

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE GERIATRIA E GERONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GERONTOLOGIA BIOMÉDICA
MESTRADO

**ANÁLISE DOS EFEITOS DA MORINA SOBRE A MEMÓRIA DE
RECONHECIMENTO E ESQUIVA INIBITÓRIA EM RATOS**

Caroline Prato Marques

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Gerontologia Biomédica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Gerontologia Biomédica.

Orientadora: Profa. Dra. Elke Bromberg

Porto Alegre, 2004

RESUMO

Diversos estudos têm demonstrado o potencial benéfico dos flavonóides sobre vários aspectos biológicos, o que levou a prescrição de diversas destas substâncias como suplementos alimentares para prevenir ou corrigir alterações funcionais, principalmente no que diz respeito àquelas relacionadas ao envelhecimento. A morina apresenta potencial protetor do sistema cardiovascular contra o estresse oxidativo e apresenta efeitos antitumorais bastante promissores no tratamento de neoplasias. Entretanto, outros estudos demonstram que ela é pró-oxidante por induzir a produção de superóxido ($O_2 \bullet^-$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), causar dano ao DNA em cultura de linfócitos e inibir a enzima glutatona redutase. Visto que vários estudos apontam que os radicais livres além de estarem envolvidos com a patogênese de muitas doenças, estão envolvidos com as mudanças e doenças associadas à idade, entre elas, o declínio da performance cognitiva, em particular, o aprendizado e a memória, o presente estudo tem por função analisar o efeito agudo de diferentes doses da morina sobre a memória de reconhecimento e esquila inibitória em ratos submetidos a tarefas comportamentais. Os animais submetidos à tarefa de reconhecimento do objeto novo receberam injeções intraperitoneais de veículo ou morina (Sigma) (5mmol/Kg e 50mmol/Kg) 96 horas antes da sessão de treino ou imediatamente após o treino da tarefa. Os ratos que receberam morina pré-treino, em ambas as doses, apresentaram bloqueio completo de STM e LTM. Nos ratos que receberam a dose de 5,0mmol/Kg imediatamente pós-treino foi observado efeito amnésico na STM e LTM enquanto que os ratos que receberam a dose de 50,0mmol/Kg apresentaram bloqueio apenas na LTM. O tempo total de exploração dos objetos durante a sessão de treino da tarefa onde os animais receberam morina pré treino foi diferente estatisticamente entre os grupos que receberam solução veículo e os grupos que receberam morina. Tal fato, nos leva a considerar que a morina pode ter algum outro efeito inespecífico sobre a atividade locomotora exploratória, motivação ou ansiedade. Expostos à tarefa de esquila inibitória os animais receberam injeções intraperitoneais de morina na dose de 50,0mmol/Kg 96 horas antes da

sessão de treino e nas doses de 5,0mmol/Kg e 50,0mmol/Kg em dois diferentes tempos: 30 pré-treino e imediatamente pós-treino. Em nenhuma das doses ou tempos foram encontrados déficits de memória. Em conjunto os resultados obtidos neste estudo indicam que os efeitos da morina sobre a memória dependem do conteúdo da tarefa comportamental, uma vez que ela causou prejuízo em uma tarefa neutra e não provocou alterações em uma tarefa aversiva. Entretanto, sugere-se a realização de estudos adicionais que avaliem o efeito deste flavonóide em outros aspectos neurocomportamentais, os quais poderiam influenciar o desempenho dos animais nas tarefas de memória.

Palavras-Chave: memória de reconhecimento – memória de esquiva inibitória – radicais livres – flavonóides – morina – envelhecimento – ratos

