

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE (ICBS)  
Programa de Pós-graduação em Neurociências

Participação do Sistema Colinérgico Muscarínico Hipocampal no Processo  
de Evocação da Memória em Ratos

FELIPE DIEHL

Orientador:

Prof. JORGE ALBERTO QUILLFELDT

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências  
Biológicas: Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre.

Porto Alegre, 2006

## Agradecimentos:

Agradeço à minha família, por incontáveis motivos.

Agradeço ao amigo professor Jorge Alberto Quillfeldt, pela sábia orientação e por ter confiado em mim.

Agradeço ao Lucas Fürstenau, pela ajuda, pela quase co-orientação e pela amizade.

Agradeço à Clarissa Camboim e ao Lucas Alvares, pela amizade e pela supervisão técnica e intelectual.

Agradeço aos demais amigos e colegas do laboratório, esse trabalho só foi possível com a dedicação de todos: Bruna, Vanusa, Thiago, Jonathan, Naíta, Robson e Laura. É muito agradável trabalhar com vocês.

Agradeço à dona Zelma, que investe tanta dedicação e carinho a manutenção do laboratório.

Agradeço à Aline, que deixou a minha vida mais “colorida”.

Agradeço a todos os professores da Pós-graduação em Neurociências; foram importantes os conhecimentos adquiridos e foi um prazer participar do curso.

Agradeço ao CNPq pela bolsa.

## Resumo

**Introdução:** O sistema colinérgico muscarínico apresenta uma função essencialmente modulatória, agindo, principalmente, sobre neurônios inibitórios e excitatórios. As aferências colinérgicas que atingem o sistema límbico, principalmente na formação hipocampal e na amígdala, evidenciam a participação desse sistema nos mecanismos de aprendizagem e memória. Agentes farmacológicos convencionais não são seletivos entre os diferentes subtipos de receptores colinérgicos muscarínicos (M1 – M5). As toxinas muscarínicas extraídas da peçonha da serpente mamba verde africana, têm-se mostrado ferramentas úteis na investigação do papel específico de cada tipo de receptor na memória. Os mecanismos modulatórios do sistema colinérgico muscarínico nos processos de aquisição e consolidação já foram extensivamente estudados, porém ainda são restritos dados referentes à participação desse sistema no processo de evocação.

**Objetivos:** estudar a participação dos receptores colinérgicos muscarínicos na evocação da memória através da utilização pré-teste de fármacos pouco seletivos, como a escopolamina, pirenzepina (antagonistas) e oxotremorina (agonista); comparando com fármacos seletivos, como as toxinas muscarínicas MT3 (antagonista seletivo para o receptor M4) e MT2 (agonista seletivo para receptor M1 com atividade menos seletiva de antagonista M4) nas tarefas comportamentais de Esquiva Inibitória e Habituação ao Campo Aberto.

**Material e Métodos:** ratos Wistar machos foram canulados bilateralmente no hipocampo dorsal. Após a recuperação da cirurgia, foram treinados na tarefa de Esquiva Inibitória (EI), com choque de 0,5 mA (3 s). Após 24 horas, receberam uma infusão intra-hipocampal de escopolamina (0,5, 2,0 e 8,0 µg por lado), de oxotremorina (2,5 e 5 ng por lado), de pirenzepina (0,5 µg por lado), de MT3 (0,5, 1,0 e 2,0 µg por lado), de MT2 (0,75, 1,0 e 6,0 µg por lado) ou de TFS (grupo controle de todos os fármacos). Dez minutos após a infusão, os animais foram testados na EI. A latência de descida da plataforma no teste é o índice de memória da tarefa. Um procedimento semelhante foi aplicado no experimento com a tarefa comportamental de habituação ao campo aberto (menos aversiva que a esquiva inibitória), porém apenas foi utilizado a escopolamina e a MT3 (ambas 2,0 µg por lado); essa tarefa serviu como um “controle motor” para a tarefa de esquiva inibitória.

**Resultados:** Os antagonistas colinérgicos muscarínicos escopolamina, pirenzepina e MT3 (doses, respectivamente, de 2,0 µg por lado, 0,5 µg por lado e 2,0 µg por lado), juntamente com a MT2 (agonista M1-seletivo, dose de 0,75 µg por lado) apresentaram um efeito facilitatório sobre a evocação da tarefa de Esquiva Inibitória. Além disso, o agonista pouco seletivo oxotremorina teve um efeito amnésico parcial nessa tarefa. A escopolamina e MT3 não tiveram qualquer efeito na evocação da tarefa de habituação ao campo aberto.

**Discussão:** nossos resultados, obtidos com antagonistas, sugerem uma participação inibitória do sistema colinérgico muscarínico sobre o processo de evocação da memória aversiva da esquiva inibitória, porém, analisando a seletividade da MT3, podemos inferir uma atividade inibitória exclusiva do receptor M4. Esse resultado, entretanto, é contrário ao encontrado com a administração desses mesmos antagonistas no período pós-treino, demonstrando um papel oposto desse sistema entre os processos de consolidação e evocação. Além disso, o receptor M1 excitatório modula positivamente a evocação. A ausência de efeito dos fármacos na habituação ao campo aberto indica que o efeito na esquiva inibitória é cognitivo, e não motor ou exploratório.

# Índice

1.0 - Introdução	6
1.1 - Tipos de Memórias	7
1.2 - Fases da Memória	8
1.3 - A busca do engrama	9
1.4 - Estruturas encefálicas envolvidas com a memória	9
1.5 - Mecanismos do processo de consolidação da memória	12
1.6 - Mecanismos de evocação de memórias de longa duração	14
1.7 - O sistema colinérgico muscarínico e memória	17
2.0 - Objetivos	20
3.0 - Material e Métodos	22
3.1 - Animais	22
3.2 - Procedimentos Cirúrgicos	22
3.3 - Tarefa Comportamental de Esquiva Inibitória	24
3.4 - Tarefa Comportamental de Habituação ao Campo Aberto	26
3.5 - Infusão das drogas	28
3.6 - Fármacos utilizados	28
3.7 - Análise do posicionamento das cânulas	29
3.8 - Análise estatística	29
4.0 - Resultados	31
4.1 - Resultados referentes aos experimentos de Esquiva Inibitória	31
4.1.1 - Administração intra-hipocampal de escopolamina	31
4.1.2 - Administração intra-hipocampal de oxotremorina	33
4.1.3 - Administração intra-hipocampal de pirenzepina	35
4.1.4 - Administração intra-hipocampal de MT3	37
4.1.5 - Administração intra-hipocampal de MT2	39
4.2 - Resultados referentes aos experimentos de habituação	41
4.2.1 - Administração intra-hipocampal de escopolamina	41
4.2.2 - Administração intra-hipocampal de MT3	43
5.0 - Discussão	45
6.0 - Conclusões	53
7.0 - Bibliografia	54

## Índice da Tabela

Tabela 1 – Afinidade e ação das toxinas muscarínicas	18
--	----

## Índice de Figuras

Figura 1 – Serpente mamba verde africana ( <i>Dendroaspis angusticeps</i> )	19
Figura 2 – Cirurgia estereotáxica	23
Figura 3 – Esquiva Inibitória	25
Figura 4 – Habituação ao Campo Aberto	27
Figura 5 – Posição da marca do corante injetado	27
Figura 6 – Gráfico escopolamina pré-teste de esquiva inibitória	32
Figura 7 – Gráfico oxotremorina pré-teste de esquiva inibitória	34
Figura 8 – Gráfico pirenzepina pré-teste de esquiva inibitória	36
Figura 9 – Gráfico MT3 pré-teste de esquiva inibitória	38
Figura 10 – Gráfico MT2 pré-teste de esquiva inibitória	40
Figura 11 – Gráfico escopolamina pré-teste de habituação ao campo aberto	42
Figura 12 – Gráfico MT3 pré-teste de habituação ao campo aberto	44
Figura 13 – Proposta citoarquitetônica do hipocampo dorsal	52

**Anexo: Facilitatory effect of pretest administration of MT3 in the inhibitory Avoidance task suggests M4 receptor plasticity at the hippocampus.**

Felipe Diehl <sup>1,2</sup>, Lucas Fürstenau de Oliveira <sup>1,2</sup>, Gonzalo Sánchez <sup>3</sup>, Clarissa Camboim <sup>1,2</sup>, Lucas de Oliveira Alvares <sup>1,2</sup>, Vanusa Bispo Lanziotti <sup>1,2</sup>, Carlos Cerveñansky <sup>4</sup>, Edgar Kornisiuk <sup>3</sup>, Diana Jerusalinky <sup>3</sup>, Jorge Alberto Quillfeldt <sup>1,2</sup>. Artigo submetido á revista Behavioral Brain Research.

62

## 1.0 - Introdução

O fator biológico que mais caracteriza um indivíduo como uma entidade particular, diferente de todos os outros seres vivos (inclusive entre aqueles que apresentam ADNs idênticos), é a capacidade de reter informações adquiridas do meio que o cerca durante toda a vida. Nos seres humanos, em particular, a história de uma pessoa, a coleção pessoal de lembranças, juntamente com as características comportamentais genéticas, forma o arcabouço essencial para a construção de uma personalidade.

A possibilidade de guardar memórias é uma característica adaptativa importante, uma vez que novos conhecimentos moldam e modificam toda a variedade de comportamentos no decorrer do desenvolvimento de um organismo. Isso torna cada um mais apto a interagir mais eficientemente com um mundo competitivo e sempre em modificação.

Conceitualmente, memória pode ser definida como o processo de armazenamento e evocação de informações adquiridas através de experiências, a grande quantidade de tipos de memórias está relacionada com a variedade de experiências vividas (Izquierdo, 1989). O encéfalo está constantemente criando e evocando memórias, sendo que a memória não é apenas a capacidade de repetir, mas sim de variar a resposta frente a uma nova aprendizagem. A aprendizagem transforma as experiências em memórias e é o processo pelo qual humanos e outros animais captam conhecimentos (Kandel et al., 2000).

A memória só pode ser medida em animais com a observação de comportamentos modificados durante a evocação (Quillfeldt, 1994); já nos seres humanos, alguns tipos de memórias podem ser verbalmente declaradas. O aprendizado pode ser mensurado observando a mudança de desempenho numa tarefa através do treinamento repetitivo, o que pode ser observado nas suas “curvas de aprendizado” (Kandel et al., 2000).

As memórias podem ser consideradas como uma interpretação do mundo, pois nas memórias de um indivíduo existe a exclusão de fatos triviais ou pouco significantes, assim como pode ocorrer a incorporação de informações irreais. Portanto, existe um processo de tradução entre a realidade das experiências e a formação da respectiva

memória. Nos processos de tradução, são utilizadas complexas redes de neurônios e os códigos e os processos utilizados não são idênticos à realidade da qual extraem as informações. Durante a consolidação das memórias, estas células convertem a realidade em um complexo código de sinais elétricos e bioquímicos. Na evocação, ao trazer de volta essa informação ao meio, os neurônios reconvertem sinais bioquímicos ou estruturais em elétricos, de maneira que novamente os sentidos e a consciência possam interpretá-los como pertencendo ao mundo real (Izquierdo, 2002).

### 1.1 - Tipos de Memórias:

Os vários tipos de memórias são classificados por diversos critérios, como, por exemplo, de acordo com o tempo que duram e com o seu conteúdo.

Segundo o critério temporal, as memórias são classificadas de acordo com o tempo que permanecem disponíveis após a aquisição. Conceitua-se uma memória de longa duração, se uma memória poder ser evocada dias, semanas ou anos após formada. Entretanto, se ela puder ser evocada apenas por um curto período (algumas horas) após a aquisição, é chamada memória de curta duração (Izquierdo et al., 1998; McGaugh, 1966, 2000).

As memórias que registram fatos, eventos ou conhecimentos são chamadas de declarativas ou explícitas. Entre elas, aquelas que registram fatos são denominadas de memórias episódicas, e as de conhecimentos gerais, são as memórias semânticas. Essas memórias são facilmente trazidas à consciência e podem ser facilmente transmitidas de forma verbal (em humanos) (Squire, 1992).

Denominam-se memórias procedurais ou implícitas as memórias de capacidades motoras ou sensoriais, também chamados de hábitos. As memórias de procedimentos são adquiridas de maneira inconsciente e não são fáceis de descrever (é mais fácil de demonstrá-las). Por exemplo, são as memórias de como andar de bicicleta, dirigir um carro, nadar, ou conhecer as regras gramaticais de um determinado idioma (Setlow, Roozendaal & McGaugh, 2000; Ungerleider et al., 2002).

Os diversos tipos de memórias apresentam mecanismos de formação e estruturas cerebrais envolvidas distintas entre si. Porém, nesse trabalho empregaremos apenas os mecanismos de memória declarativa de longa duração.

## 1.2 - Fases da Memória

A memória de uma experiência não é algo que se estabelece instantaneamente no encéfalo de um indivíduo. É necessário um tempo, no qual a memória vai sendo preparada para se tornar algo mais permanente. Durante os primeiros minutos ou horas após sua aquisição, elas são suscetíveis à interferência de outras memórias, drogas ou outros tratamentos (McGaugh, 1966; 2000).

O processamento da memória divide-se nas fases de aquisição, consolidação/armazenamento e evocação (Quillfeldt, 1994). Apesar de possuir etapas bem caracterizadas, a memória pode sofrer constantes transformações, seja por estímulos diretamente relacionados com o episódio de aprendizagem, como tarefas repetitivas, seja por associação de outras informações aprendidas

A aquisição refere-se ao período de tempo em que o indivíduo responde aos estímulos que levarão à formação de uma memória, é dependente do grau de atenção relacionada com a nova informação (McGaugh, 2000) . A consolidação é o período em que o traço de memória ainda é instável, e está sendo complementado e modulado por várias informações sobre o ambiente (Dudai, 2004; McGaugh, Rosendaal e Cahill, 1999; McGaugh, 2000).

Para a formação de uma memória de longa duração, está envolvida uma série de processos metabólicos no hipocampo e em outras estruturas encefálicas que compreendem diversas fases e que requerem entre três a oito horas (Izquierdo e Medina, 1997). Em quanto esses processos não estiverem concluídos, as memórias de longa duração são lábeis.

Por fim, o armazenamento, é o processo através do qual o traço de memória, mais consistente, é guardado de maneira mais permanente (Quillfeldt, 1994). Finalmente, quando uma memória já esteja de algum modo armazenada, ela pode ser evocada.

O aprendizado adquirido a partir de um novo estímulo pode ser alterado das mais variadas formas, se uma ou mais das etapas de formação da memória for manipulada. A interferência pode ocorrer antes da exposição a uma nova experiência, ou nos momentos iniciais da aquisição, ou, ainda, algumas horas após. Em qualquer um desses momentos o processo de consolidação da memória é suscetível a alguma alteração (McGaugh, 1966). Já o processo de evocação pode ser interferido com tratamento aplicados minutos antes do teste (Izquierdo et al., 1997; Barros et al., 2001).

### 1.3 - A busca do engrama:

Durante a aprendizagem, mudanças fisiológicas reversíveis acontecem nos contatos sinápticos dos neurônios do encéfalo, estas mudanças devem ser estabilizadas ou consolidadas para que o traço de memória possa persistir. As mudanças temporárias reversíveis são relacionadas com os processos de formação de memórias de curta duração, e as mudanças sinápticas mais persistentes são responsáveis pela formação de um traço mais duradouro de uma memória de longa duração. Acredita-se que a estabilização desse traço é dependente da expressão gênica, controlada pelo estímulo, e da síntese protéica resultante (Dudai, 2002; Lamprecht & LeDux, 2004; McGaugh, 2000).

A possibilidade que a memória possa envolver mudanças estruturais no Sistema Nervoso tem sido especulada desde os antigos filósofos gregos. Mas a constatação fenomenológica e experimental dessa teoria começa no fim do século dezenove, quando Tanzi paralelamente com Cajal e Sherrington propuseram que a ativação repetida de um neurônio leva a mudanças metabólicas que causam uma aproximação com outro neurônio, formando pontes associativas entre eles. Essas pontes dependentes de estímulo constituem uma base fisiológica da memória (Lamprecht & LeDux, 2004; McGaugh, 2000).

Estas e outras especulações preliminares influenciaram o desenvolvimento da teoria de Hebb. Ele postulou que quando um axônio de uma célula está próximo o suficiente para excitar outra célula e repetida ou persistentemente participa no seu disparo, algum processo de crescimento ou mudança metabólica ocorre em uma ou em ambas as células, de modo que a eficiência de disparo entre ambas é aumentada (Hebb, 1949). O conceito teórico apresentado nesse postulado permanece útil como sendo o possível substrato celular do engrama ou traço de memória (Lamprecht & LeDux, 2004).

### 1.4 - Estruturas encefálicas envolvidas com a memória:

A busca pela localização física da memória existe há mais de um século. O fisiologista russo Ivan Pavlov afirmava que os processos cognitivos estavam centrados no neocórtex (Lorenzini et al., 1999). Hoje é de conhecimento que algumas regiões

específicas do encéfalo são responsáveis pelo processamento de diferentes tipos de memórias (Quillfeldt et al, 1996).

O estudo com humanos que sofreram a destruição bilateral do lobo temporal, demonstrou que essa região é importante para a formação de novas memórias declarativas, porém as lesões não causavam amnésia retrograda de longa duração (Scoville & Millner, 1957). Trabalhos envolvendo métodos que causavam a destruição ou o bloqueio farmacológico mais preciso de algumas estruturas em animais, tornaram-se exemplos de um modelo consagrado para desvendar os mecanismos da memória (McGaugh & Izquierdo, 2000). Esses trabalhos apontam que o processamento de memórias declarativas é dependente de estruturas como o hipocampo, a amígdala e o córtex entorrinal (Fuster, 1997).

O hipocampo, a amígdala e o córtex entorrinal são interconectados por vias aferentes e eferentes, o córtex entorrinal, adicionalmente, tem conexões com o córtex parietal posterior e córtex pré-frontal. Todas essas estruturas desempenham papéis de forma integrada na memória (Quillfeldt et al., 1996; Izquierdo et al., 1997; Lorenzini et al., 1999).

Contudo, a contribuição de cada estrutura e região específica não é idêntica. O hipocampo processa principalmente informações espaciais e contextuais. A amígdala é um importante núcleo modulador da atividade hipocampal e sua função apresenta, como principal substrato, informações com fortes componentes emocionais e aversivas. O estresse é um fator importante no processamento integrado entre hipocampo e amígdala (Pitkanen, Savander & Ledoux, 1997).

