos (Lanziotti *et al.*, em preparação). Sem a atividade inibitória do receptor M4, mais GABA é liberado, e os animais que receberam OT têm prejudicada a consolidação da memória da EI. É importante notar que o fato de não termos encontrado efeitos da OT na consolidação da memória em ratos machos não significa que o mecanismo proposto acima (ação via M4) esteja ausente. Como mencionado na seção 5.1, é possível

que os efeitos da OT sobre a consolidação em machos não sejam aparentes devido à participação de algum sistema acessório de sinalização de “situação estressante”.

Por outro lado, na evocação, a ocitocina parece provocar um aumento da atividade colinérgica, o que leva a uma maior ocupação dos receptores M4, que nesse caso estariam presentes em neurônios glutamatérgicos, conforme propõe Diehl *et al.* (em preparação). Com a ação inibitória do M4 aumentada, menos glutamato seria liberado, com o conseqüente efeito amnésico. Nossos resultados são consistentes com essa hipótese, uma vez que a MT3 intra-hipocampal, em dose sem efeito próprio, reverteu os efeitos amnésicos da OT sistêmica.

Um ponto relevante é que a ocitocina só teve efeito sobre a evocação da memória na esQUIVA inibitória, uma tarefa aversiva, e teve pouco ou nenhum efeito em tarefas menos aversivas, como o labirinto aquático e a habituação ao campo aberto. Isso também pode estar relacionado ao papel do receptor M4, uma vez que Ferreira *et al.* (2003) identificaram a falta de atividade da MT3 infundida no hipocampo sobre a consolidação da memória na tarefa de habituação ao campo aberto. Ou seja, os receptores M4 hipocampais parecem exigir um certo nível de aversividade na tarefa para que sejam recrutados, e tarefas menos aversivas não seriam capazes de fazê-lo. Da mesma forma, como já apontamos antes, a ocitocina parece requerer um certo nível de aversividade na tarefa para que possa exercer seus efeitos sobre a evocação da memória, hipótese que merece ser investigada mais a fundo.

5.6 Ocitocina, glicocorticóides e memória

Como mencionamos anteriormente, a ocitocina não cruza a barreira hematoencefálica de maneira significativa (Kang e Park, 2000), e seus efeitos sobre a memória necessariamente se dão de maneira indireta. Desse modo, é importante identificar a maneira através da qual a OT é capaz de influenciar o SNC, e, em particular, a mediação muscarínica via receptor M4..

Uma vez que a administração sistêmica de ocitocina é capaz de modular negativamente a liberação de glicocorticóides (GC) a partir da adrenal (Legros *et al.*, 1987,

Legros *et al.*, 1988), testou-se o envolvimento dos glicocorticóides no efeito amnésico da ocitocina i.p. sobre a evocação memória na EI.

De fato, a figura 4.15 mostra a reversão do efeito amnésico de uma dose de 0,4 µg/kg de ocitocina i.p por uma dose sem efeito próprio de dexametasona i.p., um glicocorticóide sintético. Dessa maneira, pode-se sugerir que os efeitos da ocitocina sistêmica sobre a evocação da memória poderiam estar se dando através da redução na liberação de glicocorticóides.

Mais ainda: de alguma forma, esta queda nos glicocorticóides é capaz de elevar a atividade colinérgica hipocampal. Uma vez que os GC cruzam a barreira hematoencefálica com facilidade, pode-se supor que sejam capazes de influenciar tanto a atividade dos neurônios colinérgicos na coluna colinérgica rostral do prosencéfalo, incluindo o septo medial, que projeta para o hipocampo (Paxinos, 1994), como também modular a liberação deste neurotransmissor a partir de terminais axonais no hipocampo. Esta seria, enfim, a “alça” mediadora do efeito da OT administrada periféricamente, elo há muito procurado por diversos pesquisadores, como, aliás, enfatizado por McEwen (2005) em sua exaustiva revisão.

Os glicocorticóides, quando administrados exogenamente ou liberados pela adrenal em resposta a estímulos estressores, têm um efeito deletério sobre a evocação da memória (Roosendaal *et al.*, 2003). Entretanto, um nível mínimo de glicocorticóides circulantes parece ser necessário para a evocação, pois a queda destes em resposta a administração de ocitocina parece levar ao aumento referido acima na atividade colinérgica no hipocampo, o que, por sua vez, causa déficit de aprendizado. Essa aparente contradição pode ser explicada quando consideramos os dois tipos de receptores aos quais os GC se ligam: o Tipo I, também chamado de Receptor Mineralocorticóide, e o Tipo II, também chamado de Receptor Glicocorticóide (Lupien e McEwen, 1997). Os GC se ligam a ambos, mas com diferentes afinidades (Lupien e McEwen, 1997, Conrad *et al.*, 1997). Em níveis basais de corticosteróides circulantes, os receptores do Tipo I encontram-se saturados devido à sua alta afinidade pelos GC, enquanto que os do Tipo II encontram-se pouco ligados. Dessa maneira, os receptores do Tipo II seriam capazes de detectar aumentos nos níveis de glicocorticóides, enquanto os do Tipo I seriam responsáveis por sinalizar a presença de um tônus de GC (Conrad *et al.*, 1997). Sendo assim, podemos sugerir que os efeitos amnésicos

sobre a evocação da memória causados pela administração exógena de glicocorticóides (Roosendaal *et al.*, 2003) se dariam através dos receptores do Tipo II, enquanto que reduzidos níveis de GC circulante causariam os efeitos que encontramos nesta tese através da menor ocupação dos receptores do Tipo I. Essa hipótese é testável e deverá ser investigada em estudos futuros.