ABSTRACT

Various studies have demonstrated the beneficial potential of flavonoids on many biological aspects, which lead to the prescription of many of those substances as food supplements to prevent or to correct functional alterations, especially the ones concerning aging. Morin presents the potential to protect the cardiovascular system against oxidative stress and also presents very promising anti-tumor effects on the treatment of neoplasias. However, other studies demonstrate that morin is pro-oxidant because it induces the production of superoxide ($O_2 \bullet^-$) and hydrogen peroxide (H_2O_2) and because it causes damage to DNA in lymphocyte cultures and it inhibits the enzyme glutathione reductase. Once many studies indicate that free radicals, besides being involved in pathogeny of many illnesses, are involved in changes and illnesses associated to aging, including the decline of cognitive performance, particularly learning and memory, the present study aims at analyzing the acute effect of different doses of morin on recognition memory and inhibitory avoidance in mice submitted to behavioral tasks. The animals submitted to the task of recognizing a new object were administrated intraperitoneal injections of vehicle or morin (Sigma) (5mmol/Kg e 50mmol/Kg) 96 hours before the training session or immediately after task training. Mice that received morin before training, in both doses, presented complete block of STM and LTM. In mice that received the 5,0mmol/Kg dose immediately after training, amnesiac effect of STM and LTM was observed, while mice that received the 50,0mmol/Kg dose presented only LTM block. The

total time of exploration of objects during task training session in which the animals received morin before training was statistically different between the groups that received vehicle solution and the groups that received morin. Such fact lead us to consider that morin may have some other unspecific effect on the exploratory locomotion activity, motivation or anxiety. Exposed to inhibitory avoidance task, animals were administrated intraperitoneal injections of morin in 50,0mmol/Kg doses 96 hours before the training session and 5,0mmol/Kg and 50,0mmol/Kg doses in two different moments: 30 before training and immediately after training. In none of the doses or moments memory deficits were found. As a whole, the results found in this study indicate that the effects of morin on memory depend on the content of the behavioral task, once it damaged a neutral task and it did not provoke alterations in an aversive task. However, we suggest the accomplishment of additional studies which evaluate the effect of this flavonoid on other neurobehavioral aspects, which could influence the performance of animals in memory tasks.

Key words: recognition memory - inhibitory avoidance memory - free radicals - flavonoids - morin - aging - mice

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA – ácido amino-hidroxil-isoxazol-propiónico

AMPc – adenosina monofosfato cíclico

ANOVA – análise de variância de uma via

CAMKII – proteína quinase cálcio-calmodulina dependentes

CREB – proteína ligante de elemento responsivo ao AMPc

DNA – ácido desoxirribonucléico

GMPc - -guanosina monofosfato cíclico

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

IP3 – inositol-1,4,5 – trifosfato

LTM – memória de longa duração (do inglês, long-term memory)

LTP – potenciação de longa duração (do inglês, long-term potentiation)

MAPK – proteína quinase ativada por mitógenos

NMDA – ácido N-metil-d-aspártico

PI – fosfatidilinositol

PIP – fosfatidilinositol-4-fosfato

PIP2 – fosfatidilinositol-4,5-bifosfato

PIPK – fosfatidilinositol fosfato quinase

PKA – proteína quinase dependente de AMPc

PKC – proteína quinase dependente de cálcio

PKG – proteína quinase dependente de GMPc

RNA – ácido ribonucléico

ROS – espécies reativas de oxigênio

SNC – sistema nervoso central

SOD – superóxido dismutase

STM – memória de curta duração (do inglês, short-term memory)

OH^- - íon hidroxil

$\text{OH}\cdot$ - radical hidroxil

INTRODUÇÃO

As populações de idosos têm sofrido um aumento substancial em praticamente todos os países do mundo. No caso brasileiro, atualmente, a população com idade igual ou superior a 60 anos é da ordem de 15 milhões de habitantes, uma vez que a participação de idosos na população nacional total dobrou nos últimos 50 anos, passando de 4% em 1940 para 9% no ano 2000. Projeções recentes indicam que esse segmento poderá ser responsável por quase 15% da população brasileira em 2020⁽¹⁾

Todo esse aumento deve-se a alta taxa de fecundidade observada nos anos 50 e 60, à queda da mortalidade e as melhorias nas condições de saúde ocasionada por uma tecnologia médica mais avançada, bem como a Universalização da Seguridade Nacional, maior acesso aos serviços de saúde e outras mudanças tecnológicas, levando o idoso a ter sua expectativa de sobrevida aumentada⁽¹⁾. O aumento na expectativa de vida tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento aumentou a necessidade de se ter maiores informações a respeito do processo de envelhecimento per se e doenças associadas.