O córtex entorrinal está encarregado de integrar as informações provenientes do hipocampo e da amígdala. Assim, o córtex entorrinal participa do processamento e armazenamento de diferentes conteúdos cognitivos, tanto aversivos contextuais como espaciais (Quillfeldt et al., 1996; Izquierdo et al., 1997).

O hipocampo, objeto de estudo deste trabalho, é um importante centro de plasticidade sináptica e sua atividade é amplamente modulada por outras regiões encefálicas, como por exemplo: a amígdala e os núcleos colinérgicos do septo medial e o núcleo basalis de Meynert. O hipocampo é composto por duas áreas, dobradas uma sobre a outra. Uma é chamada de Giro Denteado, enquanto a outra é denominada de Corno de Amon. O Corno de Amon apresenta duas subregiões principais CA3 e CA1 (Cooper & Lowenstein, 2001).

O córtex entorrinal é uma grande via de entrada de informações ao hipocampo, através de um feixe de axônios chamado de via perfurante. Esses axônios estabelecem sinapses com os neurônios granulares do giro denteado. Os neurônios do giro denteado projetam axônios através das fibras musgosas que fazem sinapses com os neurônios piramidais de CA3. As células de CA3 projetam axônios que se ramificam. Um ramo deixa o hipocampo pelo fórnix e o outro, chamado de colateral de Schaffer, forma sinapses com os neurônios piramidais de CA1, que, por sua vez, comunicam-se com o córtex entorrinal. O circuito trisináptico básico do hipocampo apresenta contatos sinápticos extremamente plásticos e suscetíveis a modulação tanto por agentes endógenos como por fármacos infundidos, além de suas vias constituírem objetos de estudo de diferentes protocolos eletrofisiológicos (Cooper & Lowenstein, 2001).

A via septo-hipocampal é uma importante entrada colinérgica ao hipocampo, provavelmente projetando para as regiões dendríticas proximais de neurônios piramidais e para os interneurônios. Um pequeno número de neurônios colinérgicos intrínsecos também estão presentes no hipocampo. É sabido que a liberação de acetilcolina causa certas ações, incluindo excitação, desinibição, e inibição pré-sináptica nas células piramidais do hipocampo. Portanto, os neurônios aferentes do septo podem efetivamente alterar a atividade hipocampal (Rouse et al., 1999). O sistema septo-hipocampal, com a circuitaria interna da formação hipocampal, mais as conexões com regiões associativas do córtex, com a amígdala e com o núcleo basalis de Meynert, sugere fortemente um possível substrato morfológico para os processos superiores da memória. (Gray, 1982).

Cada etapa do processamento da memória parece envolver diferentes mecanismos e diferentes áreas do Sistema Nervoso Central. De acordo com Quillfeldt et al. 1996, a formação da memória requer a atividade integrada seqüencial de diferentes áreas: como o hipocampo, a amígdala (basolateral), o córtex entorrinal e o córtex posterior parietal também são necessários para a evocação da esquivia inibitória 24 horas após o treino. Com outros intervalos entre treino e teste, porém, estas estruturas têm participação diferenciada: o hipocampo juntamente com a amígdala é necessário apenas até 26 dias após o treino, o córtex entorrinal apresenta função somente até 30 dias, e o córtex posterior parietal é necessário de dois a três meses após o treino para a evocação em ratos.

É possível que o nível de atenção, dependente da atividade cortical, dado a uma determinada nova experiência leve a ativação da formação hipocampal, que sofreria

alterações plásticas, fazendo com que a nova informação possa ser armazenada de forma mais definitiva nas estruturas corticais mais ascendentes. O hipocampo parece constituir um local transitório onde a informação seria temporariamente armazenada.

Outras áreas encefálicas como o teleencéfalo basal, principalmente o estriado, o cerebelo e os córtices motores também participam do processamento de memórias com conteúdo procedural ou implícito. Talvez, atuando de forma paralela e independente de estruturas límbicas ou dos lóbulos temporais (Fuster, 1997).

### 1.5 - Mecanismos do processo de consolidação da memória:

Os mecanismos de consolidação de memórias de longa duração, a fase de formação da memória mais bem estudada, começaram a ser desvendado nos últimos 15 anos em consequência da descoberta de um processo eletrofisiológico chamado Potenciação de longa duração (PLD). Esta consiste no aumento persistente da resposta de neurônios a uma breve estimulação tetânica de um axônio ou conjunto de axônios que fazem sinapses com elas. Em seguida, foi descrita a Depressão de Longa Duração (DLD), outro fenômeno eletrofisiológico que consiste na inibição persistente de uma determinada resposta sináptica como consequência, também, da estimulação repetida, porém de baixa frequência, de uma via aferente (Lamprecht & LeDoux, 2004).

Os mecanismos de PLD e DLD foram estudados fundamentalmente no hipocampo de roedores examinando fatias dessa região em estudos *in vitro*. Das várias sub-regiões do hipocampo, a mais estudada foi a CA1; essa região foi ativada pela estimulação das fibras que procedem da subárea CA3 (Kandel et al., 2000).

Esses foram os processos eletrofisiológicos observados cuja a duração podia ser medida em horas, semanas ou meses. Essa longa duração, análogo ao próprio fenômeno da memória, levou muitos a considerá-los como possíveis bases dos processos de formação e armazenamento da memória (Stevens, 1998).

Porém, trabalhos posteriores demonstraram que os mecanismos envolvidos com o processo de consolidação não são completamente idênticos à potenciação de longa duração, mesmo que, na sub-região CA1, utilizem muitos processos em comum (Stevens, 1998).

A explicação mais provável para os fenômenos de PLD, DLD e consolidação de memórias declarativas de longa duração é que as células nervosas, mais particularmente, as células piramidais da região CA1 do hipocampo, sofrem

modificações plásticas. Denomina-se “plasticidade sináptica” o conjunto de processos fisiológicos, no nível celular e/ou molecular, que explica a capacidade dos neurônios de mudar suas respostas com relação a determinados estímulos da experiência (Bliss & Collingridge, 1993; Lamprecht & LeDoux, 2004).

A farmacologia tem se revelado um importante aliado nos estudos comportamentais, sobretudo na pesquisa dos processos da memória (McGaugh & Izquierdo, 2000). Os tratamentos realizados após o treino são os mais adequados para estudar a memória de qualquer tarefa, podendo resultar em facilitação ou prejuízo desta (McGaugh, 1966, 2000). A existência de sistemas endógenos que, quando manipulados experimentalmente, afetam o desempenho dos animais no teste, sugere que muitos destes sistemas estejam fisiologicamente envolvidos na consolidação e/ou evocação da memória.

Há alguns anos atrás, os sistemas moduladores mais estudados eram aqueles envolvidos com a resposta de adaptação ao estresse, compreendendo os sistemas mediados por catecolaminas como a noradrenalina e a adrenalina, e por neuropeptídeos como a  $\beta$ -endorfina e vasopressina (Izquierdo et al., 1993). Atualmente, existe um consenso da atividade de sistemas de neurotransmissores efetores, como o aminoácido excitatório glutamato e o inibitório GABA, que são modulados pelos outros sistemas, em especial pelo sistema colinérgico.

O principal candidato a promotor da plasticidade sináptica no processo de consolidação da memória é a ativação do receptor glutamatérgico ionotrópico do tipo NMDA, que permite o influxo de  $\text{Ca}^{++}$  na célula. Esse é o receptor mais complexamente regulado que se conhece, pois ele necessita da ligação do neurotransmissor glutamato (ou aspartato) e da ligação da glicina (considerada um coagonista do receptor) ao seu sítio específico; além disso, apresenta sítios de ligação para poliaminas (espermina e espermidina). Ele também apresenta, em seu interior, sítios de reconhecimento do  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Zn}^{++}$  e  $\text{H}^+$ , que normalmente bloqueiam o canal. Portanto, é necessário, além da ligação do seus agonistas, a despolarização da membrana em torno do receptor, para promover a sua ativação. Dentre os possíveis responsáveis por tal despolarização, estão os outros dois receptores glutamatérgicos ionotrópicos, AMPA e Cainato, pois o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do Sistema Nervoso Central (Dingledine & McBain, 1999).

O influxo de cálcio nas células origina uma cascata de sinalização com a ativação de várias proteínas-cinase, entre elas a proteína cinase dependente de cálcio

(PKC) e a cálcio-calmodulina cinase tipo II (CAMK II). A atividade dessas enzimas favorece a fosforilação de diversos tipos de receptores ao glutamato, ativando-os por várias horas (Izquierdo e McGhaugh, 2000).

Simultaneamente à ativação do receptor NMDA, ocorre a ativação de receptores glutamatérgicos metabotrópicos, de receptores colinérgicos muscarínicos e de noradrenérgicos  $\beta$ , que modulam a ação dos anteriores. Deste modo também ocorre a produção de outros segundos mensageiros, como o GMPc e o AMPc, que ativam outras proteínas cinase, como a proteína cinase dependente de GMPc (PKG), a proteína cinase dependente de AMPc (PKA) e as proteínas cinase ativáveis por agentes mitógenos (MAPK) (Dudai, 2004).

Essas cinases fosforilam uma série de outras proteínas, e ao fim da cascata, levam a mudança nos níveis de expressão na atividade de várias proteínas, como, por exemplo, a ativação da P-CREB nuclear, que participa em processos que levam à síntese de muitas proteínas (Dudai, 2004).

A PKG está envolvida na produção de mensageiros retrógrados, pois ativa três enzimas: a óxido nítrico sintetase, que produz NO; a hemeoxigenase, que produz monóxido de carbono; e a enzima que produz o fator de ativação plaquetário (PAF). O NO e o CO são gases que se difundem através da membrana, migrando para a terminação pré-sináptica; o PAF é um lipídio que também atravessa a membrana dendrítica, dirigindo-se à terminação axonal. Estas três substâncias aumentam a eficiência da sinapse através de mecanismos que promovem o aumento da liberação do neurotransmissor glutamato (Dudai, 2004).

Enfim, o armazenamento de memórias se deve, também, a alterações morfológicas das sinapses envolvidas. A ativação plástica de algumas vias nervosas, envolvendo o hipocampo e suas conexões, causa alterações ao metabolismo celular e modificações morfológicas das sinapses por meio de uma série de passos moleculares, na subregião do giro denteado, especialmente, a plasticidade pode ocorrer, inclusive, com neurogênese (McEwen, 1999).

#### 1.6 - Mecanismos de evocação de memórias de longa duração:

Como já descrito anteriormente, a única forma de medir uma memória é verificarmos a alteração de um comportamento durante a evocação, onde ocorre a reativação das redes sinápticas de cada memória (Quillfeldt et al 1994). A evocação

será, então, mais fidedigna quanto mais componentes do estímulo condicionado sejam apresentados na hora do teste. Recriar uma memória para evocá-la, implica em conchamar à ação o maior número de sinapses pertencentes aos estímulos condicionados dessa memória.

Trabalhos anteriores demonstraram que diferentes regiões do encéfalo são necessárias para a evocação da memória em diferentes períodos após a aquisição, bem como a ativação dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos não-NMDA AMPA e Cainato (Quillfeldt et al., 1996). Neste trabalho, porém, devido ao uso do CNQX (um antagonista inespecífico sobre esses receptores), não foi possível verificar qual desses receptores era mais importante, embora se tenha proposto o envolvimento básico do receptor AMPA na evocação da memória no córtex entorrinal 26 dias após o treino (Quillfeldt et al., 1994). Nesse trabalho a amnésia provocada pelo CNQX foi revertida com a infusão concomitante de AMPA, sugerindo que os receptores AMPA seriam os principais envolvidos nos processos de evocação de memórias aversivas; a infusão isolada de AMPA, contudo não promoveu qualquer efeito.

Os receptores AMPA estão espalhados pelo SNC e servem como agentes de transmissão excitatória rápida mediada pelo glutamato, controlando o fluxo de  $\text{Na}^+$  ou  $\text{K}^+$  (Dingledine e McBain, 1999). Seu melhor agonista é o AMPA e apresenta como antagonistas seletivos o CNQX e DNQX, e, em especial, o NBQX, que é o mais específico para esse receptor.

Os receptores glutamatérgicos do tipo Cainato não são ativados com AMPA nem com NMDA, mas respondem fortemente ao ácido caínico, que é um agonista cerca de 50 vezes mais potente que o glutamato para despolarizar neurônios. O cainato também apresenta uma ação neurotóxica seletiva, mostrando um efeito excitatório desse receptor, que também controla o fluxo de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  através da membrana plasmática (Quillfeldt, 1994). O CNQX é um antagonista pouco seletivo para este receptor; mais recentemente foi descoberto o NS-102, que é 20 vezes mais seletivo para o receptor Cainato que para o receptor AMPA (Chitatajallu et al., 1999).

Simultaneamente à ativação dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos não-NMDA, as vias metabólicas da PKA, PKC e MAPK são necessários em CA1, córtices entorrinal, parietal e cíngulo anterior. Diferentemente da consolidação, a CAMK II não é importante para a evocação (Izquierdo et al., 1998; Szapiro et al., 2002).

A evocação constitui um processo molecular complexo que ocorre simultaneamente em várias áreas cerebrais, e que obedece a mecanismos bioquímicos

próprios. A participação de enzimas como a PKA, PKC e MAPK sugere que outros sistemas de neurotransmissores, e outros receptores metabotrópicos, participam do processo. Além disso, essas são as três principais vias enzimáticas em todos os fenômenos plásticos conhecidos nos tecidos nervosos, indicando que o processo de evocação da memória não é simplesmente uma consequência da consolidação, mas um processo novo e diferenciado (Szapiro et al., 2002).

### 1.7 - O sistema colinérgico muscarínico e memória

A síntese de acetilcolina ocorre nos terminais nervosos a partir de dois precursores, a colina e a acetil-coenzima A, fornecidas pela clivagem de fosfolipídeos e a partir do metabolismo oxidativo na mitocôndria. A colina acetiltransferase catalisa a síntese de acetilcolina que, por sua vez, pode interagir com receptores colinérgicos pré e pós-sinápticos. A acetilcolinesterase, localizada pré e pós-sinápticamente, hidroliza a acetilcolina e colina e acetato (Taylor & Brown, 1999)

O sistema colinérgico desempenha um papel essencial nos processos aprendizado e memória (Winkler et al., 1995). O neurotransmissor acetilcolina (ACo) liga-se a duas classes de receptores: os receptores colinérgicos nicotínicos, de ação ionotrópica, e os receptores colinérgicos muscarínicos, de ação metabotrópica (Kandel, 2000).

A anatomia do sistema colinérgico central envolve três grupos de neurônios principais: o sistema motor, que inclui os motoneurônios da medula espinhal e núcleos dos nervos dos pares cranianos; os neurônios colinérgicos estriatais, que participam do controle motor extrapiramidal; e os neurônios da coluna colinérgica rostral do prosencéfalo basal, incluindo o complexo septo medial, que projeta axônios ao hipocampo, e o núcleo basal, que projeta à amígdala, demonstrando envolvimento com aprendizado e memória (Singh, 1985).

Os receptores muscarínicos pertencem à superfamília de receptores acoplados à proteína G. Esse sistema é composto de cinco subtipos de receptores (M1 a M5), cada qual codificado por um gene específico, sendo que os receptores M1 ao M4 são expressos no neocórtex (Kimura e Baughman, 1997).

A ACo ao ligar-se ao receptor muscarínico, dispara um sinal da membrana ao citoplasma, cuja latência de ativação é lenta (100-250 ms) em comparação com um receptor ionotrópico. Quando ocorre a ativação de um receptor muscarínico, a proteína

G, composta por três subunidades ( $G\alpha$ ,  $G\beta$  e  $G\gamma$ ), tem suas subunidades desacopladas devido a atividade de  $G\alpha$  que desliga-se do GDP e liga-se ao GTP, estimulando uma cascata de sinalização intracelular (Selbie e Hill, 1998).

Dependendo do tipo de receptor metabotrópico e do tipo de proteína G associada, a subunidade  $G\alpha$  pode produzir efeitos diversos:

- ativação da fosfolipase C, formando inositol-trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG);
- ativação da adenilil ciclase, aumentando os níveis de AMPc;
- inibição da adenilil ciclase, diminuindo os níveis de AMPc;
- ativação da fosfolipase A, formando ácido araquidônico (Selbie e Hill, 1998).

Já foi demonstrado que os subtipos de receptores muscarínicos M1, M3 e M5, preferencialmente, são associados à subunidade  $G\alpha$  da família Gq/G11, resultando na estimulação de diferentes isoformas de PLC. Entretanto, os receptores M2 e M4 acoplam-se à classe Gi/G0, envolvida na inibição da adenilil ciclase (Jerusalinsky e Harvey, 1994).

O principal papel do sistema colinérgico muscarínico sobre a memória parece ser o de desempenhar um efeito modulatório (Segal e Auerbach, 1997). Os diferentes subtipos de receptores muscarínicos são importantes para a regulação independente de respostas excitatórias e inibitórias via outros neuromoduladores e segundos mensageiros (Kimura e Baughman, 1997). Antagonistas colinérgicos atenuam a influência no armazenamento da memória pela atividade opióide, GABAérgica e  $\beta$ -adrenérgica, sugerindo uma modulação colinérgica da memória sobre todos esses sistemas (Introini-Collison et al., 1996).

A administração intraperitonal de escopolamina, um antagonista colinérgico muscarínico inespecífico, diminui o aprendizado espacial e este efeito é revertido pelo agonista inespecífico oxotremorina (Lamberty e Gower, 1991).

Tem-se encontrado diversos fármacos extraídos da natureza que mimetizam muitas substâncias endógenas. Certas toxinas, em especial, apresentam-se como valiosas ferramentas farmacológicas para a pesquisa básica e para a descoberta de alvos de agentes terapêuticos, graças ao seu grande poder seletivo sobre os receptores (Harvey et al., 1998).

Da peçonha de serpentes do gênero *Dendroaspis* (mambas) foram descobertas neurotoxinas com atividade seletiva aos receptores muscarínicos, que foram batizadas de Toxinas Muscarínicas (MTs). As toxinas MT1, MT2, MT3 e MT7 foram extraídas

do veneno da mamba verde africana (*Dendroaspis angusticeps* figura 1), conforme a ordem de descoberta, além da m1-toxina (seletiva ao receptor M1) (Harvey et al., 1998). A MT1 e a MT2 são agonistas de receptores M1 e antagonistas de receptores M4, mas a MT2 é mais seletiva para o receptor M1 (Jerusalinski e Harvey, 1994). A MT3 apresenta 214 vezes mais afinidade ao receptor M4 que para o receptor M1, sendo o antagonista mais seletivo para o receptor M4. A MT7 é a isotoxina da m1-toxina e bloqueia com grande afinidade o receptor M1(Olianas et al.,1997).