5.7 O papel da ocitocina e a modulação adrenérgica central da evocação da memória

Um experimento com a administração intra-hipocampal de uma dose sub-efetiva de timolol, um antagonista dos receptores beta-adrenérgicos, foi realizado com a intenção de investigar o papel da modulação adrenérgica no hipocampo sobre os efeitos da ocitocina na evocação da memória da EI. De fato, o timolol foi capaz de reverter os efeitos da ocitocina, sugerindo que a atividade adrenérgica intra-hipocampal é necessária para que a ocitocina exógena provoque seu efeito amnésico.

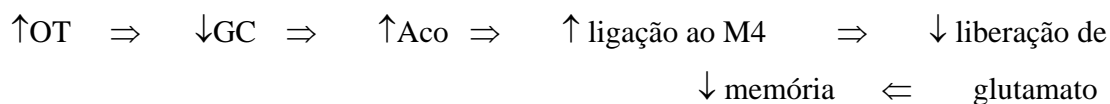
A literatura relata que o timolol, quando administrado no hipocampo antes do teste na dose de 0,3 µg/lado, tem efeitos amnésicos sobre a evocação da memória (Barros *et al.*, 2001), ou seja, um nível basal de atividade adrenérgica hipocampal parece ser necessário para a memória da tarefa. Entretanto, quando da administração sistêmica de ocitocina, essa mesma atividade basal é capaz de promover prejuízos na evocação. Podemos inclusive sugerir que, neste caso, os terminais adrenérgicos no hipocampo estejam agindo principalmente sobre a liberação de acetilcolina: sem a ativação dos receptores beta nos terminais axonais colinérgicos não haveria a liberação aumentada de acetilcolina que parece ser responsável pelos efeitos amnésicos da ocitocina sobre a evocação da memória da EI.

Mais uma vez, essa interpretação é coerente com a sugestão de que a ocitocina requer um certo nível de aversividade na tarefa sendo estudada para que seus efeitos amnésicos sobre a evocação possam ser identificados. Tarefas pouco aversivas ou com um estímulo de treino pouco intenso talvez não envolvam suficientemente o sistema adrenérgico na consolidação, e este acabaria tendo uma participação menor na evocação, não contribuindo para permitir o aumento na liberação de acetilcolina no hipocampo.

5.8 Uma possível arquitetura da circuitaria mediadora dos efeitos da OT periférica

Os experimentos deste trabalho indicam que a ocitocina i.p. exerce seus efeitos centrais sobre a evocação da memória da EI através da modulação negativa da liberação de glicocorticóides a partir da glândula adrenal. Estes glicocorticóides seriam necessários para manter a atividade colinérgica hipocampal abaixo de certos níveis, e a queda na concentração de GC circulantes resulta em um aumento na quantidade de acetilcolina no hipocampo. Esse neurotransmissor, por sua vez, ligar-se-ia aos receptores M4, provavelmente localizados em neurônios glutamatérgicos (Diehl *et al.*, em preparação), o que resultaria em uma menor liberação de glutamato, provocando, assim, um efeito amnésico sobre a evocação da memória da EI. Além disso, um nível mínimo de atividade adrenérgica hipocampal parece ser necessário para a ocorrência do aumento na liberação de acetilcolina.

Uma representação simplificada dessa seqüência de eventos é a seguinte:



Nosso conjunto de resultados permite propor a seguinte organização citoarquitetônica para o funcionamento do hipocampo durante a fase de evocação da memória da EI (fig. 5.1).