Investigações na área da biologia do envelhecimento sobre as possíveis causas do envelhecimento apontam que os radicais livres além de estarem envolvidos com a patogênese de muitas doenças^{2,3}, estão envolvidos com as mudanças e doenças associadas à idade^(4,5), entre elas, o declínio da performance cognitiva, em particular, o aprendizado e a memória⁽⁵⁾.

A importância da associação entre o estresse oxidativo, envelhecimento e morbidades está relacionada com a constante produção de radicais livres por organismos vivos, a qual é controlada através da produção endógena de enzimas antioxidantes e pelo consumo de antioxidantes exógenos não enzimáticos, tais como as vitaminas C e E entre outros.

Dentre as enzimas que têm papel antioxidante destacam-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase e a glutathione peroxidase, que se apresentam diminuídas no sistema nervoso durante o processo de envelhecimento⁽⁴⁾. No entanto, o uso terapêutico de antioxidantes não é recomendável, pois faltam dados científicos que demonstrem efetivamente que seu uso é seguro e eficiente. Por este motivo diversas sociedades profissionais e científicas como *American Dietetic Association*⁶ consideram que a melhor forma de consumo destas substâncias é através de uma dieta rica em frutas e vegetais.

Assim, torna-se interessante a análise dos efeitos dos flavonóides, compostos polifenólicos considerados antioxidantes, na prevenção e tratamento de diversas doenças relacionadas ao envelhecimento, entre as quais àquelas relacionadas a neurodegeneração, especialmente no que se refere a déficits cognitivos como a memória.

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Teorias sobre o Envelhecimento

Apesar dos grandes avanços realizados nas pesquisas sobre o processo do envelhecimento, vários são os conceitos que tentam defini-lo, mas poucos conseguem chegar ao grau de generalização necessário para explicar satisfatoriamente os mecanismos subjacentes a este processo ⁽⁴⁾.

Acredita-se que envelhecemos por que sobre uma base genética atuam, com maior ou menor intensidade, fatores extrínsecos. Estes fatores extrínsecos incluiriam aspectos psicossociais e ambientais, determinando alterações funcionais, celulares e moleculares acarretando a aceleração ou desaceleração da capacidade de equilíbrio homeostático e, portanto, influenciando na predisposição a doenças ⁽⁷⁾.

Do ponto de vista biológico, pode-se dizer que o envelhecimento trata de um processo normal, multifatorial e irreversível, que age gradualmente em função do tempo, levando a uma perda de aptidões e tendo como resultado final a morte ⁽⁸⁾.

A multifatorialidade envolvida no processo do envelhecimento dos seres vivos torna a sua explicação complexa e com diversas questões em aberto. Existem diversas teorias que priorizam um ou outro aspecto associado ao desencadeamento das modificações biogerontológicas, sendo sugeridas diferentes classificações.

Hart e Tuturro ⁽⁹⁾ sugeriram uma escala crescente de abrangência: teorias de base celular, teorias baseadas em órgãos e sistemas, teorias populacionais e teorias integrativas.

Hayflick⁽¹⁰⁾ optou por uma classificação baseada em eventos que geram as mudanças associadas ao envelhecimento, sendo caracterizados por eventos programados geneticamente ou eventos aleatórios.

Finch⁽¹¹⁾ dividiu as teorias em evolutivas e não-evolutivas. As evolutivas se ocupariam em justificar o papel do envelhecimento através dos grupos filogenéticos, enquanto as não-evolutivas se concentrariam nos mecanismos celulares, fisiológicos e ambientais que atuam sobre o processo.

Arking⁽²⁾ sugeriu o emprego de uma classificação dual que considera tanto a origem da mudança observada com o envelhecimento destacada, pela teoria (estocástica ou sistêmica), quanto o nível onde o efeito da mudança é encontrado (intracelular ou extracelular): uma determinada teoria pode ser ao mesmo tempo intracelular e estocástica, por exemplo.