Tabela1 – Afinidade e ação das Toxinas Muscarínicas sobre os receptores muscarínicos.

Toxina	Ação Sobre o Rreceptor	Afinidade	Referência Bibliográfica
MT1	agonista M1/antagonista M4	$M1 \cong M4$	Jerusalinsky e Harvey, 1994
MT2	agonista M1/antagonista M4	$M1 \cong 4 \times M4$	Jerusalinsky e Harvey, 1994
MT3	antagonista M4	$M4 \cong 214 \times M1$	Olianas et al., 1997
MT7	antagonista M1	-	Olianas et al., 1997

Resultados anteriores demonstraram que a administração intra-hipocampal pós-treino da esquivia inibitória, da MT1 em doses 0,30 e 2,00  $\mu\text{g/lado}$ , somente apresentou efeito facilitatório sobre a retenção da memória na dose mais baixa (Jerusalinsky et al., 1995; Ferreira, 2001; Ferreira et al, 2003). Como a MT1 se liga aos receptores M1 e M4, mas com maior afinidade pelo M1, em uma baixa concentração o efeito possivelmente se deve a que se liga principalmente ao M1, um receptor excitatório; a inefetividade da dose maior poderia ser atribuída ao recrutamento concomitante do M1 e do M4, um receptor inibitório.

A administração intra-hipocampal pré-teste de MT3, o antagonista colinérgico muscarínico mais seletivo para os receptores do tipo M4, na tarefa de esquivia inibitória, também causou um efeito facilitatório sobre a evocação desta tarefa (Diehl, 2003). Porém este efeito é contrário ao encontrado com a infusão pós treino (efeito amnésico na consolidação) (Jerusalinsky et al., 1998; Ferreira et al, 2003). Resultados que permitem inferir mecanismos contrários da modulação muscarínica nos processos de consolidação e evocação de memórias aversivas (hipótese a ser testada nesse trabalho).



Figura 1 : serpente mamba verde africana (*Dendroaspis angusticeps*)

## 2.0 - Objetivos:

### 2.1 - Objetivos Gerais:

O envolvimento do sistema colinérgico muscarínico no processo de consolidação da memória tem sido extensivamente estudado, inclusive no nível dos subtipos de receptores, porém são escassos os dados referentes às funções desse sistema na evocação da memória. O objetivo geral do trabalho é investigar o papel desse sistema na evocação da memória através de experimentos com a infusão intra-hipocampal pré-teste das toxinas muscarínicas MT2 e MT3, comparando seus efeitos com fármacos sintéticos como a pirenzepina (seletivo para M1 e M4), a escopolamina (antagonista pouco seletivo) ou a oxotremorina (agonista também pouco seletivo). O estudo foi realizado com a infusão de diferentes doses desses fármacos (curvas dose-resposta). Esses experimentos foram realizados na de tarefa comportamental com componentes aversivos, a Esquiva Inibitória.

### 2.2 - Objetivos Específicos:

- 2.2.1 - Estudar o efeito da administração intra-hipocampal do antagonista colinérgico muscarínico escopolamina no processo de evocação da esquiva inibitória.
- 2.2.2 - Estudar o efeito da administração intra-hipocampal do agonista colinérgico muscarínico oxotremorina no processo de evocação da esquiva inibitória.
- 2.2.3 - Estudar o efeito da administração intra-hipocampal do antagonista colinérgico muscarínico pirenzepina no processo de evocação da esquiva inibitória.
- 2.2.4 - Estudar o efeito da administração intra-hipocampal da toxina muscarínica MT3 (antagonista seletivo para o receptor M4) no processo de evocação da esquiva inibitória.

- 2.2.5 - Estudar o efeito da administração intra-hipocampal da toxina muscarínica MT2 (agonista seletivo M1 e antagonista M4) no processo de evocação da esquiva inibitória.
- 2.2.6 - Estudar o efeito da administração intra-hipocampal do antagonista colinérgico muscarínico escopolamina no processo de evocação da habituação ao campo aberto.
- 2.2.7 - Estudar o efeito da administração intra-hipocampal da toxina muscarínica MT3 (antagonista seletivo para o receptor M4) no processo de evocação da habituação ao campo aberto.

## 3.0 - Material e Métodos:

### 3.1 - Animais:

Foram utilizados 150 ratos Wistar machos com 2 a 3 meses de idade e pesando de 250 a 300 gramas, fornecidos pelo 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. Os animais foram aclimatados ao nosso ratário por um período de aproximadamente 7 a 15 dias, onde as condições de ambientais de temperatura e umidade eram mantidas constantes.

Os ratos ficaram confinados em caixas, com no máximo 6 animais, que eram trocadas 3 vezes por semana. A alimentação fornecida aos animais era a mesma do CREAL e disponível à vontade.

### 3.2 - Procedimentos Cirúrgicos:

Os animais foram submetidos a um procedimento de cirurgia estereotáxica (figura 2), em que primeiramente eles eram anestesiados intra-peritonealmente com uma combinação de Ketamina (“Dopalen”) e Xilazina (“Francotar”), em uma mistura de 60% de Ketamina e 40% de Xilazina.

Após estarem anestesiados, os animais eram colocados em um aparelho de cirurgia estereotáxica para ratos, onde o escalpo era retirado, expondo o topo do crânio. O ponto do Bregma serviu como referência para as coordenadas estereotáxicas adaptadas a partir do atlas de Paxinos & Watson (1997). As coordenadas foram confirmadas com a realização de cirurgias-piloto previamente. Para a região hipocampal dorsal as coordenadas foram:

- antero-posterior (AP) = posição do bregma – 0,42;
- látero-lateral (LL) = posição do bregma +/- 0,30;
- dorso-ventral (DV) = posição da dura-máter – 0,15.

Em seguida, com a utilização de uma broca odontológica, foram realizados orifícios bilaterais nos locais correspondentes a AP e LL do hipocampo dorsal. Uma cânula de aço, confeccionada a partir de agulhas hipodérmicas calibre 22 e medindo 9



Figura 2 – Implantação bilateral de cânulas no hipocampo dorsal com aparelho estereotáxico.

milímetros era, então, posicionada sobre cada orifício e baixada através da torre móvel do estereotáxico até encostar na dura-máter, onde era anotada a coordenada DV. Quando as cânulas estavam no ponto correto, ou seja com a ponta a um milímetro da região hipocampal dorsal, elas eram fixadas ao crânio com a utilização de acrílico odontológico formando um “capacete”. Um parafuso também era colocado em um orifício feito no osso occipital para garantir a permanência do “capacete” na cabeça do rato durante todo o período experimental.

Imediatamente após a cirurgia, os animais eram colocados em uma caixa de recuperação, onde permaneciam aquecidos através de uma lâmpada incandescente vermelha até despertarem da anestesia, quando retornavam para as suas caixas de origem. Após um período de recuperação de 3 a 4 dias, os animais estavam prontos para os procedimentos comportamentais.

### 3.3 - Tarefa Comportamental de Esquiva Inibitória

A principal tarefa comportamental utilizada foi a Esquiva Inibitória (figura 3). O experimento consiste de condicionamento clássico ou pavloviano que funciona pareando um estímulo condicionado (uma caixa a ser explorada pelo rato) com outro incondicionado (choque elétrico). É basicamente um modelo rápido e simples de criar uma memória aversiva que produz uma alteração clara de comportamento dos animais (Izquierdo, 2002).

O aparelho consiste de uma caixa de madeira automatizada com aproximadamente 50 centímetros de comprimento, 25 centímetros de largura e 25 centímetros de altura. A frente de caixa é composta por um vidro transparente, para a observação do animal. O assoalho da caixa é constituído por uma grade de barras metálicas, espaçadas entre si em um centímetro. 7 centímetros sobre essa grade, no lado esquerdo da caixa, existe uma plataforma de madeira com 8 centímetros de comprimento e 25 centímetros de largura.

O experimento é composto de uma sessão de treino e um teste posterior dos ratos. No treino os animais são depositados sobre a plataforma, virados com a cabeça para o fundo da caixa, e após alguns segundos de atividade exploratória, característica comum dos ratos, eles desciam para a grade metálica. Quando eles ficassem com as



Figura 3 – Vista geral da caixa automatizada utilizada no experimento de Esquiva Inibitória.

quatro patas nas barras metálicas, recebiam um choque intermitente de 0,5 mA por 3 segundos. A latência de espera para a descida da plataforma era registrada.

O teste ocorria 24 horas após o treino, onde cada animal era colocado novamente na caixa de tarefa sobre a plataforma, em condições idênticas ao treino. O tempo de descida da plataforma era novamente registrado, sendo este o índice de memória da tarefa. Os animais que aprenderam e retiveram a memória aversiva da tarefa, tendiam a permanecer mais tempo sobre a plataforma. Em todos os grupos o teto máximo de permanência na plataforma no teste era de 180 segundos.

### 3.4 - Tarefa Comportamental de Habituação ao Campo Aberto

A tarefa de habituação ao campo aberto (figura 4) foi utilizada como um modelo de memória que não apresenta um componente aversivo tão forte como a da esquiva inibitória. Essa tarefa consiste de uma caixa de madeira com 50 cm de altura e uma base com 60×40 cm dividida 12 quadrados iguais. Na parte frontal da caixa existe uma janela de vidro transparente com 30 cm de altura que parcialmente fecha a caixa.

Essa tarefa também apresenta duas sessões (treino e teste), separadas por 24 horas. Em cada sessão, o rato era solto num quadrante localizado no fundo da caixa do lado esquerdo. Cada rato podia explorar a caixa livremente por dois minutos e o número de cruzamentos e elevações ou respostas de orientação era registrado. A diferença entre as duas sessões no número de cruzamentos e de respostas de orientação foi considerado como uma medida de retenção da habituação ao campo aberto: se os animais tivessem sido habituados ao campo durante a primeira sessão, eles reconheceriam o ambiente como familiar, e, em consequência, o número de cruzamentos e de respostas de orientação seria menor na segunda sessão. O número de cruzamentos na sessão de teste nos informou se o fármaco infundido poderia causar algum efeito motor nos animais. Por isso, a habituação de campo aberto serviu como um controle motor da tarefa de Esquiva Inibitória, somente foi utilizada na habituação uma dose de droga que foi efetiva na Esquiva Inibitória.



Figura 4 – Vista geral da caixa de Habituação ao Campo Aberto.

### 3.5 - Infusão das Drogas:

Neste trabalho os mecanismos de evocação da memória estavam sendo investigados, por isso a infusão dos fármacos em todos os grupos era realizada 20 minutos antes do teste tanto de Esquiva Inibitória como de Habituação ao Campo Aberto.

O procedimento de infusão consistia de imobilizar os ratos, enrolando-os com uma toalha, e injetar as drogas através das cânulas. Para realizar esse trabalho foram utilizadas microseringas Hamilton de 10 microlitros com um pequeno tubo plástico presa à agulha da microseringa. Na outra extremidade da mangueira, havia uma agulha fina tipo “mizzy” com diâmetro externo de 0,3 mm e um centímetro de comprimento. Essa pequena agulha era introduzida através das cânulas e, por ser um milímetro mais comprida, entrava em contato com a estrutura cerebral de interesse (região hipocampal dorsal).

As drogas foram infundidas bilateralmente com a utilização de uma bomba propulsora automática de microseringas Hamilton com um fluxo 0,5 microlitros injetados em 90 segundos; o volume injetado de veículo, no grupo controle, era sempre igual ao volume de droga.

### 3.6 - Fármacos Utilizados:

Para cada grupo que recebeu um tipo de droga existia um grupo controle que foi infundido com o veículo do mesmo fármaco. Os primeiros experimentos realizados foram os de Esquiva Inibitória e o primeiro grupo droga utilizado foi infundido com metil-escopolamina, que é um antagonista colinérgico muscarínico pouco seletivo. Em seguida, foi realizado um experimento com a infusão de oxotremorina, que é um agonista colinérgico muscarínico pouco seletivo. A partir daí, buscamos fármacos mais seletivos como a pirenzepina, antagonista muscarínico M1 e M4 (pouco seletivo entre eles) e as toxinas muscarínicas MT2, agonista seletivo para receptor M1 com atividade antagonista, também, sobre receptor M4, e MT3, antagonista colinérgico muscarínico mais seletivo para os receptores metabotrópicos do tipo M4.

Todas as drogas infundidas tinham como veículo e, conseqüentemente, como grupo controle o Tampão Fosfato Salino (TFS).

As doses de drogas infundidas pré-teste de Esquiva Inibitória foram:

- Escopolamina 0,5, 2,0 e 8,0 µg por lado;
- Oxotremorina 2,5 e 5 ng por lado;
- Pirenzepina 0,5 µg por lado;
- MT3 0,5, 1,0 e 2,0 µg por lado;
- MT2 0,75, 1,0 e 6,0 µg por lado.

No experimento de Habituação ao Campo Aberto foram infundidos apenas a escopolamina (dose de 2,0 µg por lado), e a MT3 (dose de 2,0 µg por lado)

### 3.7 - Análise do Posicionamento das Cânulas:

Após o término dos experimentos, todos os animais foram sacrificados por decapitação. Em seguida, os ratos que receberam alguma das drogas recebiam a infusão através das cânulas de 0,5 microlitros do corante Azul Tripán em solução para marcar o local onde a droga havia sido originalmente infundida. Esses ratos tinham seus cérebros imediatamente retirados e colocados em formol 10%.

Após um período de alguns dias de fixação dos cérebros no formol, era feita a análise do posicionamento das cânulas, onde eles eram cortados manualmente com um bisturi e a marca do corante era visualmente comparada com uma figura, representando um corte de cérebro da região correspondente às nossas coordenadas estereotáxicas, retiradas do atlas de Paxinos e Watson (1997). Somente os animais corretamente operados tinham seus dados considerados na análise estatística (figura 5).

### 3.8 - Análise Estatística:

Os dados referentes às latências da esquiva inibitória necessitavam passar por um teste de “normalidade” (teste de Kolmogorov-Smirnov com correção de Lilliefors). Constatando a existência de dados não-paramétricos, as diferenças entre os grupos eram avaliadas pelo teste ANOVA Kruskal-Wallis com teste “post hoc” de Dunn. A comparação entre treino e teste dentro de um mesmo grupo era feita com o teste Wilcoxon.

Na tarefa de Habituação ao Campo Aberto os dados referentes ao número de cruzamentos e respostas de orientação apresentavam distribuição normal. Os diferentes

grupos foram comparados com o teste t de Student, e treino e teste, dentro de um mesmo grupo, foi comparado com teste t pariado.

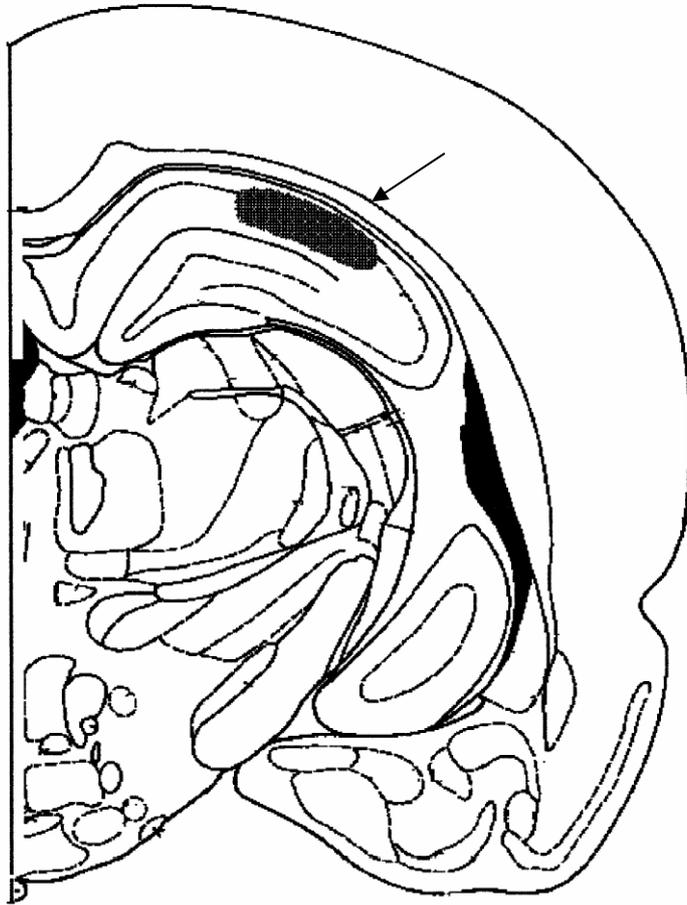


Figura 5 – posição da marca do corante injetado (Atlas de Paxinos e Watson, 1997).

## 4.0 - Resultados:

### 4.1 - Resultados referentes aos experimentos de Esquiva Inibitória:

#### 4.1.1 – Administração intra-hipocampal pré-teste de Escopolamina:

Os grupos que receberam as doses (0,5, 2,0 e 8,0  $\mu\text{g/lado}$ ) de escopolamina (antagonista colinérgico muscarínico inespecífico) (figura 6) pré-teste intra-hipocampal e o respectivo grupo controle não apresentaram diferença estatisticamente significativa no desempenho no treino,  $P=0,401$ , possibilitando a comparação entre os grupos. Porém, houve diferença entre os ratos que receberam veículo e, pelo menos, em um dos grupos que receberam escopolamina no desempenho do teste,  $P=0,001$  (teste de Kruskal-Wallis). O teste “post hoc” de Dunn indicou que apenas o grupo infundido com a dose de 2,0  $\mu\text{g}$  por lado teve um desempenho diferente do grupo controle ( $P<0,05$ ), demonstrando o efeito facilitatório dessa dose de droga. O desempenho no teste dos grupos que receberam alguma dose do fármaco e do grupo veículo foi significativamente melhor do que o desempenho no treino,  $P<0,05$  (teste de Willcoxon), confirmando a retenção da tarefa em ambos os grupos.