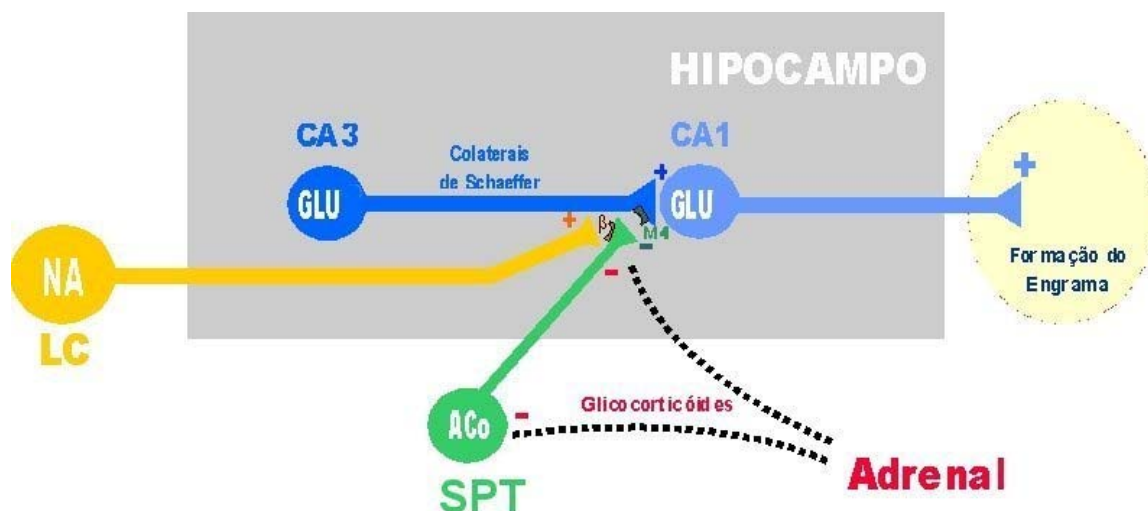


Fig. 5.1 - proposta de organização citoarquitetônica do hipocampo na evocação da memória da EI. LC: *Locus Coeruleus*, SPT: Septo Medial, NA: noradrenalina, ACo: acetilcolina, GLU glutamato, M4: receptor muscarínico do tipo M4, β : receptor beta-adrenérgico, +: influência excitatória pós-sináptica, -: influência inibitória pós-sináptica.

Essa proposta de organização é coerente com todos os resultados obtidos neste trabalho os efeitos da ocitocina na evocação da memória da esQUIVA inibitória.

Segundo nossa proposta, os glicocorticóides liberados a partir da glândula adrenal seriam responsáveis por manter a liberação de acetilcolina no hipocampo abaixo de um determinado nível. A queda nos GC promovida pela administração sistêmica de ocitocina retiraria esse freio e resultaria em um aumento na atividade colinérgica hipocampal. A administração exógena de um glicocorticóide sintético, a dexametasona, foi capaz reverter esse efeito.

A inervação adrenérgica que chega ao hipocampo exerceria sua influência principalmente em terminais axonais colinérgicos através de receptores do tipo beta e seria necessária para a liberação aumentada de acetilcolina. O bloqueio dos receptores beta-adrenérgicos com timolol foi capaz de reverter esse efeito. E, se o estímulo utilizado

durante o treino tiver uma característica pouco aversiva, essa via adrenérgica não seria muito ativada durante a consolidação e teria um papel reduzido na evocação.

A liberação aumentada de acetilcolina inibiria, através dos receptores M4, associados a proteína G_i , a liberação de glutamato, o que prejudicaria a evocação da memória. O bloqueio dos receptores M4 com MT3, ou de todos os tipos de receptores muscarínicos com a escopolamina, foi capaz de reverter esse efeito.

5.9 Resumo e considerações finais

Primeiro, há diferenças entre os efeitos da ocitocina sobre a consolidação e a evocação da memória da esQUIVA inibitória. Da mesma maneira, há diferenças entre ratos machos e fêmeas com relação ao papel da ocitocina sobre o processo de consolidação da memória desta tarefa. Por outro lado, não parece haver diferenças no papel da OT entre machos e fêmeas com relação ao processo de evocação - há apenas uma aparente menor sensibilidade das fêmeas ao estímulo aversivo.

Além disso, os efeitos da ocitocina sobre a evocação da memória da esQUIVA inibitória parecem depender de um certo nível de aversividade no treino. Em conformidade com isso, a ocitocina parece não ter efeitos significativos sobre a evocação de tarefas que consideramos menos aversivas, como o labirinto aquático de Morris e a habituação ao campo aberto.

Os mecanismos através dos quais a ocitocina exerce seu efeito amnésico sobre a evocação parecem envolver uma queda na liberação de glicocorticóides a partir da glândula adrenal, o que resulta em um aumento da atividade colinérgica no hipocampo. Esses efeitos parecem se dar especificamente através dos receptores muscarínicos do tipo M4 e requerem um certo nível de atividade adrenérgica no hipocampo para se manifestarem.

Por fim, os efeitos encontrados parecem não se dever à influência da ocitocina sobre a atividade motora dos animais ou sobre o seu nível de ansiedade, restringindo-se claramente ao domínio cognitivo.

6. Conclusões

1) A administração sistêmica de ocitocina parece não ter efeitos significativos sobre a *consolidação* da memória de ratos *machos* treinados na tarefa de esquiva inibitória;

2) a administração sistêmica de ocitocina apresentou efeitos amnésicos sobre a *evocação* da memória de ratos *machos* treinados na tarefa de esquiva inibitória;

3) a administração sistêmica de ocitocina apresentou efeitos amnésicos sobre a *consolidação* da memória de ratas *fêmeas* treinadas na tarefa de esquiva inibitória;

4) a administração sistêmica de ocitocina apresentou efeitos amnésicos sobre a *evocação* da memória de ratas *fêmeas* treinadas na tarefa de esquiva inibitória;

5) a administração sistêmica de ocitocina parece não ter efeitos sobre a evocação da memória de ratos machos treinados nas tarefas do labirinto aquático de Morris e da habituação ao campo aberto, pelo menos nas doses testadas;

6) os mecanismos neurofisiológicos através dos quais a ocitocina sistêmica exerce seus efeitos sobre a evocação da memória parecem envolver a modulação da liberação de glicocorticóides a partir da adrenal, de acetilcolina no hipocampo e requerem atividade adrenérgica no hipocampo.