Masoro⁽¹²⁾ propôs que as teorias poderiam ser agrupadas em quatro categorias: (1) relógios de envelhecimento adaptados evolucionariamente a cada espécie ou grupo de espécies; (2) uso e desgaste; (3) genes e expressão gênica e (4) regulação da função sistêmica.

Dentre essas diversas teorias que tentam explicar o processo do envelhecimento, talvez a mais debatida atualmente, e que possui um corpo relativamente extenso de evidências, seja a teoria dos radicais livres ou teoria do dano oxidativo. Esta teoria preconiza que as células ao gerarem altos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) seriam danificadas por estes compostos, influenciando seu funcionamento normal o que, num efeito “cascata”, prejudicaria tecidos, órgãos e até o organismo como um todo. Desta forma, a maioria ou todas as deficiências fisiológicas características de mudanças relacionadas com a idade poderiam ser atribuídas aos danos intracelulares produzidos pelos radicais livres^(3,13).

Baixos níveis de ROS, incluindo o radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$), ânions superóxido ($\text{O}_2 \bullet^-$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são constantemente gerados nos organismos aeróbios, visto que são indispensáveis em muitos processos bioquímicos, como a diferenciação e a

proliferação celular, apoptose (4), imunidade (5) e defesa contra microorganismos⁽¹⁴⁾. Em contraste, altos níveis ou a remoção inadequada de ROS resulta no estresse oxidativo que causa um acúmulo de disfunções em nível molecular e celular⁽¹⁵⁾. Além de formar compostos inúteis para o metabolismo celular, o estresse oxidativo é capaz de danificar o DNA e produzir ligações cruzadas em algumas moléculas essenciais para a manutenção fisiológica e estrutural das células e tecidos^(14,15).

Os indícios de que os radicais livres estão envolvidos com mudanças associadas à idade são relatados em experimentos com um grupo de substâncias químicas que inibem a formação destes radicais. Esses inibidores são chamados de antioxidantes, pois impedem que o oxigênio se combine com moléculas suscetíveis para a formação de radicais livres prejudiciais.

Dada a importância das substâncias antioxidantes presentes na dieta e no organismo, investigações buscando a identificação destes compostos e do seu papel no processo do envelhecimento e nas patologias decorrentes se fazem cada vez mais presentes, sendo compatíveis com a teoria do envelhecimento que se acredita subsidiar teoricamente o presente estudo. Por tal motivo, considerações sobre classes não enzimáticas de antioxidantes, como é o caso dos flavonóides, são importantes de serem aqui comentadas.

1. 2 O papel antioxidativo dos flavonoides

Muitas espécies de plantas produzem uma série de moléculas denominadas fitoquímicos que possuem uma ação ativa no metabolismo corporal dos organismos vivos. Estes compostos são geralmente ingeridos através dos alimentos e nos últimos anos têm atraído a atenção de cientistas de diversas áreas. Os fitoquímicos abrangem um grande

número de moléculas que incluem polifenóis, fitosteróis e fitestrógenos. Recentemente, Carvalho et al.¹⁶ realizaram uma revisão que inclui as principais classes de fitoquímicos e seu possível efeito na saúde humana.

Dentre os fitoquímicos, os polifenóis são compostos encontrados em quase todos os alimentos vegetais e são uma das principais fontes de compostos bioativos da dieta. Mais de 8.000 polifenóis são conhecidos e mais de 2.000 são encontrados na natureza. Nas plantas, eles são essenciais para a pigmentação, crescimento, reprodução, resistência a patógenos e muitas outras funções. No grupo dos polifenóis encontramos vários subgrupos, dentre os quais, os flavonóides, descobertos pelo bioquímico Alberto Gyorgi, que os chamou de “vitamina P”. Este pesquisador descobriu que os flavonóides auxiliavam nas atividades da vitamina C, melhorando sua absorção e protegendo contra a oxidação⁽¹⁶⁾.