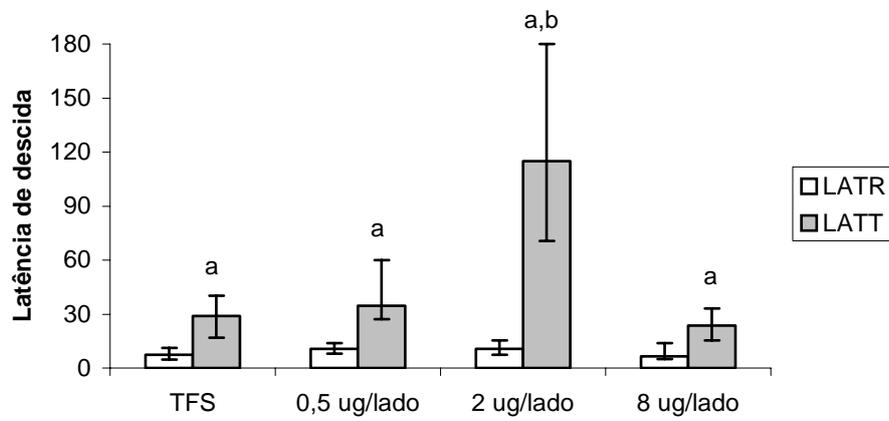


Figura 6 - Escopolamina pré-teste:(a) diferença significativa em relação ao treino (N= 22, 14, 12 e 10, respectivamente) (b) diferença significativa em relação ao teste do grupo controle (P=0.000, teste de Kruskal-Wallis).

#### 4.1.2 - Administração intra-hipocampal pré-teste de Oxotremorina:

Os grupos que receberam as doses (2,5 e 5,0 ng/lado) de Oxotremorina (agonista colinérgico muscarínico inespecífico) (figura 7) pré-teste intra-hipocampal e o respectivo grupo controle não apresentaram diferença estatisticamente significativa no desempenho no treino,  $P=0,739$ , possibilitando a comparação entre os grupos. Também não houve diferença significativa no desempenho no teste entre os grupos,  $P=0,180$  (teste de Kruskal-Wallis). Porém, apenas o grupo controle teve um desempenho no teste significativamente diferente do treino,  $P=0,005$  (teste de Willcoxon), confirmando a retenção da tarefa nesse grupo. Os grupos infundidos com ambas as doses de oxotremorina apresentaram desempenhos idênticos entre o treino e o teste,  $P=0,066$  e  $P=109$ , respectivamente (teste de Willcoxon). Demonstrando um efeito amnésico parcial dessa droga

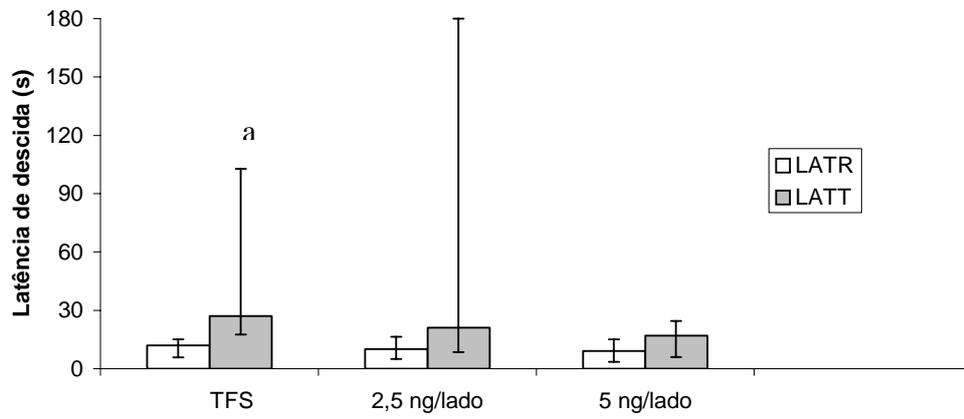


Figura 7 - Oxotremorina pré-teste:(a) diferença significativa em relação ao treino (N= 10, 9 e 9, respectivamente).

#### 4.1.3 - Administração intra-hipocampal pré-teste de Pirenzepina:

O grupo que recebeu a dose de 0,5 µg/lado de pirenzepina (antagonista m1/m4 pouco seletivo entre eles) (figura8) pré-teste intra-hipocampal e seu respectivo grupo controle não apresentaram diferença estatisticamente significativa no desempenho no treino,  $P=0,115$  (teste U de Mann-Whitney), possibilitando a comparação entre os grupos. Porém, houve diferença entre os ratos que receberam veículo e droga no desempenho do teste,  $P=0,000$  (teste U de Mann-Whitney), demonstrando o efeito facilitatório da pirenzepina. O desempenho no teste do grupo que recebeu droga e do grupo veículo foi significativamente melhor do que o desempenho no treino,  $P<0,05$  (teste de Willcoxon), confirmando a retenção da tarefa em ambos os grupos.

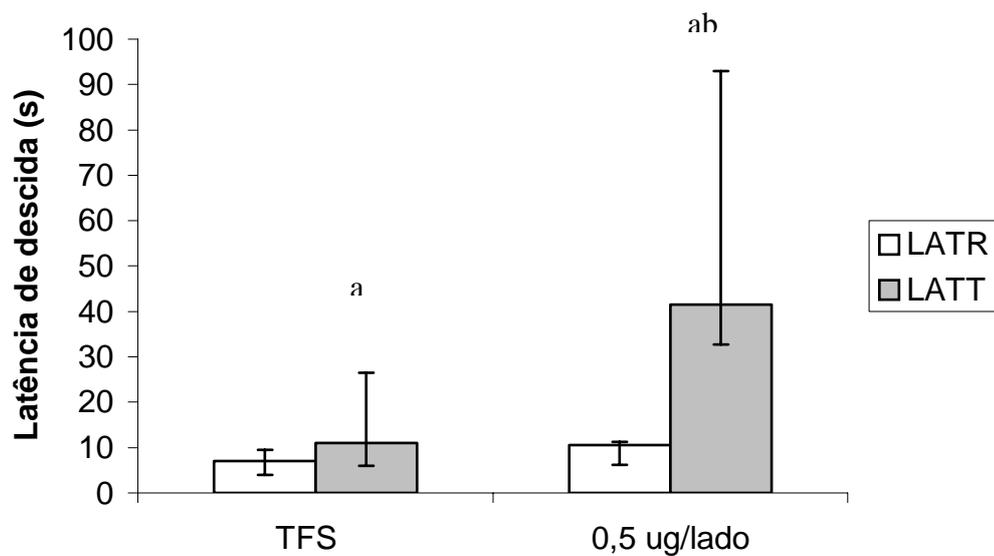


Figura 8 - Pirenzepina pré-teste:(a) diferença significativa em relação ao treino (N=13 e 10); (b) diferença significativa em relação ao teste do grupo controle (P=0.000, teste de Mann-Whitney).

#### 4.1.4 - Administração intra-hipocampal pré-teste de MT3:

Os grupos que receberam as doses (0,5, 1,0 e 2,0  $\mu\text{g/lado}$ ) de MT3 (antagonista M4 seletivo) (figura 9) pré-teste intra-hipocampal e o respectivo grupo controle não apresentaram diferença estatisticamente significativa no desempenho no treino,  $P=0,229$ , possibilitando a comparação entre os grupos. Porém, houve diferença entre os ratos que receberam veículo e, pelo menos, em um dos grupos que receberam MT3 no desempenho do teste,  $P=0,011$  (teste de Kruskal-Wallis). O teste “post hoc” de Dunn indicou que apenas o grupo infundido com a dose de 2,0  $\mu\text{g}$  por lado teve um desempenho diferente do grupo controle ( $P<0,05$ ), demonstrando o efeito facilitatório dessa dose de droga. O desempenho no teste dos grupos que receberam alguma dose do fármaco e do grupo veículo foi significativamente melhor do que o desempenho no treino,  $P<0,05$  (teste de Willcoxon), confirmando a retenção da tarefa em ambos os grupos.

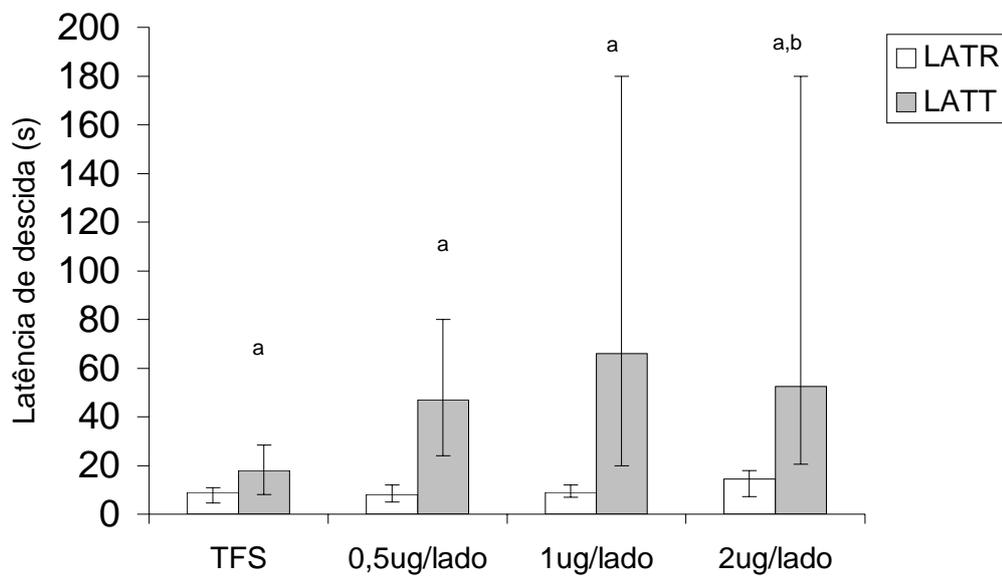


Figura 9 - MT3 pré-teste:(a) diferença significativa em relação ao treino (N= 21, 15, 11 e 16, respectivamente); (b) diferença significativa em relação ao teste do grupo controle (P=0.011, teste de Kruskal-Wallis).

#### 4.1.5 - Administração intra-hipocampal pré-teste de MT2:

Os grupos que receberam as doses (0,75, 1,0 e 6,0  $\mu\text{g/lado}$ ) de MT2 (agonista seletivo M1 e antagonista M4) (figura 10) pré-teste intra-hipocampal e o respectivo grupo controle não apresentaram diferença estatisticamente significativa no desempenho no treino,  $P=0,739$ , possibilitando a comparação entre os grupos. Porém, houve diferença entre os ratos que receberam veículo e, pelo menos, em um dos grupos que receberam MT2 no desempenho do teste,  $P=0,018$  (teste de Kruskal-Wallis). O teste “post hoc” de Dunn indicou que apenas o grupo infundido com a dose de 0,75  $\mu\text{g}$  por lado teve um desempenho diferente do grupo controle ( $P<0,05$ ), demonstrando o efeito facilitatório dessa dose de droga. O desempenho no teste dos grupos que receberam alguma dose do fármaco e do grupo veículo foi significativamente melhor do que o desempenho no treino,  $P<0,05$  (teste de Willcoxon), confirmando a retenção da tarefa em ambos os grupos.

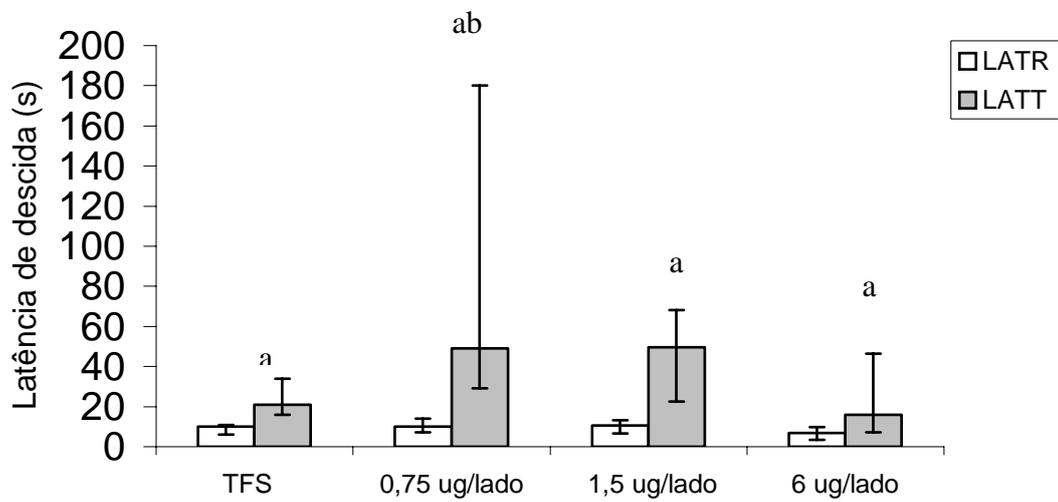


Figura 10 - MT2 pré-teste:(a) diferença significativa em relação ao treino (N= 11, 12, 10 e 4, respectivamente);(b) diferença significativa em relação ao teste do grupo controle (P=0.018, teste de Kruskal-Wallis).

## 4.2 - Resultados referentes aos experimentos de Habituação ao Campo Aberto:

### 4.2.1 - Administração intra-hipocampal pré-teste de Escopolamina (figura 11):

Os animais infundidos com escopolamina na respectiva dose efetiva no experimento de Esquiva Inibitória (2,0 µg/lado) comparados com o controle não mostraram diferença significativa no número de cruzamentos e respostas de orientação entre as sessões de treino e teste (P>0,05, teste t de Student). Ambas as variáveis (cruzamentos/respostas de orientação) foram significativamente menores no teste que no treino para os ratos tratados pré-teste com escopolamina (P=0,000 / 0,002) e o respectivo grupo controle (P=0,001 / 0,001). Demonstrando a retenção da tarefa em ambos os grupos.

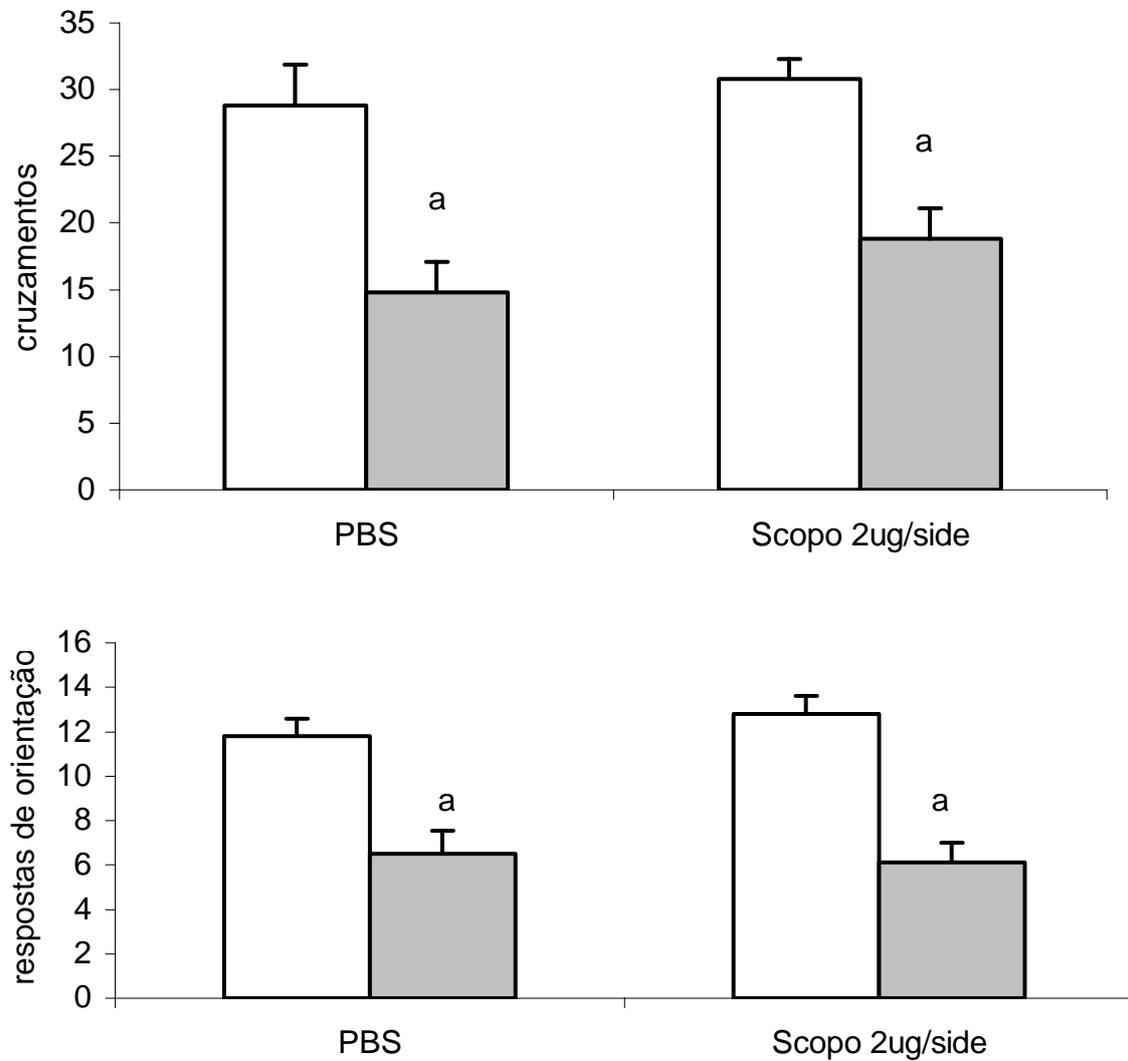


Figura 11 - Escopolamina pré-reste de Habituação ao Campo Aberto (N=10 e 11, respectivamente): (a) diferença significativa em relação ao treino.

#### 4.2.2 - Administração intra-hipocampal pré-teste de MT3 (figura12):

Os animais infundidos com MT3 na respectiva dose efetiva no experimento de Esquiva Inibitória (2,0 µg/lado) comparados com o controle não mostraram diferença significativa no número de cruzamentos e respostas de orientação entre as sessões de treino e teste ( $P > 0,05$ , teste t de Student). Ambas as variáveis (cruzamentos/respostas de orientação) foram significativamente menores no teste que no treino para os ratos tratados pré-teste com MT3 ( $P = 0,002 / 0,014$ ) e o respectivo grupo controle ( $P = 0,025 / 0,027$ ). Demonstrando a retenção da tarefa em ambos os grupos.