7. Referências Bibliográficas

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts, K, Watson, J (1994). Garland Publishing, New York, NY, 1294 pp.

Ambrogi Lorenzini GC, Baldi E, Bucherelli C, Sacchetti B, Tassoni, G (1999). Neural topography and chronology of memory consolidation: a review of functional inactivation findings. *Neurobiol Learn Mem.*, 71(1):1-18.

Arletti R, Bertolini A (1995). Oxytocin stimulates lordosis behavior in female rats. *Neuropeptides*, 6(3):247-53.

Bales KL, Pfeifer LA, Carter CS (2004). Sex differences and developmental effects of manipulations of oxytocin on alloparenting and anxiety in prairie voles. *Dev Psychobiol*, 44(2):123-31.

Barros DM, Mello e Souza T, De David T, Choi H, Aguzzoli A, Madche C, Ardenghi P, Medina JH, Izquierdo I (2001). Simultaneous modulation of retrieval by dopaminergic D(1), beta-noradrenergic, serotonergic-1A and cholinergic muscarinic receptors in cortical structures of the rat. *Behav Brain Res*, 124(1):1-7.

Bartels A, Zeki S (2004). The neural correlates of maternal and romantic love. *Neuroimage*, 21(3):1155-66.

Bashir ZI, Bortolotto ZA, Davies CH, Beretta N, Irving AJ, Seal AJ, Henley JM, Jane DE, Watkins JC, Collingridge GL (1993). Induction of LTP in the hippocampus needs synaptic activation of glutamate metabotropic receptors. *Nature*, 363(6427):347-50.

Bear MF, Connors BW, Paradiso MA (2001). *Neuroscience: exploring the brain*, 2a ed. Lippincott, Williams e Wilkins, 855 pp.

Benelli A, Bertolini A, Poggioli R, Menozzi B, Basaglia R, Arletti R (1995). Polymodal dose-response curve for oxytocin in the social recognition test. *Neuropeptides*, 28(4):251-5.

Bianchin M, Walz R, Ruschel AC, Zanatta MS, Da Silva RC, Bueno e Silva M, Paczko N, Medina JH, Izquierdo I (1993). Memory expression is blocked by the infusion of CNQX into the hippocampus and/or the amygdala up to 20 days after training. *Behav Neural Biol*, 59(2):83-6.

Bliss TV, Lomo T (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*, 232(2):331-56.

Boccia MM, Baratti CM (2000). Involvement of central cholinergic mechanisms in the effects of oxytocin and an oxytocin receptor antagonist on retention performance in mice. *Neurobiol Learn Mem*, 74(3):217-28.

- Boccia MM, Kopf SR, Baratti CM (1998). Effects of a single administration of oxytocin or vasopressin and their interactions with two selective receptor antagonists on memory storage in mice. *eurobiol Learn Mem*, 69(2):136-46.
- Bohus B, Kovacs GL, de Wied D (1978). Oxytocin, vasopressin and memory: opposite effects on consolidation and retrieval processes. *Brain Res*, 157(2):414-7.
- Bohus B (1980). Vasopressin, oxytocin and memory: effects on consolidation and retrieval processes. 1: *Acta Psychiatr Belg*, 80(5):714-20.
- Carter CS (1998). Neuroendocrine perspectives on social attachment and love. *Psychoneuroendocrinology*. 23(8):779-818.
- Colley PA, Sheu FS, Routtenberg A (1990). Inhibition of protein kinase C blocks two components of LTP persistence, leaving initial potentiation intact. *J Neurosci.*, 10(10):3353-60.
- Conrad CD, Lupien SJ, Thanasoulis LC, McEwen, BS (1997). The effects of Type I and Type II corticosteroid receptor agonists on exploratory behavior and spatial memory in the Y-maze. *Brain Res.*, 759:76-83.
- Consiglio AR, Lucion AB (1996). Lesion of hypothalamic paraventricular nucleus and maternal aggressive behavior in female rats. *Physiol Behav*, 59(4-5):591-6.
- de Quervain DJ, Henke K, Aerni A, Treyer V, McGaugh JL, Berthold T, Nitsch RM, Buck A, Roozendaal B, Hock C (2003). Glucocorticoid-induced impairment of declarative memory retrieval is associated with reduced blood flow in the medial temporal lobe. *Eur J Neurosci*, 17(6):1296-302.
- de Wied D, Elands J, Kovacs G (1991). Interactive effects of neurohypophyseal neuropeptides with receptor antagonists on passive avoidance behavior: mediation by a cerebral neurohypophyseal hormone receptor? *Proc Natl Acad Sci USA*, 88(4):1494-8.
- de Wied D, Gaffori O, Burbach JP, Kovacs GL, van Ree JM (1987). Structure activity relationship studies with C-terminal fragments of vasopressin and oxytocin on avoidance behaviors of rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 241(1):268-74.
- de Wied D (1980). Behavioural actions of neurohypophysial peptides. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 29;210(1178):183-95.
- Devost D, Zingg HH (2004). Homo- and hetero-dimeric complex formations of the human oxytocin receptor. *J Neuroendocrinol*, 16(4):372-7.
- Diehl F, Oliveira LF, Sánchez G, Camboim C, Álvares LO, Henriques TP, Lanziotti VB, Genro BP, Kornisiuk E, Jerusalinky D, Quillfeldt JA (2005). Facilitatory effect of the