Portanto, os flavonóides são antioxidantes polifenólicos encontrados nos alimentos, principalmente nas verduras, frutas, grãos, sementes, castanha, condimentos, ervas e também em bebidas como vinho e chá. Sendo assim, os flavonóides são considerados alimentos funcionais.

Segundo a Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde¹⁷, no Brasil, a definição adequada de alimentos funcionais seria: “Qualquer alimento ou parte do alimento que proporciona efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou benéficos à saúde, devendo ser seguro para o consumo a partir de pesquisas incluindo a prevenção e o controle de doenças, além de satisfazer os requerimentos nutricionais tradicionais” .

Existem evidências de que uma nutrição equilibrada associada a um estilo de vida saudável pode adiar ou reduzir algumas mudanças deletérias que podem estar associadas ao envelhecimento⁽¹⁸⁾. Estudos sobre o uso de flavonóides sugerem que estas substâncias além do potencial antioxidante, parecem ter uma grande variedade de efeitos biológicos^(19,20,21). Suas propriedades antioxidantes, antiinflamatórias, antitumorais, antitrombogênicas e

antiosteoporóticas têm levado ao desenvolvimento de diversos estudos experimentais e epidemiológicos^(22,23) a respeito de sua utilização na prevenção e tratamento de diversas doenças relacionadas ao envelhecimento, entre as quais àquelas relacionadas a disfunções do sistema cardiovascular^(24,25,26) e a neurodegeneração^(27,28). Entretanto, os efeitos dos flavonóides dependem de diferentes fatores, entre os quais os componentes específicos utilizados, o tipo de tecido sob investigação e concentrações usadas, uma vez que vários estudos indicam que estas substâncias podem apresentar efeitos antagônicos dependendo da situação experimental. Diversos trabalhos evidenciam tanto potencialidades pró como antioxidantes dos flavonóides^(2029,30,31,32).

Entre os flavonóides existe uma molécula denominada morina que parece ter efeito ativo no metabolismo fisiológico e bioquímico. A morina (2',3',4',5,7-pentahidroxiavona), um pigmento amarelo originalmente extraído de *Chlorophora tinctoria*⁽¹⁹⁾, é um flavonóide que tem sido amplamente estudado no que se refere aos seus efeitos protetores do sistema cardiovascular contra o estresse oxidativo.

Adicionalmente a morina, assim como outros flavonóides, teria atividade imunomodulatória e antitumoral. Em relação a este último efeito foram obtidos resultados bastante promissores tanto em estudos *in vitro* quanto *in vivo*. Foi demonstrado que a suplementação alimentar com flavonóides é capaz de prevenir a gênese de tumores normalmente induzidos por fatores carcinogênicos⁽¹⁹⁾, sendo possível que o efeito antitumoral da morina esteja relacionado a sua capacidade de inibir a PIPK⁽¹⁹⁾, uma enzima envolvida na transdução de sinais intracelulares pelos fosfoinositídeos através da ativação da PKC e mobilização do Ca⁺⁺ intracelular⁽³³⁾. Entretanto, este efeito inibitório sobre a PIPK é observado também em células sadias do sistema nervoso central, onde poderia vir a promover prejuízos sobre a memória por deprimir a atividade da PKC, a qual é necessária tanto para a consolidação quanto evocação da memória⁽¹⁹⁾.

Outros estudos demonstram que a morina, apesar de ser um flavonóide, pode tornar-se uma molécula pró-oxidante, uma vez que induz a produção de superóxido ($O_2 \bullet^-$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), promove o dano do DNA em cultura de linfócitos e inibe a enzima glutathiona redutase⁽³⁴⁾.

Sabendo-se que o aumento do estresse oxidativo está intimamente ligado à prejuízos cognitivos relacionados com o envelhecimento normal e com doenças neurodegenerativas, a administração de agentes antioxidantes torna-se uma importante alternativa na prevenção de tais déficits⁽³⁵⁾.