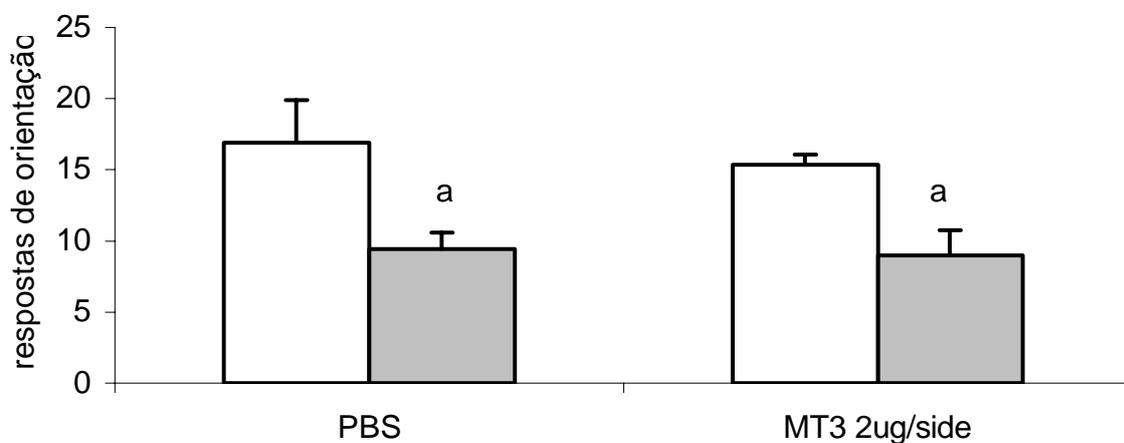
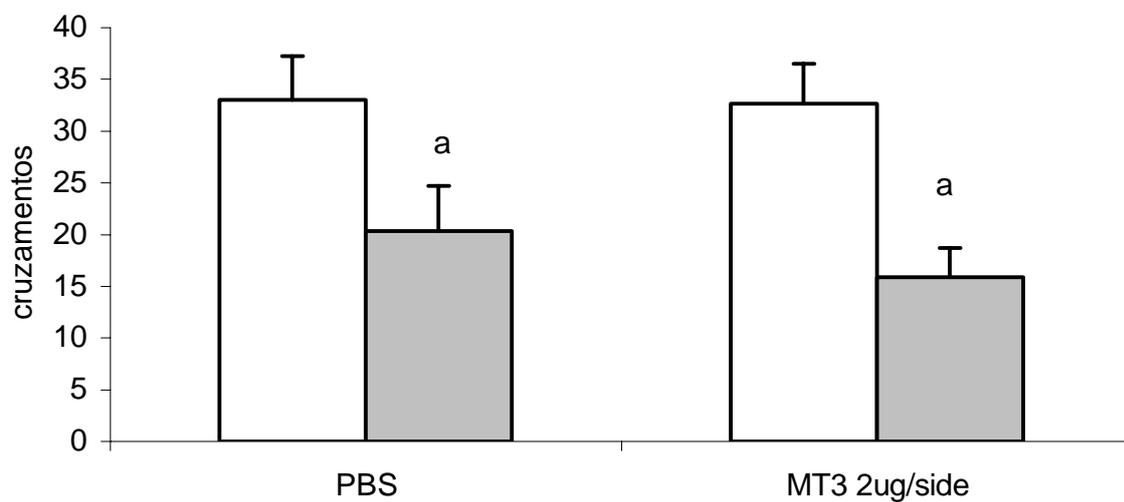


Figura 12 - MT3 pré-reste de Habituação ao Campo Aberto (N=10 e 12, respectivamente): (a) diferença significativa em relação ao treino.

## 5.0 – Discussão

Nossos resultados mostram que o bloqueio inespecífico de receptores colinérgicos muscarínicos através da infusão de escopolamina e pirenzepina na região hipocampal dorsal produz um efeito facilitatório na evocação de uma memória com um forte componente aversivo como a Esquiva Inibitória. Adicionalmente, verificamos que a atividade de um agonista menos seletivo como a oxotremorina apresenta um efeito amnésico pouco robusto, porém consistente com os resultados encontrados com os antagonistas muscarínicos. De uma forma geral, podemos inferir que as aferências colinérgicas que modulam a atividade de CA3 e CA1 apresentam uma propriedade inibitória na evocação da memória.

Por outro lado, as Toxinas Muscarínicas, especialmente as utilizadas nesse trabalho, constituem ferramentas farmacológicas importantes, uma vez que são capazes de bloquear ou ativar receptores colinérgicos muscarínicos específicos. Assim como a escopolamina, a MT3 (dose de 2,0 µg/lado), antagonista seletivo para o receptor M4, teve um efeito facilitatório sobre a evocação da esquiva inibitória.

A MT2, agonista seletivo para o receptor M1, também apresentou um efeito facilitatório no processo de evocação. Esse achado está de acordo com resultados anteriores, que demonstraram esse mesmo efeito em experimentos com infusão pós-treino. O receptor colinérgico muscarínico M1 tem uma atividade metabotrópica “excitatória”, que ativa cascatas enzimáticas. Por isso, é plausível supor que o receptor M1 modula positivamente tanto os processos de consolidação como de evocação. É interessante, ainda, observar que o efeito facilitatório da MT2 se restringe à dose mais baixa (0,75 µg/lado), que também foi observado nos tratamentos pós-treino anteriores, o que reforça nossa conclusão, pois essa dose é a mais seletiva para o receptor M1.

Nossos resultados mostram que a MT3 e a escopolamina causam um efeito facilitatório na evocação da tarefa de esquiva inibitória quando administrada 20 minutos antes do teste. Entretanto, nenhum efeito foi encontrado na tarefa menos aversiva da habituação ao campo aberto; o número inalterado de cruzamentos com as doses efetivas no experimento de esquiva inibitória, porém, dá suporte à idéia de que o efeito de ambas as drogas na esquiva inibitória é basicamente cognitiva, e não motora ou exploratória.

O sistema colinérgico muscarínico é essencialmente modulatório, o que evidencia sua ação sobre várias funções corporais, entre elas a função cognitiva (Kandel et al, 2000). Nessa função a modulação colinérgica pode ser expressa por vias colinérgicas extrínsecas que agem sobre os neurônios glutamatérgicos e gabaérgicos em estruturas importantes para o aprendizado e a memória, como a formação hipocampal e o neocórtex (Segal & Auebach, 1997). Pode ser expressa, também, em vias intrínsecas de interneurônios colinérgicos no sistema límbico; outra possibilidade é a da expressão de heterorreceptores muscarínicos em sistemas “efetores”, o que parece ser muito importante para o aprendizado e memória; parece ser o caso dos receptores M2 e M4, que são pré-sinápticos em neurônios glutamatérgicos na via perforante medial, uma via de entrada ao hipocampo (Rouse et al, 1999; Van der Zee & Luyten, 1999). Esses receptores apresentam uma função inibitória pois estão normalmente acoplados à proteína Gi/Go, conhecida por inibir a adenilil ciclase, o que diminui a produção do AMPc. A atividade modulatória inibitória desses receptores no terminal pré-sináptico pode se dar através da ativação de canais de  $K^+$ , que promovem a hiperpolarização da célula, não permitindo, assim, a abertura de canais de  $Ca^{++}$  dependentes de voltagem, que levam à liberação de neurotransmissores como o GABA ou o glutamato (Taylor & Brown, 1999).

Resultados anteriores demonstraram que a administração intra-hipocampal pós-treino da esquivia inibitória, da MT1 em doses 0,30 e 2,00  $\mu$ g/lado, somente apresentou efeito sobre a retenção da memória na dose mais baixa. Como a MT1 se liga aos receptores M1 e M4, mas tem maior afinidade pelo M1, em uma baixa concentração o efeito facilitatório possivelmente se deve a que se liga principalmente ao M1, um receptor excitatório; a inefetividade da dose maior poderia ser atribuída ao recrutamento concomitante do M1 e do M4, um receptor inibitório (Jerusalinky et al., 1995; Kornisiuk et al., 1995; Harvey et al., 1998).

A administração intra-hipocampal pré-teste de escopolamina, um antagonista colinérgico muscarínico pouco seletivo entre todos os receptores; de pirenzepina, um antagonista m1/m4 pouco seletivo entre eles; e de MT3, o antagonista colinérgico muscarínico muito seletivo para os receptores do tipo M4, na tarefa de esquivia inibitória, causou um efeito facilitatório sobre a evocação desta tarefa. Esses resultados, porém, são contrários àqueles encontrados com a administração imediatamente após o treino, quando produziam um efeito amnésico (Ferreira et al, 2003; Jerusalinsky et al, 1998). Isso sugere que o sistema colinérgico muscarínico e, especialmente, o receptor

M4 teria papéis opostos nos processos de consolidação e de evocação de memórias aversivas.

O efeito amnésico dos antagonistas colinérgicos muscarínicos menos seletivos (escopolamina e pirenzepina) sobre o processo de consolidação da memória pode dever-se principalmente a sua ação inibitória sobre os receptores muscarínicos m1 excitatórios pós-sinápticos (Ferreira, 2003). Porém, a atividade da MT3 durante a consolidação pode ser interpretada como ocorrendo em interneurônios GABAérgicos do hipocampo, onde a toxina inibiria a atividade do receptor M4, que, por sua vez, modularia negativamente a liberação do neurotransmissor inibitório GABA. Isto produziria, então, o efeito amnésico (Jerusalinsky et al., 1995; Ferreira et al., 2003; Lanziotti et al, 2006 – submetido). Já durante o processo de evocação, os antagonistas muscarínicos e, especialmente, a MT3 atuariam diretamente no terminal axonal de um neurônio excitatório (glutamatérgico), antagonizando o receptor M4 que teria, ali, o papel de controlar a liberação de glutamato na fenda sináptica. Estes diferentes papéis também poderiam estar acontecendo em diferentes sub-regiões do hipocampo (CA1, CA3 e giro denteado, por exemplo), mas nosso tratamento não discrimina espacialmente entre elas.

Indiretamente, portanto, a MT3 deve estar atuando na disponibilidade dos neurotransmissores nos dois processos. A formação da memória, porém, envolve fenômenos plásticos, como o aumento da produção e liberação do neurotransmissor glutamato (Dudai, 2002; Izquierdo, 2002). É possível que o tratamento pré-teste com MT3, além da escopolamina e pirenzepina, atue sobre terminais neuronais que já passaram pelo processo da consolidação da memória, e que, portanto, tem suas sinapses modificadas para liberar grande quantidade de glutamato na fenda e que também passariam a expressar novos receptores M4, explicando, assim, o efeito facilitatório sobre a evocação, que não era detectável com o mesmo tratamento na situação de pós-treino, quando a liberação do glutamato ainda não estava modificada. Essa hipótese será testada em futuros experimentos com a infusão intra-hipocampal concomitante de fármacos antagonistas glutamatérgicos e de MT3, a fim de verificarmos a interação entre estes dois sistemas de neurotransmissores (ver figura 13).

Uma outra possibilidade é de que os receptores M4 aparecem expressos como autorreceptores pré-sinápticos das vias colinérgicas no hipocampo controlando, ali, a liberação de acetilcolina que modula os neurônios glutamatérgicos e GABAérgicos (Rouse et al, 1999; Van der Zee & Luyten, 1999). Nossos resultados conjuntamente com trabalhos anteriores demonstraram uma facilitação da memória com a infusão

intra-hipocampal de agonistas M1-seletivos (MT1 e MT2). Isso se deve, como já mencionado anteriormente, uma vez que o receptor M1 é expresso em neurônios glutamatérgicos e apresenta uma ação excitatória. É possível que após o processo de consolidação, onde fenômenos plásticos modificam os contatos sinápticos, os receptores M4 inibitórios passariam a ser expressos como autorreceptores de vias colinérgicas que agem sobre os receptores M1, atuando como um “freio” da excitabilidade modulada por esse receptor. O que não ocorria antes da consolidação dessa nova experiência, pois a MT3 apresenta um efeito amnésio quando administrada logo após o treino (ver figura 13).

Além disso, comparando os resultados obtidos com a infusão da escopolamina, antagonista menos seletivo, e da pirenzepina, antagonista m1/m4, com a MT3, seletiva pelo receptor M4, permite-nos sugerir que esse receptor é especificamente importante para a evocação.

Hasselmo e Bower (1992) criaram a hipótese de que a supressão de fibras intrínsecas de acetilcolina poderia produzir melhora da memória por impedir a ativação de neurônios que não estão recebendo estímulo em suas aferências, enquanto, simultaneamente, isto permitiria o aumento do crescimento de sinapses que recebendo o estímulo. Então, a supressão colinérgica facilitaria o aprendizado, ao passo que o decréscimo desta supressão poderia facilitar a evocação de memórias armazenadas (Aigner, 1995).

Por outro lado, a infusão de MT2, fármaco agonista seletivo para o receptor M1, apresentou, também, um efeito facilitatório sobre a evocação da tarefa de esQUIVA inibitória. Isso demonstra que os receptores excitatórios M1 modulam positivamente tanto o processo de consolidação (Ferreira et al., 2003) como o processo de evocação, mas provavelmente com uma atividade menos robusta na evocação que o receptor M4, pois os antagonistas menos seletivos entre esses dois receptores tiveram o mesmo efeito que a MT3, seletiva para M4.

Comparado com a crescente literatura acerca dos eventos moleculares subjacentes ao processo de consolidação (McGaugh, 2000), é restrito, ainda, o conhecimento sobre os processos relacionados com a evocação da memória (Szapiro et al., 2002). Existem poucos estudos com tratamentos intra-hipocampais pré-teste, e somente um trabalho contrasta com o nosso: Barros e col. (2001) reporta um efeito amnésico da escopolamina (doses 0,4 e 2,0 µg/lado) sobre a evocação da esQUIVA inibitória. Nesse trabalho, entretanto, eles infundiram o fármaco 10 minutos antes da

sessão de teste; em nossos experimentos verificamos que esse período mais curto de infusão provou ser muito estressante para os animais, atrapalhando a retenção da memória, por isso nós somente infundimos 20 minutos antes do teste. Essa diferença no período de infusão, talvez seja o principal motivo das diferenças encontradas nos dois trabalhos.

Tanto a MT3 como a escopolamina (inclusive nas mesmas doses) não causaram qualquer efeito evidente sobre a evocação do experimento de Habituação ao Campo Aberto, diferentemente do que foi encontrado com a Esquiva Inibitória. Essa ausência de efeito também foi constatada nos trabalhos anteriores com tratamentos pós-treino (Ferreira et al., 2003). Em conjunto, estes resultados sugerem que o sistema colinérgico muscarínico seja recrutado mais para experiências com algum aspecto aversivo. Esta hipótese necessita maiores investigações, porém esta resposta dependente do estímulo foi observada até mesmo com outros sistemas neuromodulatórios, como o dos receptores CB1 canabinóides (Alvares et al., 2005).

Analisando nossos resultados com fármacos colinérgicos, vemos que apesar do compartilhamento parcial de certos processos, os mecanismos moleculares da evocação são diferentes dos da consolidação. Assim como foi observado que a evocação da memória não era dependente do receptor glutamatérgico NMDA nem da atividade enzimática CAMKII, que são essenciais para a consolidação (Szapiro et al., 2002); o sistema modulatório colinérgico muscarínico apresenta peculiaridades. Os receptores M4, após os mecanismos de plasticidade sináptica terem ocorrido, parecem mudar de localização nas vias neuronais do hipocampo dorsal e, conseqüentemente, de função na evocação da memória. As razões disso podem dever-se a características anátomo-funcionais (qual tipo de neurônio em que o receptor M4 é expresso) e citoarquitetônicas (pós ou pré-sinápticos), ou mesmo, diferentes cascatas bioquímicas envolvidas durante a consolidação e a evocação.

Os trabalhos anteriores, juntamente com este, permitem concluir que a consolidação e a evocação da memória é fortemente modulada pelos receptores colinérgicos muscarínicos M1 e M4. Porém, esses dois receptores apresentam localizações e funções metabotrópicas diferentes e opostas. O receptor colinérgico M1 é um promotor de plasticidade sináptica, portanto a sua atividade nos processos iniciais da consolidação parece ser essencial para a formação do traço de memória.

Já o receptor colinérgico inibitório M4, apresenta papéis opostos na modulação dos processos de consolidação e de evocação. Esse receptor parece ser um

“personagem” plástico da formação da memória: após a consolidação de um traço em uma determinada via neuronal na região hipocampal dorsal, a reserva de receptores M4 parece mudar de localização na via. A atividade inibitória desse receptor, após a ocorrência dos fenômenos plásticos do processo de consolidação, deve estar relacionada com a proteção da memória consolidada nessa via. O receptor M4, nessa situação, parece inibir que uma nova consolidação ocorra e interfira com memória armazenada.

Como já é sabido que o armazenamento de uma memória no hipocampo é temporário, seria interessante, então, verificar quanto tempo duraria o efeito facilitatório da MT3, ou seja a suposta mudança de posição dos receptores M4, no hipocampo. Assim como, verificar se essa alteração plástica ocorreria em outras regiões dos córtices, onde o traço de memória fica efetivamente armazenado.

Em resumo:

- A infusão intra-hipocampal pré-teste dos antagonistas colinérgicos muscarínicos menos seletivos, escopolamina e pirenzepina, na esquia inibitória teve um efeito facilitatório sobre a evocação da memória aversiva da tarefa. Demonstrando, de forma geral, uma função inibitória do sistema colinérgico muscarínico nesse processo.
- A infusão intra-hipocampal pré-teste de MT3, antagonista seletivo para o receptor M4, na esquia inibitória também teve um efeito facilitatório. Demonstrando uma atividade específica do receptor M4 na evocação da memória da tarefa.
- A infusão intra-hipocampal pré-teste de MT2, agonista seletivo para o receptor M1, na esquia inibitória também teve um efeito facilitatório. Demonstrando que esse receptor segue modulando positivamente a evocação da tarefa, porém com uma atividade menos robusta que o receptor M4.
- A ausência de efeito da MT3 e da escopolamina, na evocação da tarefa de habituação ao campo aberto, em doses efetivas na esquia inibitória, demonstrou a dependência de aversividade para a modulação da memória pelo sistema colinérgico muscarínico.

- Os resultados encontrados com a infusão pré-teste dos antagonistas colinérgicos muscarínicos escopolamina, pirenzepina e MT3 são contrários aos experimentos anteriores com infusão pós-treino desses mesmos fármacos. Isso demonstra uma atividade da modulação colinérgica muscarínica oposta sobre os processos de consolidação e de evocação da memória da esQUIVA inibitória.
- Nossos resultados apontam, enfim, para uma plasticidade exclusiva do receptor M4, que explica as peculiaridades modulatórias opostas entre os processos de consolidação e evocação.