pretest administration of MT3 and scopolamine in the inhibitory avoidance, but not in the open-field habituation task: behavioral hints of a M4 plasticity.

Diergaarde L, Gerrits MA, Brouwers JP, van Ree JM (2005). Early amygdala damage disrupts performance on medial prefrontal cortex-related tasks but spares spatial learning and memory in the rat. *Neuroscience*, 130(3):581-90.

Hebb DO (1949). *The organization of behavior*. Wiley, New York, NY.

Frey U, Morris RG (1997). Weak before strong: dissociating synaptic tagging and plasticity-factor accounts of late-LTP. *Neuropharmacology*, 37(4-5):545-52.

Fan Y, Hu J, Li J, Yang Z, Xin X, Wang J, Ding J, Geng M (2005). Effect of acidic oligosaccharide sugar chain on scopolamine-induced memory impairment in rats and its related mechanisms. *Neurosci Lett*, 374(3):222-6.

Felder CC (1995). Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *FASEB J*, 9(8):619-25.

Ferguson JN, Young LJ, Hearn EF, Matzuk MM, Insel TR, Winslow JT (2000). Social amnesia in mice lacking the oxytocin gene. *Nat Genet*, 25(3):284-8.

Ferguson JN, Aldag JM, Insel TR, Young LJ (2001). Oxytocin in the medial amygdala is essential for social recognition in the mouse. *J Neurosci*, 21(20):8278-85.

Ferreira AR, Furstenau L, Blanco C, Kornisiuk E, Sanchez G, Daroit D, Castro e Silva M, Cervenansky C, Jerusalinsky D, Quillfeldt JA (2003). Role of hippocampal M1 and M4 muscarinic receptor subtypes in memory consolidation in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*, 74(2):411-5.

Ferry B, Roozendaal B, McGaugh JL (1999). Role of norepinephrine in mediating stress hormone regulation of long-term memory storage: a critical involvement of the amygdala. *Biol Psychiatry*, 46(9):1140-52.

Fuchs AR (1988). Oxytocin and ovarian function. *J Reprod Fertil Suppl*, 36:39-47.

Gaffori OJ, De Wied D (1988). Bimodal effect of oxytocin on avoidance behavior may be caused by the presence of two peptide sequences with opposite action in the same molecule. *Eur J Pharmacol*, 147(2):157-62.

Gibbs DM (1986). Oxytocin inhibits ACTH and peripheral catecholamine secretion in the urethane-anesthetized rat. *Regul Pept*, 14(2):125-32.

Gimpl G, Fahrenholz F (2001). The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev*, 81(2):629-83

Gingrich JA, Hen R (2000). The broken mouse: the role of development, plasticity and environment in the interpretation of phenotypic changes in knockout mice. *Curr Opin Neurobiol*, 10(1):146-52.

Giovenardi M, Padoin MJ, Cadore LP, Lucion AB (1997). Hypothalamic paraventricular nucleus, oxytocin, and maternal aggression in rats. *Ann N Y Acad Sci*, 807:606-9.

Heinrichs M, Meinschmidt G, Wippich W, Ehlert U, Hellhammer DH (2004). Selective amnesic effects of oxytocin on human memory. *Physiol Behav*, 83(1):31-8.

Hoyle CH (1999). Neuropeptide families and their receptors: evolutionary perspectives. *Brain Res*, 848(1-2):1-25.

Ibragimov RSh (1990) Influence of neurohypophyseal peptides on the formation of active avoidance conditioned reflex behavior. *Neurosci Behav Physiol*, 20(3):189-93.

Insel TR, O'Brien DJ, Leckman JF (1999). Oxytocin, vasopressin, and autism: is there a connection? *Biol Psychiatry*, 45(2):145-57.

Izquierdo I, da Cunha C, Rosat R, Jerusalinsky D, Ferreira MB, Medina JH (1992). Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. *Behav Neural Biol*, 58(1):16-26.

Izquierdo I, da Silva RC, Bueno e Silva M, Quillfeldt JA, Medina JH (1993). Memory expression of habituation and of inhibitory avoidance is blocked by CNQX infused into the entorhinal cortex. Memory expression of habituation and of inhibitory avoidance is blocked by CNQX infused into the entorhinal cortex. *Behav Neural Biol*, 60(1):5-8.