1.3 Memória

O sistema nervoso central (SNC) é o sistema biológico mais comprometido com o processo do envelhecimento, pois é o responsável pela vida de relação (sensações, movimentos, funções psíquicas, entre outros) e pela vida vegetativa (funções biológicas internas)⁽³⁶⁾. O comprometimento do SNC tem sido preocupante pelo fato de não haver indicativos promissores de que dispõe de capacidade reparadora, ficando sujeito ao processo de envelhecimento através de fatores extrínsecos (ambiente, sedentarismo, tabagismo, entre outros) e intrínsecos (genético, sexo, circulatório, metabólico, radicais livres, entre outros), que exercem uma ação deletéria com o decorrer do tempo⁽³⁶⁾, tornando relevante a avaliação da relação entre envelhecimento e memória, uma vez que esta última é uma das mais importantes funções cognitivas do ser humano, responsável pelo armazenamento de informações e de conhecimentos sobre nós mesmos e o mundo que nos cerca, que nos dá uma identidade. Ela é a base para o desenvolvimento da linguagem, do reconhecimento das pessoas e dos objetos que encontramos todos os dias, para sabermos quem somos e para termos a consciência da continuidade de nossas vidas. Sem a memória, a cada dia, ou a cada

momento, estaríamos começando uma vida nova, sem podermos nos valer do que aprendemos anteriormente⁽³⁷⁾.

A capacidade de adaptação do indivíduo ao seu ambiente depende da aquisição, retenção e evocação de estratégias adequadas de ação. A aquisição de novas informações faz parte de um processo denominado aprendizado, enquanto o armazenamento e a evocação dos conhecimentos compõem a memória. Embora seja conveniente descrever as memórias como se elas fossem notas guardadas em um arquivo, esta certamente não é a forma pela qual as experiências vividas são armazenadas no encéfalo. Na realidade o estabelecimento da memória depende de uma série de mecanismos fisiológicos e bioquímicos que alteram a forma de perceber, pensar, planejar e agir, presumivelmente por alterar os circuitos neurais envolvidos na percepção, desempenho, pensamento e planejamento⁽³⁸⁾.

Logo, memória é a aquisição, a conservação e a evocação de informações. A aquisição é também chamada de aprendizagem: só se “grava” aquilo que foi aprendido. A evocação é também chamada de recordação, lembrança, recuperação. Só lembramos aquilo que gravamos, aquilo que foi aprendido. Assim, há tantas memórias possíveis como experiências e, portanto, qualquer classificação é artificial. No entanto, principalmente do ponto de vista prático ou clínico, existem classificações de memória que têm contribuído para esclarecer aspectos importantes.

Quanto à duração as memórias podem ser classificadas em memórias de curta prazo (STM - de poucos minutos até três ou quatro horas) e memórias de longo prazo (LTM), as quais persistem dias, meses ou anos.

Pode-se dizer que a memória de curta duração é o processo, ou conjunto de processos, que mantém a memória funcionando durante as horas em que a memória de longa duração não adquiriu sua forma definitiva. Durante muito tempo se discutiu se a memória de curta duração é simplesmente uma fase inicial da memória como um todo, ou se a memória de

curta e longa duração envolvem processos paralelos e até certo ponto independentes. Atualmente, sabe-se que a memória de curta duração requer as mesmas estruturas nervosas que a de longa duração, mas envolve mecanismos próprios e distintos⁽³⁹⁾.

Quanto ao conteúdo as memórias podem ser classificadas em memórias declarativas, que registram fatos, eventos ou conhecimentos e memórias procedurais ou memórias de procedimentos, memórias de capacidades ou habilidades motoras ou sensoriais e que normalmente chamamos de “hábito”⁽³⁹⁾.

Entre as memórias declarativas, as referentes a eventos aos quais assistimos ou dos quais participamos são denominadas episódicas e, as de conhecimentos gerais, semânticas⁽³⁹⁾. Tanto as memórias declarativas quanto as procedurais podem ser divididas em explícitas, memórias adquiridas com plena intervenção da consciência, e implícitas, memórias adquiridas sem que haja uma consciência clara da aquisição.

O hipocampo é a estrutura central para a formação de memórias declarativas, sendo que várias regiões corticais como a pré-frontal, a entorrinal e a parietal participam do processo. As memórias implícitas envolvem, em diversos casos, algumas dessas áreas, mas dependem fundamentalmente de circuitos subcorticais (núcleo caudado ou globo pálido) ou cerebelares⁽³⁹⁾.