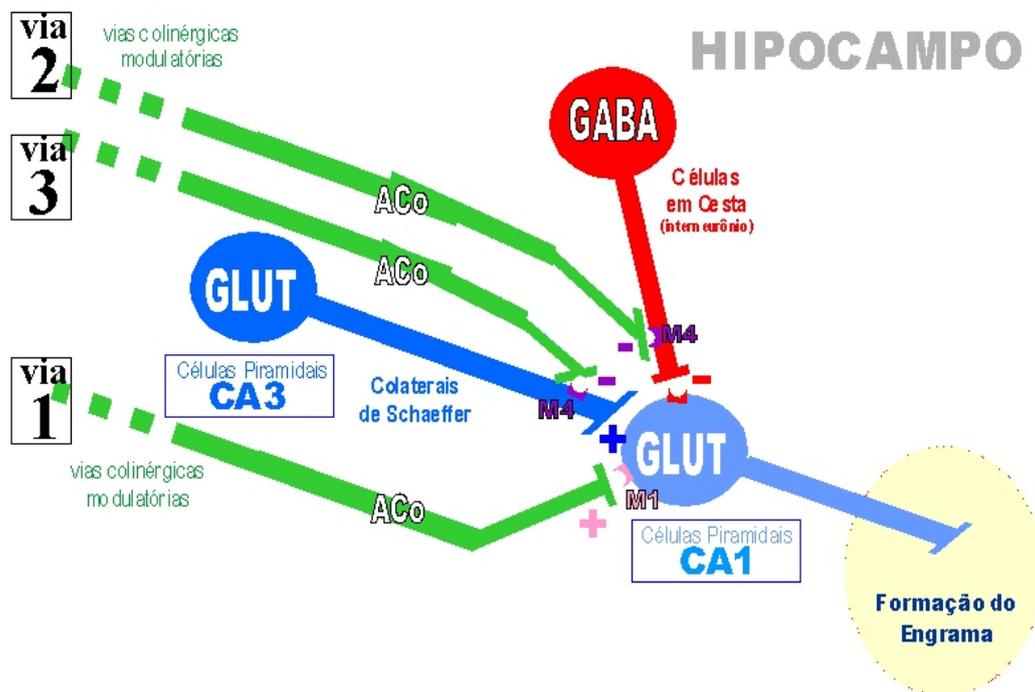


Figura 13 - Proposta da circuitaria de modulação colinérgica muscarínica na região hipocampal dorsal sugerida a partir da interpretação dos resultados obtidos com a infusão de fármacos no hipocampo pós-treino e pré-teste de Esquiva Inibitória:

- Via 1 representa o efeito facilitatório da MT2, tanto pós-treino como pré-teste. Além disso, pode explicar o efeito facilitatório da MT3 pré-teste agindo sobre autorreceptores M4, que passariam a ser expressos nessa via após os fenômenos de plasticidade sináptica.
- Via 2 representa o efeito amnésico da MT3 pós-treino agindo sobre heterorreceptores M4 expressos num terminal axonal de um neurônio GABAérgico. A MT3, então, inibe a inibição do receptor M4 sobre um neurônio GABAérgico inibitório.
- Via 3 também pode representar o efeito facilitatório da MT3 pré-teste. Nessa situação, os receptores M4 passariam a ser expressos como heterorreceptores pré-sinápticos num terminal axonal de um neurônio glutamatérgico, após os fenômenos de plasticidade sináptica. A MT3, assim, inibe a inibição do receptor M4 sobre um neurônio excitatório.

## 6.0 - Conclusões:

6.1 - A administração intra-hipocampal pré-teste de Esquiva Inibitória do antagonista colinérgico muscarínico pouco seletivo escopolamina teve um efeito facilitatório sobre a evocação da tarefa somente na dose de 2 µg/lado, demonstrando um papel inibitório desse sistema sobre o processo de evocação da memória.

6.2 - A administração intra-hipocampal pré-teste de Esquiva Inibitória do agonista colinérgico muscarínico pouco seletivo oxotremorina teve um efeito amnésico parcial nas duas doses infundidas, resultado que é consistente com o que foi encontrado com a escopolamina.

6.3 - A administração intra-hipocampal pré-teste de Esquiva Inibitória do antagonista colinérgico muscarínico, seletivo para os receptores M1 e M4, pirenzepina teve um efeito facilitatório sobre a evocação da tarefa na dose de 0,5 µg/lado.

6.4 - A administração intra-hipocampal pré-teste de Esquiva Inibitória da Toxina Musarínica MT3, antagonista colinérgico muscarínico seletivo para o receptor M4, teve um efeito facilitatório sobre a evocação da tarefa somente na dose de 2 µg/lado, demonstrando que a modulação inibitória desse sistema se deve ao receptor M4.

6.5 - A administração intra-hipocampal pré-teste de Esquiva Inibitória da Toxina Musarínica MT2, agonista M1 seletivo e antagonista M4, teve um efeito facilitatório sobre a evocação da tarefa somente na dose de 0,75 µg/lado, que é mais seletiva ao receptor M1. Demonstrado uma modulação positiva desse receptor sobre o processo de evocação da memória.

6.6 - A administração intra-hipocampal pré-teste de Habituação ao Campo Aberto do antagonista colinérgico muscarínico pouco seletivo escopolamina não teve qualquer efeito sobre a evocação da tarefa na dose de 2 µg/lado (efetiva na esquiva inibitória), demonstrando que a modulação do sistema colinérgico muscarínico sobre a evocação é dependente de um estímulo aversivo, como o da esquiva inibitória.

6.7 - A administração intra-hipocampal pré-teste de Habituação ao Campo Aberto da Toxina Musarínica MT3, antagonista colinérgico muscarínico seletivo para o receptor M4, não teve qualquer efeito sobre a evocação da tarefa na dose de 2 µg/lado (efetiva na esquiva inibitória), demonstrando que a modulação do receptor colinérgico muscarínico M4 sobre a evocação é dependente de um estímulo aversivo, como o da esquiva inibitória.

## 7.0 - Bibliografia:

- AIGNER, T.G. (1995). Pharmacology of memory: cholinergic-glutamatergic interactions. *Current Opinion in Neurobiology*, 5, 155-160.
- ALVARES, L.O., OLIVEIRA, L.F., CAMBOIM, C., DIEHL, F., GENRO, B.P., LANZIOTTI, V.M.B., QUILLFELDT, J.A. (2005) Amnesic effect of intrahippocampal AM251, a CB1-selective blocker, in the inhibitory avoidance, but not in the open field habituation task, in rats. *Neurobiology of learning and memory*. 83, 119 -124.
- BARROS, D.M., MELLO, E., SOUZA, T., DE DAVID, T., CHOI, H., AGUZZOLI, A., MADCHE, C., ARDENGHI, P., MEDINA, J.H., IZQUIERDO, I.. (2001). Simultaneous modulation of retrieval by dopaminergic D1, b-noradrenergic, serotonergic1A and cholinergic muscarinic receptors in cortical structures of the rat. *Behavi Brain Res*. 124, 1 - 7.
- BLISS, T.V.P., COLLINGRIDGE, G.L. (1993). A synaptic model of memory: long term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 361, 31-38.
- CHITTAJALLU, R., BRAITHWAITE, S.P., CLARKE, V.R.J. e HENLEY, J.M. (1999). Kainate receptors: subunits, synaptic localization and function. *TiPS*, 20, 26-35.
- COOPER, E.C., LOWENSTEIN, D.H. (2001). Hippocampus. In: *Encyclopedia of life sciences*, London: Nature Publishing Group.
- DIEHL, F. (2003). Evocação de memórias aversivas em ratos: comparação entre efeitos de antagonistas glutamatérgicos e colinérgicos muscarínicos. UFRGS, Porto Alegre, Trabalho de Conclusão do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas – Departamento de Biofísica. Instituto de Biociências / Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

- DINGLELINE, R., MCBAIN, C.J. (1999). Excitatory amino acid transmitters. in: *Basic Neurochemistry, molecular, cellular and medical aspects*. 6<sup>th</sup> ed., G.J. SIEGEL, B.W. AGRANOFF, R.W. ALBERTS, S.K. FISHER, M.D.UHLER. New York. Raven Press, pp 367-387.
- DUDAI, Y. (2004). The neurobiology of consolidation, or, how stable is the engram? *Annu. Rev. Psychol.* 55, 51-86.
- FERREIRA, A.R. (2001). Efeitos da modulação muscarínica hipocampal na memória de ratas em diferentes tarefas comportamentais. UFRGS, Porto Alegre, Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências. Instituto de Ciências Básicas da Saúde / Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- FERREIRA, AR., OLIVEIRA, L.F., BLANCO, C., KORNISIUK, E., SANCHEZ, G., DAROIT, D., SILVA, M.C., CERVENANSKY, C., JERUSALINSKY, D., QUILFELDT, J.A. (2003). Role of hippocampal m1 and m4 muscarinic receptor subtypes in memory consolidation in the rat. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 74, 411 - 415.
- FUSTER, J.M. (1997). Network Memory. *Trends Neuroscience*. 20, 451-459.
- HARVEY, A.L., BRADLEY, K.N., COCHRAN, S.A., ROWAN, E.G., PRATT, J.A., QUILFELDT, J.A., JERUSALINSKY, D.A. (1998). What can toxins tell us for drug discovery? *Toxicon*. 36, 1635-1640.
- HEBB, D.O. (1949). The organization of behavior – A neurophysiological theory. New York. *John Wiley & Sons, Inc*, 60-79.
- INTROINI-COLLISON, I., DALMAZ, C., McGAUGH, J.L. (1996). Amygdala  $\beta$ -noradrenergic influences on memory storage involve cholinergic activation. *Neurobiology of Learning and Memory*. 65, 57-64.

- IZQUIERDO, I., BIANCHIN, M., SILVA, M. B., ZANATTA, M.S., WALS, R., RUSCHEL, A.C., da SILVA, R.C., PACZKO, MEDINA, J.H. (1993). CNQX infused into rat hippocampus or amygdala disrupts the expression of memory of two different tasks. *Behavioral and Neural Biology*. 59,1-4.
- IZQUIERDO, I. (1989). Different forms of posttraining memory processing. *Behavioral and Neural Biology*. 51, 171-202.
- IZQUIERDO, I., BARROS, D.M., MELLO e SOUZA, T., de SOUZA, M.M., IZQUIERDO, L.A., MEDINA, J.H. (1998). Mechanisms for memory types differ. *Nature*. 393, 635-636.
- IZQUIERDO, I., MEDINA, J.H. (1997). Memory formation, the sequences of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in brain structures. *Neurobiology of Learning and Memory*. 68, 285-346.
- IZQUIERDO, I., QUILLFELDT, J.A., ZANATTA, M.S., QUEVEDO, J., SCHAFFER, E., SCHIMITZ, P.K., MEDINA, J.H. (1997). Sequential role of hippocampus and amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval memory for inhibitory avoidance in rats. *European journal of neuroscience*. 9, 796-793.
- IZQUIERDO, I. e McGAUGH, J.L. (2000). Behavioral pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. *Behavioral Pharmacology*. 11, 517-534.
- IZQUIERDO, I. (2002). *Memória*. Editora Artmad. Porto Alegre. 95 p.
- JERUSALINKY, D. e HARVEY, A.L. (1994). Toxins from mamba venoms: small proteins with selectives for different subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. *TiPS*. 15, 424-430.

- JERUSALINSKY, D., KORNISIUK, E., BERNABEU, R., IZQUIERDO, I., CERVEÑANSKY, C. (1995). Muscarinic toxins from the venom of *Dendroaspis* snakes with agonist-like actinos. *Toxicon*. 33 (4), 389-397.
- JERUSALINKY, D., KORNISIUK, E., ALFARO, P. QUILLFELDT, J. A., ALONSO, M., VERDE, E. R., CERVEÑANSKY, C., HARVEY, A.L. (1998). Muscarinic toxins selective for M4 receptors impairs memory in the rat. *NeuroReport*. 9, 1407-1411.
- JERUSALINKY, D., KORNISIUK, E., ALFARO, P. QUILLFELDT, J.A., FERREIRA, A., RIAL, V.E., DURAN, R., CERVEÑANSKY, C., (1998). Muscarinic toxins novel pharmacological tools for the muscarinic cholinergic system. *Toxycon*. 38, 747-761.
- KANDEL, E.R., SCHUARTZ, J.H., JESSELL, T.M. (2000). *Principles of Neural Science*. 4<sup>th</sup> edition. New York, McGraw-Hill, 1414 p.
- KIMURA, F., BAUGHMAN, R.W. (1997). Distinct muscarinic receptor subtypes suppress excitatory and inhibitory synaptic responses in cortical neurons. *Journal of Neurophysiology*. 77 (2), 709-716.
- KORNISIUK, E., JERUSALINSKY, D., CERVEÑANSKY, C., HARVEY, AL. (1995). Binding of muscarinic toxins MTx1 and MTx2 from the venom of the green mamba *Dendroaspis angusticeps* to cloned human muscarinic cholinceptors. *Toxicon*, 1995; 33:11 - 8. Corrigendum: *Toxicon*. 33(8), 1111.
- LAMBERTY, Y., GOWER, A.J. (1991). Cholinergic modulation of spatial learning in mice in a Morris-type water maze. *Archives internationales de pharmacodynamie et de Thérapie*. Vol 309, n° 1 e 2, 5-19.
- LAMPRECHT, R.; LeDOUX, J. (2004). Structural Plasticity and Memory. *Nature Reviews*. 5, 45-54.

- LANZIOTTI, V.B., ALVARES, L.O., HENRIQUES, T.P., DIEHL, F., GENRO, B.P., FÜRSTENAU, L.O., CAMBOIM, C., CERVENĀNSY, C., JERUSALINSKY, D., QUILLFELDT, J.A. (2006). Intrahippocampal bicuculine and baclofen counteract the post-training amnesic effect of MT3, a selective M4 antagonist. Submitted.
- LORENZINI, C.G.A., BALDI, L.E., BUCHERELLI, C., SACCHETTI, B., TASSONI, G. (1999). Neural topography and chronology of memory consolidation: a review of functional inactivation findings. *Neurobiology of Learning and Memory*. 71, 1-18.
- McEWEN, B.S. (1999). Stress and Hippocampal Plasticity. *Annu. Rev. Neurosci.* 22, 105-122.
- McGAUGH, J.L. (1966). Time-dependent processes in memory storage. *Science*. 153, 1351-1358.
- McGAUGH, J.L. (2000). Memory – a century of consolidation. *Science*. 287, 248-251.
- McGAUGH, J.L.; IZQUIERDO, I. (2000). The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. *Trends Pharmacol Sci*. 21(6), 208-210.
- McGAUGH, J.L., ROOSENDAL, B. E AHILL, L. (1999). Modulation of memory storage by stress hormones and the amigdaloid complex. In: Gazzaniga, M.S. (ed). *The New Cognitive Neuroscience*, Cambridge, Bradford, 1081-1098.
- MELLO, S.T., ROHDEN, A., MEINHARDT, M., GONÇALVES, C.A. e QUILLFELDT, J.A. (2000). S100B infusion into the rat hippocampus facilitates memory for the inhibitory avoidance task, but not for the open-field habituation. *Physiology and Behavior*. 71, 29-33.

- OLIANAS, M. C. (1997). Identification of rat brain muscarinic M4 receptors coupled to cyclic AMP using the selective antagonist muscarinic toxin 3. *European Journal of Pharmacology*. 357, 235-242.
- PAXINOS, G. & WATSON, C. (1997). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 3<sup>rd</sup> ed., Academic Press, San Diego, USA.
- PITKANEN, A., SAVANDER, V., LeDOUX, J.E. (1997). Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *TINS*. 20(11), 517-523.
- QUILLFELDT, J.A., SCHIMITZ, P.K., WALSH, R., BIANCHINI, M., ZANATTA, M.S., MEDINA, J.H. e IZQUIERDO, I. (1994). CNQX infused into entorhinal cortex blocks memory expression, and AMPA reverses the effect. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 48, 437-440.
- QUILLFELDT, J.A. (1994). O papel dos receptores glutamatérgicos do tipo AMPA na expressão da memória no córtex entorrinal e estruturas relacionadas. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia. Instituto de Biociências / Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.
- QUILLFELDT, J.A., ZANATTA, M.S., SCHIMITZ, P.K., QUEVEDO, J., SCHAFFER, E., de LIMA, J.B., MEDINA, J.H. e IZQUIERDO, I. (1996). Different brain areas are involved in memory expression at different times from training. *Neurobiology of Learning and Memory*. 66, 97-101.
- ROUSE, S.T., MARINO, M.J., POTTER, L.T., CONN, P.J., LEVEY, A.I. (1999). Muscarinic receptor subtypes involved in hippocampal circuits. *Life Sciences*. 64, 501-509.
- SCOVILLE, W.B., MILNER, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesion. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 20, 141-154.

- SEGAL, M. & AUERBACH, J.M. (1997). Muscarinic receptor involved in hippocampal plasticity. *Life Sciences*. 60, 1085-1091
- SELBIE, L.A. & HILL, S. (1998). G protein-coupled-receptor cross-talk: the fine-tuning of multiple receptor-signaling pathways. *TiPS*. 19, 87-93.
- SETLOW, B., ROOZENDAAL, B., McGAUGH, J.L. (2000). Involvement of a basolateral amygdala complex-nucleus accumbens pathway in a glucocorticoid-induced modulation of memory consolidation. *Eur. J. Neurosci*. 12, 367-375.
- SINGH, M.M. (1985). Cholinergic mechanisms, adaptive brain processes and psychopathology. In : Central cholinergic mechanisms and adaptive dysfunctions. M.M. SINGH, D.M. WARBURTON, H. LAL. New York, *Plenum*, 353-397.
- SQUIRE, L.R. (1992). Memory and hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychological Review*. 99, 195-231.
- STEVENS, C.F. (1998). A million dollar question: Does LTP = Memory? *Neuron*. 20, 1-2.
- SZAPIRO, G., GALANTE, J.M., BARROS, D.M., STEIN, M., VIANNA, M.R.M., IZQUIERDO, L.A., IZQUIERDO, I., MEDINA, J.H. (2002) Molecular mechanisms of memory retrieval. *Neurochemical research*. 27, 1491 - 1498.
- TAYLOR, P., BROWN, J.H. (1999). Acetylcholine. in: *Basic Neurochemistry, molecular, cellular and medical aspects*. 6<sup>th</sup> ed., G.J. SIEGEL, B.W. AGRANOFF, R.W. ALBERTS, S.K. FISHER, M.D.UHLER. New York. Raven Press, p 231-260.
- UNGERLEIDER, L.G., DOYON, J., KARNI, A. (2002). Imaging brain plasticity during motor skill learning. *Neurobiology or Learning and Memory*. 78, 553-564.