Izquierdo I, Quillfeldt JA, Zanatta MS, Quevedo J, Schaeffer E, Schmitz PK, Medina JH (1997). Sequential role of hippocampus and amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats. *Eur J Neurosci*, 9(4):786-93.

Izquierdo I, Barros DM, Mello e Souza T, de Souza MM, Izquierdo LA, Medina JH (1998a). Mechanisms for memory types differ. *Nature*, 393(6686):635-6. No abstract available.

Izquierdo I, Izquierdo LA, Barros DM, Mello e Souza T, de Souza MM, Quevedo J, Rodrigues C, Sant'Anna MK, Madruga M, Medina JH (1998b). Differential involvement of cortical receptor mechanisms in working, short-term and long-term memory. *Behav Pharmacol*, 9(5-6):421-7.

Izquierdo LA, Barros DM, Medina JH, Izquierdo I (2000). Novelty enhances retrieval of one-trial avoidance learning in rats 1 or 31 days after training unless the hippocampus is inactivated by different receptor antagonists and enzyme inhibitors. *Behav Brain Res*, 117(1-2):215-20.

Izquierdo I (1994). Pharmacological evidence for a role of long-term potentiation in memory. *FASEB J*, 8(14):1139-45.

Jerusalinsky D, Ferreira MB, Walz R, Da Silva RC, Bianchin M, Ruschel AC, Zanatta MS, Medina JH, Izquierdo I (1992). Amnesia by post-training infusion of glutamate receptor antagonists into the amygdala, hippocampus, and entorhinal cortex. *Behav Neural Biol*, 58(1):76-80.

Jerusalinsky D, Quillfeldt JA, Walz R, Da Silva RC, Medina JH, Izquierdo I (1994). Post-training intrahippocampal infusion of protein kinase C inhibitors causes amnesia in rats. *Behav Neural Biol.*, 61(2):107-9.

Jerusalinsky D, Kornisiuk E, Alfaro P, Quillfeldt J, Alonso M, Verde ER, Cervenansky C, Harvey A, (1998). Muscarinic toxin selective for m4 receptors impairs memory in the rat. *Neuroreport*, 9(7):1407-11.

Joels M (2001). Corticosteroid actions in the hippocampus. *J Neuroendocrinol*, 13(8):657-69.

Jonasson Z (2005). Meta-analysis of sex differences in rodent models of learning and memory: a review of behavioral and biological data. *Neurosci Biobehav Rev.*, 28(8):811-25.

Kang YS, Park JH (2000) Brain uptake and the analgesic effect of oxytocin--its usefulness as an analgesic agent. *Arch Pharm Res*, 23(4):391-5.

Kelso SR, Ganong AH, Brown TH (1986). Hebbian synapses in hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83(14):5326-30.

Kovacs GL, Bohus B, Versteeg DH, de Kloet ER, de Wied D (1979). Effect of oxytocin and vasopressin on memory consolidation: sites of action and catecholaminergic correlates after local microinjection into limbic-midbrain structures. *Brain Res*, 175(2):303-14.

Lanziotti VB, Álvares LO, Henriques TP, Diehl F, Genro BP, Oliveira LF, Camboim C, Quillfeldt JÁ (2005). Intrahippocampal bicuculline and baclofen counteract the post-training amnesic effect of MT3, a selective M4 antagonist.

Legros JJ, Chiodera P, Geenen V, von Frenckell R (1987). Confirmation of the inhibitory influence of exogenous oxytocin on cortisol and ACTH in man: evidence of reproducibility. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 114(3):345-9.

Legros JJ, Chiodera P, Geenen V (1988). Inhibitory action of exogenous oxytocin on plasma cortisol in normal human subjects: evidence of action at the adrenal level. *Neuroendocrinology*, 48(2):204-6.

Lomo T (1966). The discovery of long-term potentiation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 358(1432):617-20.

Lupien SJ, McEwen BS (1997). The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human model studies. *Brain Res. Rev.*, 24:1-27.

Mantella RC, Vollmer RR, Li X, Amico JA (2003). Female oxytocin-deficient mice display enhanced anxiety-related behavior. *Endocrinology*, 144(6):2291-6.

Mantella RC, Vollmer RR, Rinaman L, Li X, Amico JA (2004). Enhanced corticosterone concentrations and attenuated Fos expression in the medial amygdala of female oxytocin knockout mice exposed to psychogenic stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 287(6):R1494-504.

Markey KA, Towle AC, Sze PY (1982). Glucocorticoid influence on tyrosine hydroxylase activity in mouse locus coeruleus during postnatal development. *Endocrinology*, 111(5):1519-23.

McCarthy MM, McDonald CH, Brooks PJ, Goldman D (1996). An anxiolytic action of oxytocin is enhanced by estrogen in the mouse. *Physiol Behav*, 60(5):1209-15.