VAN DER ZEE, E.A., LUITEN, P.G. (1999). Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: a review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory. *Prog Neurobiol.* 58, 409-471

WINKLER, J., SUHR, S.T., GAGE, F.H., THAL, L.J., FISHER, L.J. (1995). Essential role of neocortical acetylcholine in spatial memory. *Nature.* 375, 484-487

**Facilitatory effect of pretest administration of MT3 in the inhibitory Avoidance task suggests M4 receptor plasticity at the hippocampus**

Felipe Diehl <sup>1,2</sup>, Lucas Fürstenau de Oliveira <sup>1,2</sup>, Gonzalo Sánchez <sup>3</sup>, Clarissa Camboim <sup>1,2</sup>, Lucas de Oliveira Alvares <sup>1,2</sup>, Vanusa Bispo Lanzotti <sup>1,2</sup>, Carlos Cerveñansky <sup>4</sup>, Edgar Kornisiuk <sup>3</sup>, Diana Jerusalinky <sup>3</sup>, Jorge Alberto Quillfeldt <sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> *Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação, Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-Porto Alegre, RS, Brazil.*

<sup>2</sup> *Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-Porto Alegre, RS, Brazil.*

<sup>3</sup> *Instituto de Biología Celular & Neurociencias "Prof. Eduardo De Robertis", Facultad de Medicina - Universidad de Buenos Aires, Paraguay 2155 - 2<sup>do</sup> piso - (1121) Buenos Aires, Argentina.*

<sup>4</sup> *Unidad de Bioquímica Analítica, Instituto de Investigaciones Biológicas "Clemente Estable"/Facultad de Ciencias, Montevideo, Uruguay.*

Correspondence should be addressed to Dr. Jorge A. Quillfeldt, at Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação, Departamento de Biofísica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43422, room 208A, CEP 91.501-970 - Porto Alegre, RS, Brazil. FAX # +55-51-3316-7003. E-Mail: [quillfe@ufrgs.br](mailto:quillfe@ufrgs.br).

---

<u>Total # Pages:</u>	21 pages
<u># Figures:</u>	3 figures
<u># Tables:</u>	zero
<u>Suppl. Material:</u>	zero

## **Abstract**

The cholinergic system plays a crucial role in learning and memory. Modulatory mechanisms of this system in the acquisition and consolidation processes have been extensively studied, but their participation in the memory retrieval process is still poorly understood. Conventional pharmacological agents are not highly selective for particular muscarinic acetylcholine receptor subtypes. From the venom of the mamba snake were extracted muscarinic toxins (MTs) that are highly specific for muscarinic receptors, like the toxin MT3 (selective for the m4 subtype receptor). These toxins are useful tool in studies of the specific functions of the M4 subsystem. The M4 receptor selective antagonist MT3, given into the dorsal hippocampus before the test, have enhanced the memory retrieval of the Inhibitory Avoidance (IA) task in rats. MT3 had no effect in the habituation to a new environment task, including basic motor parameters, meaning that the IA effect is purely cognitive. Our results suggest an endogenous negative modulation of the cholinergic muscarinic system upon the retrieval of previously consolidated aversive memories, hereby shown by the facilitatory effect of MT3. This result contrasts with previous findings of an opposite effect of the same antagonist during consolidation (when infused right after training), and the hypothesis to explain it is that the hippocampal circuit affected by the toxin have suffered some plastic change, possibly expressing an new pool of M4 receptors that modulates the excitatory projection (Schaeffer's collaterals) to the "output", CA1 pyramidal cells.

*Theme:* I – Neural Basis of behavior

*Topic:* Learning and Memory: Pharmacology

*Key words:* Memory retrieval, cholinergic muscarinic system, MT3, inhibitory avoidance task, hippocampus, rat.

## **1. Introduction**

The cholinergic system plays a crucial role in learning and memory. Lesions of cholinergic nuclei, pharmacological manipulation of cholinergic receptors and enzymes, intracerebral transplantation of genetically modified cells that produce acetylcholine, and anatomical changes in cholinergic pathways during ageing have all been correlated with altered cognition mechanisms [2; 30; 32].

Muscarinic ACh receptor (MACHR), members of the seven-transmembrane protein receptors family coupled to G-proteins, are expressed widespread throughout the body, and are involved in many fundamental physiological processes in the central nervous system such as learning and memory [7; 15]. Five subtypes of MACHR are expressed in the mammalian brain (M1 – M5) and their coding genes have been cloned [10]. Upon agonist binding, subtypes M1, M3 and M5 preferentially interact with G<sub>q</sub> protein family, thus stimulating inositol phosphate synthesis, while subtypes M2 and M4 are usually coupled to adenylyl cyclase through G<sub>i</sub> proteins, therefore inhibiting cAMP production [6; 25].

There are differences in the concentration of the receptor subtypes in different brain regions and more than one subtype is often expressed in the same cell [13]. The hippocampal formation of the rat was early suggested to have a high proportion of M1 and M4 receptors [7; 13; 16; 18; 21]. The hippocampus is the target of cholinergic fibers from the medial septum, an input known to be important for modulation, both at the cellular and at the network levels, including the theta rhythm [8]. The septo-hippocampal cholinergic pathway also appears to be essential for memory formation and the cholinergic receptors activation may be involved with this and other kinds of synaptic plasticity [3; 8].

The study of the MACHRs localization, quantification and function has faced difficulties due to the lack of selective ligands that exclusively act on one or other receptor subtype. However, muscarinic toxins (MTs) extracted from the venom of *Dendroaspis* snakes, distinguish among some muscarinic receptor subtypes; for example, MT2 has a 4-fold higher affinity for M1 than for M4 receptor (K<sub>i</sub>=360 and 1200 nM, respectively), and rather low or negligible affinity for the other subtypes, while MT3 has 214-fold higher affinity for M4 than for M1 receptor (K<sub>i</sub>=1,2 and 250 nM, respectively). MT2 is a M1 agonist and a M4 antagonist, while MT3 behaves as a selective M4 antagonist [5; 7; 10; 16; 20; 22; 23].

Previous work have shown that the infusion of MT2 into the dorsal hippocampus of rats immediately after training, modified performance in an inhibitory avoidance task. In the lowest dose, MT2 improved performance. On the other hand, pirenzepine, a relatively selective antagonist, was amnesic. These experiments have shown that the M1 receptor has an important positive role in memory consolidation for the inhibitory avoidance task [7]. Moreover, the infusion of the selective M4 receptor antagonist MT3

into the hippocampus has an amnesic effect in the consolidation of this aversive memory [7;14].

The participation of the muscarinic cholinergic system in memory consolidation was extensively studied, but there are few data concerning the function of this system in the memory retrieval processing. Recent studies have shown an enhanced effect on retention performance of a step-down inhibitory avoidance task by intra-hippocampal pre-test infusion of oxotremorine, a non-selective muscarinic agonist, and an amnesic effect of the non-selective muscarinic cholinergic antagonist scopolamine. These results indicate a positive role of the cholinergic muscarinic system on the retrieval process for this task [4]. However, the lack of selectivity of oxotremorine and scopolamine does not allow to answer which muscarinic receptor is involved.

The present work investigated the role of M4 muscarinic cholinergic receptors in memory retrieval by using a pre-test intrahippocampal infusion of MT3. Two behavioral tasks were studied, a step-down inhibitory avoidance (IA) and an open-field habituation (OF). The number of crossings in the test session may also be used as a control for the possible motor and general performance effects of the drug administered before test.

## **2. Material and Methods**

Ninety five (95) male Wistar rats (age 2-3 months, weight 210-300g) from our breeding colony were used in this experiment. Animals were housed in plastic cages, 4-5 to a cage, under a 12h light/dark cycle and at a constant temperature of  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ , with water and food *ad libitum*. All animals were anesthetized by a mixture of Ketamine and Xilazine (i.p., 75 and 10mg/Kg, respectively) and bilaterally implanted with a 27-gauge guide cannulae aimed at AP -4.2mm (from bregma), LL  $\pm 3.0\text{mm}$ , DV 1.5mm, just 1.0mm above area CA1 of the dorsal hippocampus (adjusted from Paxinos & Watson, 1998).

Once recovered from surgery (48h), the animals were submitted to a training session either in the step-down inhibitory avoidance (IA) or the open field habituation (OF) task; 24h later they receive a bilateral intrahippocampal infusion of the drug or its vehicle and, 20min later, were tested for the corresponding task [10]. The IA task was carried out in an automatically operated, brightly illuminated box, in which the left extreme of the grid (42.0 x 25.0cm grid of parallel 0.1cm caliber stainless steel bars spaced 1.0cm apart) was covered by a 7.0cm wide, 5.0cm high formica-covered

platform. Animals were placed on the platform and their latency to step-down placing their four paws on the grid was measured. In the training session, immediately upon stepping down, the animals received a 0.5mA, 3.0s scrambled footshock. In the test session no footshock was given, and a ceiling of 180s was imposed to the step-down latency. The OF was studied using a 50 cm high, 60×40 cm plywood box with a frontal glass wall and a linoleum floor divided in 12 equal rectangles. Animals were left there for 2min both in the training and the test session, and the number of rearings and crossings between sectors were registered each time. The difference between the two sessions in the number of rearings, or of crossings between rectangles, was considered a measure of retention of the habituation to the open field: if the animals had habituated to the field during the first session, they should recognize it as familiar, and, in consequence, the number of rearings and crossings should be smaller in the second session [25]. The number of crossings in the test session may also be used as a control for the possible motor and general performance effects of the drug administered 24h before.

At the time of the pretest infusion, 30-gauge cannulae were fitted into the guide cannulae; the tip of the infusion cannulae protruded 1.0mm beyond that of the guide cannulae and was, therefore, aimed at the pyramidal cell layer of CA1 in the dorsal hippocampus (Fig.1), with the 0.5  $\mu$ l volume being administered at a 20 $\mu$ l/h rate. The animals were divided into groups receiving bilateral infusions of 0.5 $\mu$ l, either of MT3 (0,5, 1,0 and 2,0 mg/side - purified from lyophile by us according to Jerusalinsky e al., 1994 [11]), or of its vehicle (phosphate buffered saline) administered 20 min before the test session (IA); only the dose effective in the IA task of each drug was tested in the OF task. The selected doses cover a range consistent with previous posttraining studies [1; 7].

Statistical analysis of the behavioral data (latencies to step-down in IA and number of rearings and crossings in OF) was limited to the animals with correct cannula placements (Fig. 1) - 83 out of 95 operated, as described in Izquierdo et al. (1992) [10]. Since the step-down latencies have not passed a normality test (Kolmogorov-Smirnov test with Lilliefors' correction), differences among groups were evaluated by a Kruskal-Wallis ANOVA with Dunn's All Pairwise Multiple Comparison *post hoc* test; training vs. test latencies were correspondingly compared by the Wilcoxon Signed Ranks Test. In the OF task, as crossings and rearings were normally distributed, groups were

compared by Student's t test; training vs. test latencies were correspondingly compared by the paired t test.

Experiments with rats were performed in strict accordance to the Brazilian law, to the recommendations of Brazilian Society for Neurosciences, Review Committee of the School of Veterinary / University of Buenos Aires and the International Brain Research Organization (IBRO), and are in compliance with the National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals (publication No. 85-23, revised 1985).

### 3. Results

Figure 2 shows the inhibitory avoidance task result for the MT3 injected groups. As data were not normally distributed (Kolmogorov-Smirnov Normality Test,  $P > 0.200$ ), nonparametric tests were used.

The highest dose of MT3 (2 µg/side) administered at 20 min pretest has enhanced the performance of the animals if compared to the control and the groups which received the smaller doses ( $P < 0.05$ , Dunn's All Pairwise Multiple Comparison *post-hoc* Test, after a Kruskal-Wallis ANOVA with  $P = 0.011$ ); the increase in the performance with the 1 g/side dose was not statistically significant (Fig. 2). Groups were comparable because there were no significant differences among training session latencies ( $P = 0.229$ , Kruskal-Wallis ANOVA); all groups have displayed normal learning, i.e., since each test latency was significantly larger than to the corresponding training one ( $P < 0.005$  for all doses, Wilcoxon Signed Ranks Test).

Figure 3 shows the open-field task results for animals injected with MT3 with the dose that was found to be effective in the inhibitory avoidance task (2.0 g/side): compared to controls, the drug-treated animals have shown no significant differences in the number of rearings or crossings in the training and in the test sessions ( $P > 0.05$ , Student's t test). Both variables (rearings / crossings) were significantly lower in the test than in the training session for the MT3-treated ( $P = 0.002 / 0.014$ ) and the respective control group ( $P = 0.025 / 0.027$ ), evaluated by the Paired t test.

Additionally, the fact that there were no differences in the number of crossings between groups suggests that no locomotor activity or exploratory effects have been caused by any of the pre-test drugs.

#### 4. Discussion

Our results show that MT3 (2 g/side) causes a facilitatory effect in the retrieval of the inhibitory avoidance task when administered 20 min before test (Figure 2). No effect, however, was found in the less aversive, exploratory, open field habituation task (Figure 3); the unaltered number of crossings for the IA-effective dose supports the idea that the IA effect of the drug is basically cognitive, neither motor nor exploratory.

Compared to the ever growing literature about the molecular events subjacent to the consolidation phase of memory formation [12;19], little is known about the molecular requirements of memory retrieval [29]. Most studies point to an essentially diffuse, modulatory role of the cholinergic muscarinic system upon cognitive functions [29]. In brain structures such as the hippocampus and the amygdala, memory modulatory actions may be exerted by extrinsic muscarinic pathways acting upon the “executive” glutamatergic and GABAergic neurons, or by intrinsic projections from cholinergic interneurons, as it seems to be the case in the limbic system (*ibidem*). One possibility, for instance, is the presynaptic expression of muscarinic receptors (as heteroreceptors) in the glutamatergic neurons of the perforant path, an important input projection to the hippocampal formation [12; 27; 28; 31].

M2 and M4 muscarinic receptors can be expressed as heteroreceptors at the presynaptic terminals of inhibitory and excitatory neurons [26; 27], and since they are coupled to a Gi/Go protein that inhibits adenylyl cyclase, their function must be basically inhibitory [17]: this negative modulation is presynaptically mediated by the activation of K<sup>+</sup> channels which - through membrane hyperpolarization - blocks the opening of voltage-dependent calcium channels and, consequently, the neurotransmitter release [12; 30].

The facilitatory effect of MT3 here found is just the opposite of the one previously found in our lab, where this drug was amnesic when injected posttraining in this very same structure and behavioral task [14]. The molecular mechanisms responsible for the memory retrieval of hippocampally-modulated behavioral tasks seem to be basically similar to those involved in memory formation, but there are reports of very relevant differences; for instance, long-term memories seem to be not dependent on NMDA receptors and CaMKII activity [29]. Therefore, the old tenet that retrieval must be a function, or involve similar mechanisms of the consolidation process, might be at least incomplete (*ibidem*).

Based upon the observed effects of MT3, it is clear that M4 receptors play an important role, both in the consolidation [14] and in the retrieval of the IA task memory. The fact that they react in opposite ways in these different circumstances may be more probably attributed to a modification in the circuitry involved in these processes than to any modification of the transduction cascade. Specifically, we hypothesize that M4 receptors may be expressed (or overexpressed), for instance, in the Schaeffer's collaterals input from CA3 to CA1, a probable excitatory modulation of the CA1 glutamatergic engram-registering pathway [18]. Hippocampal M4 heteroreceptors, otherwise, are known to be positioned presynaptically [26; 27; 31], and it is also possible that they are occurring on the inhibitory interneurons. A good explanation to the post-training amnesic effect of MT3 is that in the initial phase of the consolidation process M4 receptors may be more abundant in the GABAergic interneurons (basket cells) that make contact with these CA1 pyramidal cells: MT3 would suppress the endogenously activated M4 "brake" of the GABAergic inhibition of the CA1 glutamatergic neuron, leading to the amnesic effect [12; 14; 18].

After the consolidation and all the plastic events that must have taken place, it is reasonable to suppose a change in M4 availability *right over* the excitatory input to CA1 pyramidal cell – CA3-borne Schaeffer's collaterals - either through activation of expression (they were not present before), or overexpression (they would be there before, only in smaller amounts if compared to the GABAergic presynaptic pool) [12; 31], since memory depends upon plasticity in the glutamatergic transmission, for instance, to increase the neurotransmitter production and release [12; 19]. This effect would not be observed in the recently trained animals (posttraining treatment), because no plasticity would have been taken place yet, and the predominant M4 pool would be, for instance, the (postsynaptic) GABA-positioned one.

Another possibility raises from the fact that M4 receptors are generally shown to be located presynaptically in the hippocampus [26; 31]. Since nothing is said about *when* they are expressed there, it is not absurd to suppose they being expressed as consequence of the experience. We have previously shown a memory facilitation posttraining effect with two muscarinic toxins acting intrahippocampally as selective agonists, MT1 [9; 13] and MT2 [7], and the simplest interpretation to that effect was a glutamatergic neuron bearing M1 receptors as targets to that modulatory cholinergic pathway (already during consolidation) [18]. Since MT3 is amnesic posttraining in the hippocampus [14], we know its M4 target receptors must not be located in the same

pathway, neither post-, nor presynaptically, at least during consolidation; later, if plastic events increased its *presynaptic* expression (as homoreceptors), this would explain why MT3 has caused an opposite, facilitatory effect when administered pretest.

Both possibilities – M4 plasticity as hetero- or homoreceptors - are logically equivalent and further investigation is necessary to decide among them.

Finally, it must be pointed that MT3 has caused no evident effects in the open field habituation task (Figures 3), i.e., the M4 receptors in the dorsal hippocampus seem not to be involved in the memory retrieval process for this task. This suggests that the muscarinic system demands some degree of aversiveness in order to be recruited. This hypothesis demands some further investigation, but this differential response was already observed regarding this and other neuromodulatory systems [1].

#### Acknowledgements:

This research was supported by fellowships from the National Research Council of Brazil (CNPq), PROPESQ (UFRGS) and FAPERGS. Authors acknowledge Thiago Henriques, Bruna Pasqualini Genro, Ana Paula Aguiar, Jonathan T. Ramos, Veronica Cheli and Zelma Regina V. de Almeida for their helpful assistance in the experiments.