McEwen BS (1987). Glucocorticoid-biogenic amine interactions in relation to mood and behavior. *Biochem Pharmacol*, 36(11):1755-63.

McGaugh JL, Roozendaal B (2002). Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. *Curr Opin Neurobiol*, 12(2):205-10.

McGaugh JL (1966). Time-dependent processes in memory storage. *Science*, 153(742):1351-8.

McGaugh JL (2000). Memory--a century of consolidation. *Science*, 287(5451):248-51.

McGaugh JL, Roozendaal B, Cahill L (1999). Modulation of memory storage by stress hormones and the amygdaloid complex. *In: Gazzaniga MS (ed.). The New Cognitive Neuroscience*. Cambridge, Bradford, 1081-98.

McIntyre CK, Power AE, Roozendaal B, McGaugh JL, (2003). Role of the basolateral amygdala in memory consolidation. *Ann N Y Acad Sci*, 985:273-93.

Meagher MW, Illich PA, Salinas JA (1998). Physostigmine's impact on brief shock-induced hypoalgesia parallels its effect on memory. *Neurobiol Learn Mem*, 70(3):374-87.

Mello e Souza T, Rohden A, Meinhardt M, Goncalves CA, Quillfeldt JA (2000). S100B infusion into the rat hippocampus facilitates memory for the inhibitory avoidance task but not for the open-field habituation. *Physiol Behav*, 71(1-2):29-33.

Miranda MI, Bermudez-Rattoni F (1999). Reversible inactivation of the nucleus basalis magnocellularis induces disruption of cortical acetylcholine release and acquisition, but not retrieval, of aversive memories. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(11):6478-82.

Neumann ID, Kromer SA, Toschi N, Ebner K (2000). Brain oxytocin inhibits the (re)activity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in male rats: involvement of hypothalamic and limbic brain regions. *Regul Pept*, 96(1-2):31-8.

Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature*, 307(5950):462-5.

Paxinos G, Watson C (1997). *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 4a ed. Academic Press, Academic Press, San Diego, CA, 256 pp.

Paxinos G (1994). *The Rat Nervous System*, 2a ed.. Academic Press, San Diego, CA, 1136 pp.

Pitman RK, Orr SP, Lasko NB (1993). Effects of intranasal vasopressin and oxytocin on physiologic responding during personal combat imagery in Vietnam veterans with posttraumatic stress disorder. *Psychiatry Res*, 48(2):107-17.

Porges SW (2001). The polyvagal theory: phylogenetic substrates of a social nervous system. *Int J Psychophysiol*, 42(2):123-46.

Pu X, Ma Y, Cai J (1993). A study on the effect of lesions of area 7 of the parietal cortex on the short-term visual spatial memory of rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Brain Res*, 600(2):187-92.

Quevedo J, Vianna MR, Martins MR, Barichello T, Medina JH, Roesler R, Izquierdo I (2004). Protein synthesis, PKA, and MAP kinase are differentially involved in short- and long-term memory in rats. *Behav Brain Res*, 154(2):339-43.

Quillfeldt JA, Schmitz PK, Walz R, Bianchin M, Zanatta MS, Medina JH, Izquierdo I (1994). CNQX infused into entorhinal cortex blocks memory expression, and AMPA reverses the effect. *Pharmacol Biochem Behav*, 48(2):437-40.

Quillfeldt JA (1994). O papel do receptores glutamatérgicos do tipo AMPA na expressão da memória no córtex entorrinal e estruturas relacionadas. Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia. Orientador: Izquierdo, I. Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

Quirarte GL, Cruz-Morales SE, Diaz del Guante MA, Garcia M, Prado-Alcala RA (1993). Protective effect of under-reinforcement of passive avoidance against scopolamine-induced amnesia. *Brain Res Bull*, 32(5):521-4.

Reversi A, Rimoldi V, Marrocco T, Cassoni P, Bussolati G, Parenti M, Chini B (2005). The oxytocin receptor antagonist atosiban inhibits cell growth via a "biased agonist mechanism. *J Biol Chem*, 280: 16311-16318.

Rodgers RJ, Dalvi A (1997). Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev*, 21(6):801-10.

Rogers JL, Kesner RP (2003). Cholinergic modulation of the hippocampus during encoding and retrieval. 1: *Neurobiol Learn Mem*, 80(3):332-42.

Rogers JL, Kesner RP (2004). Cholinergic modulation of the hippocampus during encoding and retrieval of tone/shock-induced fear conditioning. *Learn Mem*, 11(1):102-7.

Roozendaal B, Griffith QK, Buranday J, De Quervain DJ, McGaugh JL (2003). The hippocampus mediates glucocorticoid-induced impairment of spatial memory retrieval: dependence on the basolateral amygdala. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(3):1328-33.

Roozendaal B, de Quervain DJ, Schelling G, McGaugh JL (2004a). A systemically administered beta-adrenoceptor antagonist blocks corticosterone-induced impairment of contextual memory retrieval in rats. *Neurobiol Learn Mem*, 81(2):150-4.