## **5. References**

[1] Alvares LO, Oliveira LF, Camboim C, Diehl F, Genro BP, Lanziotti VMB, Quillfeldt JA. Amnestic effect of intrahippocampal AM251, a CB1-selective blocker, in the inhibitory avoidance, but not in the open field habituation task, in rats. *Neurobiology of learning and memory*, 2005; 83: 119 -124.

[2] Anagnostaras SG, Murphy GG, Hamilton SE, Mitchell SL, Rahnema NP, Nathanson NM, Silva AJ. Selective cognitive dysfunction in acetylcholine M1 muscarinic receptor mutant mice. *Nature Neuroscience*, 2003; 6(1): 51 - 58.

[3] Auerbach JM, Segal M. A novel cholinergic induction of long-term potentiation in rat hippocampus. *J. Neurophysiol*, 1994; 72: 2034 - 2040.

[4] Barros DM, Mello e Souza T, De David T, Choi H, Aguzzoli A, Madche C, Ardenghi P, Medina JH, Izquierdo I. Simultaneous modulation of retrieval by dopaminergic D1, b-noradrenergic, serotonergic1A and cholinergic muscarinic receptors in cortical structures of the rat. *Behavi Brain Res*, 2001; 124: 1 - 7.

[5] Bradley KN. Muscarinic toxins from the green mamba. *Pharmacol Ther*, 2000; 85(2): 87 – 109.

[6] Caulfield MP, Birdsall NJ. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev*, 1998; 50: 279 - 290.

[7] Ferreira AR, Oliveira LF, Blanco C, Kornisiuk E, Sanchez G, Daroit D, Silva MC, Cerveñansky C, Jerusalinsky D, Quilfeldt JA. Role of hippocampal m1 and m4 muscarinic receptor subtypes in memory consolidation in the rat. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 2003; 74: 411 - 415.

[8] Figenschou A, Hu GY, Storm JF. Cholinergic modulation of the action potential in rat hippocampal neurons. *European Journal of Neuroscience*, 1996; 8: 211 - 219.

[9] Harvey AL, Bradley KN, Cochran SA, Rowan EG, Pratt JA, Quilfeldt JA, Jerusalinsky D. What can toxins tell us for drug discovery? *Toxicon*, 1998; 36: 1635 - 1640.

[10] Izquierdo I, Da Cunha C, Rosat R, Jerusalinsky D, Ferreira MBC, Medina JH. Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum and hippocampus of the rat. *Behav Neural Biol*, 1992; 58: 16-26.

[11] Jerusalinsky D, Harvey AL. Toxins from mamba venoms: small proteins with selectives for different subtypes of muscarinic acetylcholine receptors. *TiPS*, 1994; 15: 424 - 430.

[12] Jerusalinsky D, Kornisiuk E, Izquierdo I. Cholinergic neurotransmission and synaptic plasticity concerning memory processing. *Neurochem Res*, 1997; 22(4): 507-15.

[13] Jerusalinsky D, Kornisiuk E, Bernabeu R, Izquierdo I, Cerveñansky C. Muscarinic toxins from the venom of *Dendroaspis* snakes with agonist-like actions. *Toxicon*, 1995; 33 (4): 389-397.

[14] Jerusalinsky D, Kornisiuky E, Alfaro P, Quillfeldt JA, Alonso M, Verde ER, Cerveñansky C., Harvey AL (1998). Muscarinic toxins selective for M4 receptors impairs memory in the rat. *NeuroReport*, 1998; 9: 1407 - 1411.

[15] Jerusalinsky D, Kornisiuky E, Alfaro P, Quillfeldt JA, Ferreira AR, Rial VE, Duran R, Cerveñansky C. Muscarinic toxins novel pharmacological tools for the muscarinic cholinergic system. *Toxicon*, 2000; 38: 747 - 761.

[16] Kimura F, Baughman RW. Distinct muscarinic receptor subtypes suppress excitatory and inhibitory synaptic responses in cortical neurons. *Journal of Neurophysiology*, 1997; 77(2): 709 - 716.

[17] Kornisiuk E, Jerusalinsky D, Cerveñansky C, Harvey AL. Binding of muscarinic toxins MTx1 and MTx2 from the venom of the green mamba *Dendroaspis angusticeps* to cloned human muscarinic cholinceptors. *Toxicon*, 1995; 33:11 - 8. Corrigendum: *Toxicon* 1995 Aug;33(8):1111.

[18] Lanziotti VB, de Oliveira Alvares, L, Henriques TP, Diehl, F, Genro, BP, Fürstenau de Oliveira L, Camboim C, CerveñanskyC, Jerusalinsky D, Quillfeldt J. Intrahippocampal bicuculline and baclofen counteract the post-training amnesic effect of MT3, a selective M4 antagonist, 2006 – *submitted to Eur J Neurosci*

[19] McGaugh JL. Memory – a century of consolidation. *Science*, 2000; 287: 248 - 251.

[20] Nathanson NM. Molecular properties of the muscarinic acetylcholine receptor. *Annu Rev Neurosci*, 1987; 10:195 - 236.

[21] Olanas MC. Identification of rat brain muscarinic M4 receptors coupled to cyclic AMP using the selective antagonist muscarinic toxin 3. *European Journal of Pharmacology*, 1997; 357: 235 - 242.

[22] Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 4<sup>th</sup> ed. San Diego: Academic Press, 1998.

[23] Potter LT. Snake toxins that bind specifically to individual subtypes of muscarinic receptors. *Life Sci*, 2001; 68: 2541 - 2547.

[24] Quillfeldt JA, Schmitz PK, Walz R, Bianchin M, Zanatta MS, Medina JH, Izquierdo I. CNQX infused into entorhinal cortex blocks memory expression, and AMPA reverses the effect. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 1994; 48: 437 - 440.

[25] Rosat R, Da-Silva RC, Zanatta MS, Medina JH, Izquierdo I. Memory consolidation of a habituation task: Role of N-methyl-D-aspartate, cholinergic muscarinic and GABA-A receptors in different brain regions. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 1992; 25(3).

[26] Rouse ST, Levey AI. Muscarinic acetylcholine receptor immunoreactivity after hippocampal commissural/associational pathway lesions: evidence for multiple presynaptic receptor subtypes. *J Comp Neurol*, 1997; 380: 382 - 94.

[27] Rouse ST, Marino MJ, Potter LT, Conn PJ, Levey AI. Muscarinic receptor subtypes involved in hippocampal circuits. *Life Sciences*, 1999; 64(6, 7): 501 - 509.

[28] Segal M, Auerbach JM. Muscarinic receptor involved in hippocampal plasticity. *Life Sciences*, 1997; 60(13): 1085 - 1091.

[29] Szapiro G, Galante JM, Barros DM, Stein M, Vianna MRM, Izquierdo LA, Izquierdo I, Medina JH. Molecular mechanisms of memory retrieval. *Neurochemical research*, 2002; 27(11): 1491 - 1498.

[30] Taylor P, Brown JH. Acetylcholine. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD, editors. *Basic Neurochemistry, molecular, cellular and medical aspects*. 6<sup>th</sup> ed., New York. Raven Press, 1999, 231 - 260.

[31] Van der Zee EA, Luiten PG. Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: a review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory. *Prog Neurobiol*. 1999; 58(5):409-71

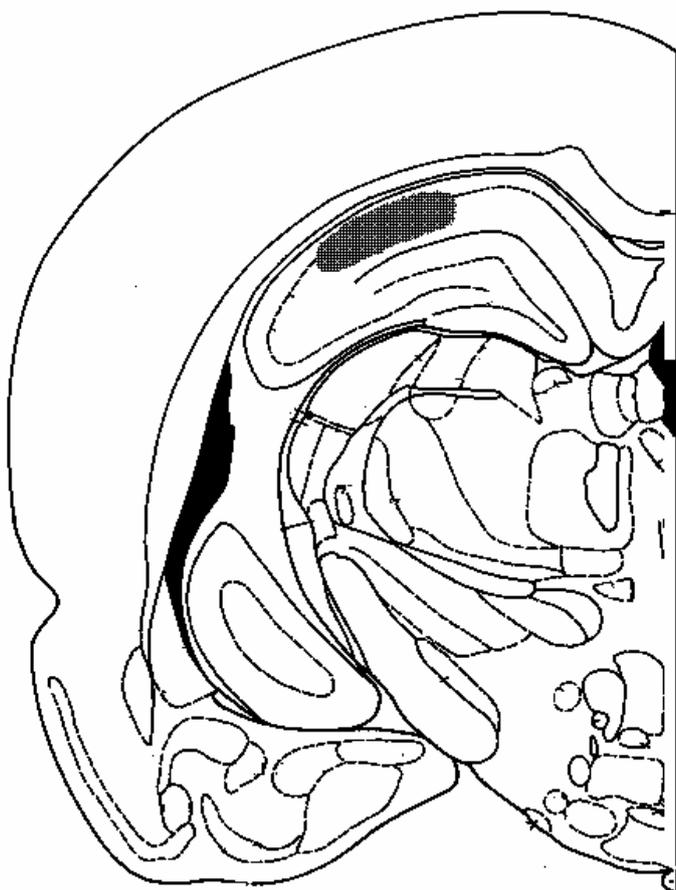
[32] Winkler J, Suhr ST, Gage FH, Thal LJ, Fisher LJ. Essential role of neocortical acetylcholine in spatial memory. *Nature*, 1995; 375: 484 – 487.

## LEGENDS TO FIGURES

**Figure 1** - Drawing representing AP plane -4.2 mm adapted from the Atlas of Paxinos and Watson (1998) [21] showing the extent of the area reached by our infusions in the rat dorsal hippocampus (stippled areas represent typical regions of accepted animals, as dyed by 0.5  $\mu$ l of 2% methylene blue in saline infused through the same cannulae).

**Figure 2** - Effect of MT3 in the step-down inhibitory avoidance task. Data expressed as median and interquartile intervals (training session in white; test session in gray). Ns per group, respectively, 21, 15, 11 and 16. Kruskal-Wallis test shows no significant difference among training session latencies ( $P=0,786$ ). (a) Each of the four experimental groups have shown a significant difference between training and test sessions latencies ( $P<0,05$ , Wilcoxon test). (b) Only the 2,0  $\mu$ g/side group of MT3 show a significant difference in the test session latency compared to the control group ( $P<0,05$ , Dunn test).

**Figure 3** - Absence of effect of MT3 in the open field task. Data expressed as mean  $\pm$  SEM. Ns per group, respectively, 9 and 11. (a) Number of Rearings in the test are significantly different from the training values (paired t test,  $P<0.05$ ). Training and test session latencies do not differ between control and treated group for MT3 in the dose effective in the inhibitory avoidance task ( $P>0.05$ , Student's t test).



**Figure 1**

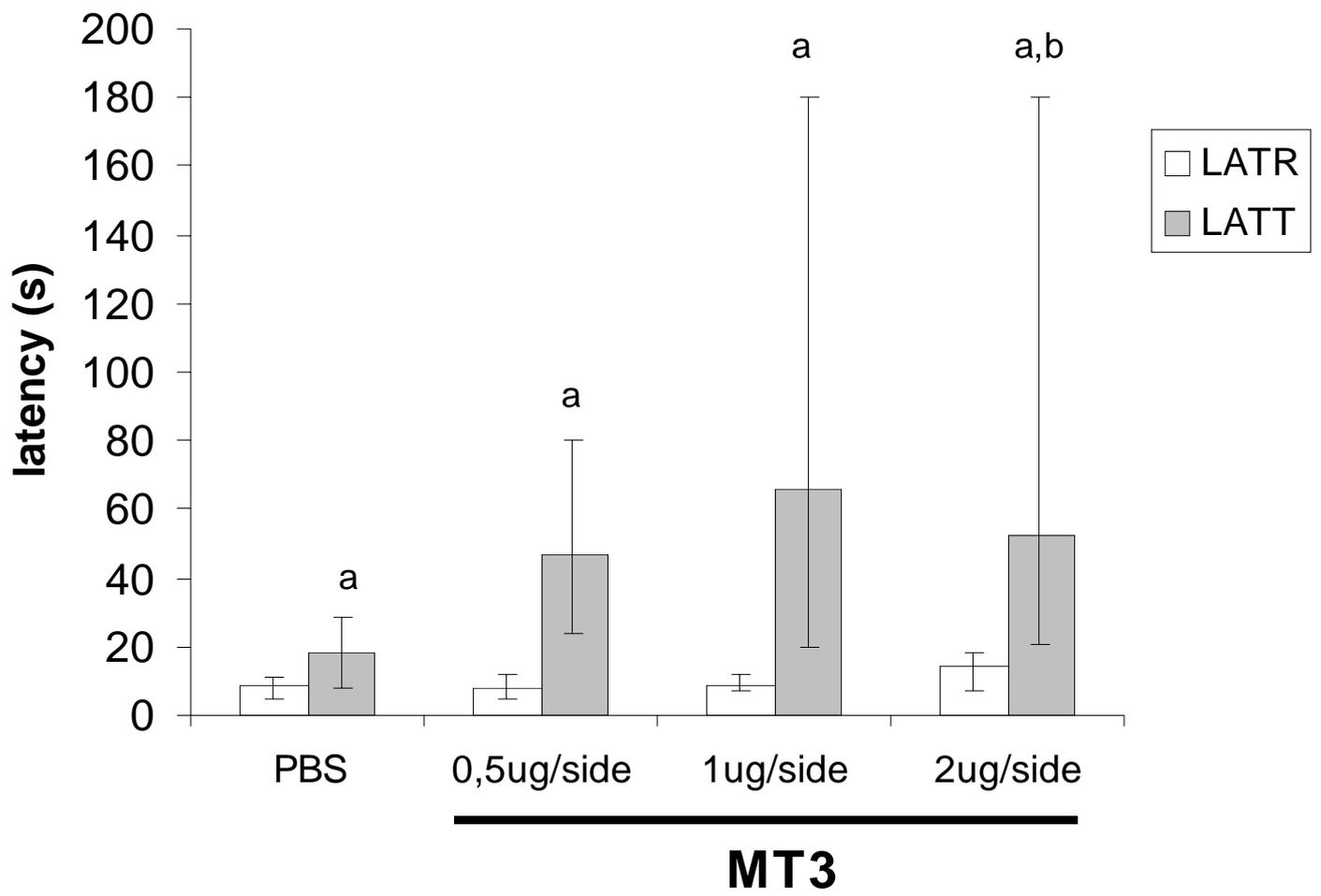


Figure 2

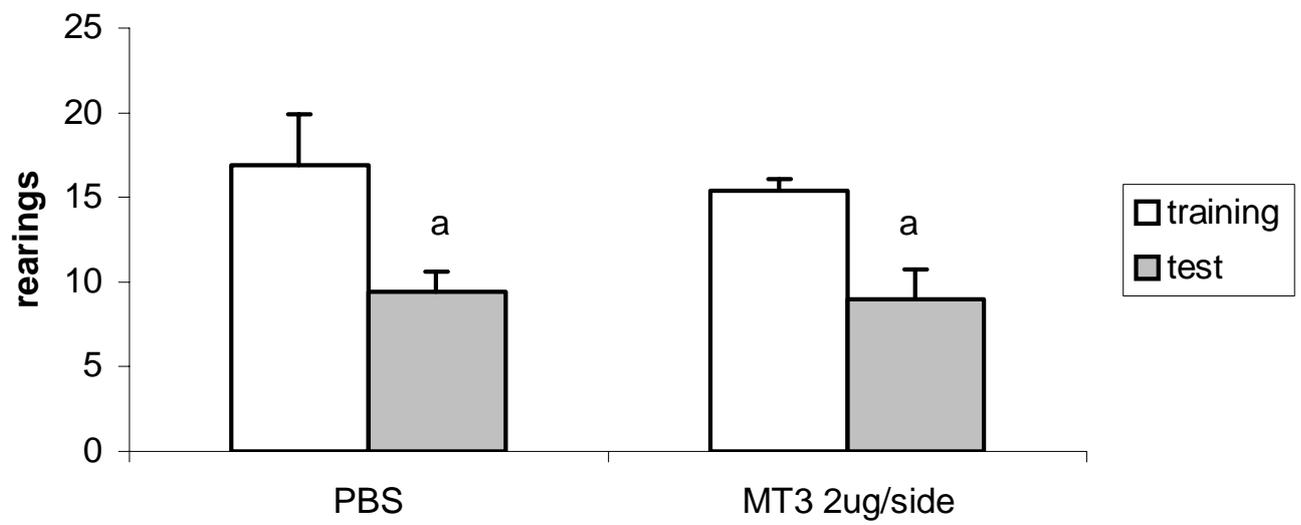
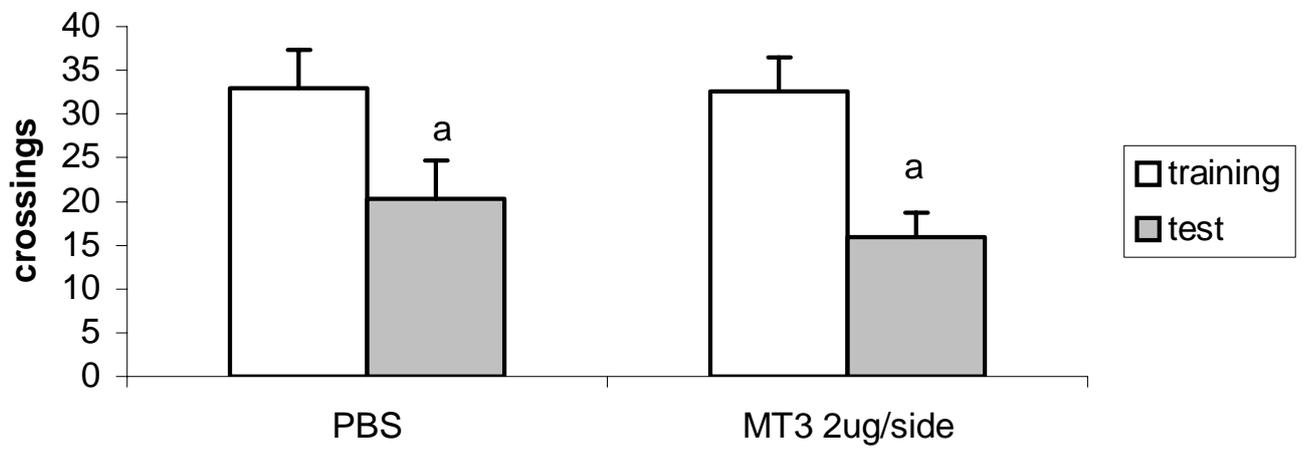


Figure 3