Roozendaal B, Hahn EL, Nathan SV, de Quervain DJ, McGaugh JL (2004b). Glucocorticoid effects on memory retrieval require concurrent noradrenergic activity in the hippocampus and basolateral amygdala. *J Neurosci*, 24(37):8161-9.

Roozendaal B, Schoorlemmer GH, Wiersma A, Sluyter S, Driscoll P, Koolhaas JM, Bohus B (1992). Opposite effects of central amygdaloid vasopressin and oxytocin on the regulation of conditioned stress responses in male rats. *Ann N Y Acad Sci*, 652:460-1.

Roozendaal B (2002). Stress and memory: opposing effects of glucocorticoids on memory consolidation and memory retrieval. *Neurobiol Learn Mem*, 78(3):578-95.

Rosat R, Da-Silva RC, Zanatta MS, Medina JH, Izquierdo I (1992). Abstract Memory consolidation of a habituation task: role of N-methyl-D-aspartate, cholinergic muscarinic and GABA-A receptors in different brain regions. *Braz J Med Biol Res*, 25(3):267-73.

Routtenberg, A (1996). Reverse piedpiperase: is the knockout mouse leading neuroscientists to a watery end? *TINS*, 11(19): 471-2.

Scantamburlo G, Ansseau M, Legros JJ (2001). Role of the neurohypophysis in psychological stress. *Encephale*, 27(3):245-59.

Scoville WB, Millner B (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurochem*, 20(1):11-21.

Silva A, Paylor R, Wehner J, Tonegawa S (1992) Impaired spatial learning in α -calcium calmodulin kinase II mutant mice. *Science*, 257, 206-11.

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

Stoehr JD, Cramer CP, North WG (1992). Oxytocin and vasopressin hexapeptide fragments have opposing influences on conditioned freezing behavior. *Psychoneuroendocrinology*, 17(2-3):267-71.

Szapiro G, Izquierdo LA, Alonso M, Barros D, Paratcha G, Ardenghi P, Pereira P, Medina JH, Izquierdo I (2000). Participation of hippocampal metabotropic glutamate receptors, protein kinase A and mitogen-activated protein kinases in memory retrieval. *Neuroscience*, 99(1):1-5.

Taylor SE, Klein LC, Lewis BP, Gruenewald TL, Gurung RA, Updegraff JA (2000) Biobehavioral responses to stress in females: tend-and-befriend, not fight-or-flight. *Psychol Rev*, 1;107(3):411-29.

Teyler TJ, DiScenna P (1987). Long-term potentiation. *Annu Rev Neurosci*, 10:131-61.

Tomizawa K, Iga N, Lu YF, Moriwaki A, Matsushita M, Li ST, Miyamoto O, Itano T, Matsui H (2003). Oxytocin improves long-lasting spatial memory during motherhood through MAP kinase cascade. *Nat Neurosci*, 6(4):384-90.

Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S (1996). The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell*, 87(7):1327-38.

Uvnas-Moberg K (1997). Oxytocin linked antistress effects--the relaxation and growth response. *Acta Physiol Scand Suppl*, 640:38-42.

van Wimersma Greidanus TB, Jolles J, De Wied D (1985). Hypothalamic neuropeptides and memory. *Acta Neurochir (Wien)*, 75(1-4):99-105.

Vianna MR, Igaz LM, Coitinho AS, Medina JH, Izquierdo I (2003). Memory extinction requires gene expression in rat hippocampus. *Neurobiol Learn Mem*, 79(3):199-203.

Wettschureck N, Moers A, Hamalainen T, Lemberger T, Schutz G, Offermanns S (2004). Heterotrimeric G proteins of the Gq/11 family are crucial for the induction of maternal behavior in mice. *Mol Cell Biol*, 24(18):8048-54.

Windle RJ, Shanks N, Lightman SL, Ingram CD (1997). Central oxytocin administration reduces stress-induced corticosterone release and anxiety behavior in rats. *Endocrinology*, 138(7):2829-34.

Winkler J, Suhr ST, Gage FH, Thal LJ, Fisher LJ (1995). Essential role of neocortical acetylcholine in spatial memory. *Nature*, 375(6531):484-7.

Winslow JT, Insel TR (2002). The social deficits of the oxytocin knockout mouse. *Neuropeptides*, 36(2-3):221-9.

Wolfman C, Fin C, Dias M, Bianchin M, Da Silva RC, Schmitz PK, Medina JH, Izquierdo I (1994). Intrahippocampal or intraamygdala infusion of KN62, a specific inhibitor of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, causes retrograde amnesia in the rat. *Behav Neural Biol*, 61(3):203-5.

Wu W, Yu LC (2004). Roles of oxytocin in spatial learning and memory in the nucleus basalis of Meynert in rats. *Regul Pept*, 120(1-3):119-25.

Young LJ, Wang Z (2004). The neurobiology of pair bonding. *Nat Neurosci*, 7(10):1048-54.

Zingg HH, Laporte AS (2003). The oxytocin receptor. *Trends Endocrinol Metab*, 14(5):222-7.