No entanto, as memórias não são adquiridas imediatamente na sua forma final. Durante os primeiros minutos ou horas após sua aquisição, elas são suscetíveis à interferência por outras memórias, por drogas ou por outros tratamentos.

A formação de uma memória de longa duração envolve uma série de processos bioquímicos no hipocampo e outras estruturas cerebrais que compreendem diversas fases e que requerem entre três e oito horas. Enquanto esses processos não estiverem concluídos, as memórias de longa duração são lábeis. O conjunto desses processos e o seu resultado final denomina-se consolidação⁽³⁹⁾.

A fase de evocação corresponde à reincidência de um comportamento novo, confirmando, que houve aquisição daquele comportamento. William James, citado por Bromberg (1994)⁴⁰ postulou “a única prova de que está havendo retenção de memória é quando podemos evocá-la”.

1.4 Memória e Envelhecimento

O envelhecimento normal é tipicamente acompanhado por um espectro de alterações cognitivas, as quais incluem alterações na memória. A dificuldade que os idosos apresentam com a memória é freqüentemente denominada esquecimento benigno da senescência. Problemas de memória, no entanto, não são universais entre os idosos, pois alguns indivíduos desse grupo apresentam excelente memória⁽³⁶⁾.

Prejuízos na função da memória declarativa relacionados com a idade têm sido observados em uma variedade de espécies de animais, incluindo os roedores. Os roedores, como todas as espécies de mamíferos, apresentam sistema neuronal semelhantes o que possibilita a elaboração de inferências para os humanos⁽³⁹⁾. Pelo estudo desses animais, cientistas buscam compreender o processo do envelhecimento com maior detalhamento.

Um achado importante é que a perda de neurônios não é a principal alteração que ocorre no encéfalo durante o envelhecimento normal. Estudos em camundongos e ratos têm demonstrado uma perda de sinapses em vias aferentes do hipocampo, além da ocorrência de alterações na capacidade dessa via em gerar e manter a potenciação de longa duração (LTP, do inglês *long-term potentiation*), importante mecanismo celular que participa da formação da memória⁽⁴¹⁾: uma vez induzida, a LTP decai com rapidez anormal.

Em nível molecular foi verificado que em camundongos velhos uma alteração fase final da LTP, a qual é mediada em parte pela proteína quinase dependente de AMPc. Essa alteração correlaciona-se com a gravidade do prejuízo na memória⁽³⁷⁾.

Em humanos, estudos recentes têm indicado que a importância dos prejuízos de aprendizado e memória deve-se ao fato de que 12% das pessoas com déficits cognitivos desenvolvem Doença de Alzheimer⁽⁵⁾. Devido às consequências devastadoras da perda da memória, grandes esforços da comunidade científica vêm ocorrendo para que se possa compreender e tentar reverter estes quadros patológicos.

Vários estudos apontam para a afirmação de que os radicais livres, além de estarem envolvidos com a patogênese de muitas doenças^(22,3), estão envolvidos com as doenças e mudanças associadas à idade^(4,5), entre elas, o declínio da performance cognitiva, em particular o declínio do aprendizado e da memória⁽⁵⁾. Neste sentido, os efeitos da morina sobre o sistema nervoso central são praticamente desconhecidos, não existindo estudo relacionado aos seus efeitos em aspectos cognitivos. Assim, a semelhança entre os sistemas neuronais de todas as espécies de mamíferos, permite fazer interferências sensatas de achados em espécies menores e extrapolá-los aos humanos⁽³⁹⁾, tornando importante a verificação dos efeitos da morina sobre a memória de reconhecimento e esQUIVA inibitória em ratos.

Considerando-se que a importância de um trabalho desta natureza está diretamente relacionada com a possibilidade de analisar seus resultados em função de aspectos relevantes para a cognição humana, o presente estudo trata da avaliação do efeito da morina sobre a memória, através da utilização de duas tarefas comportamentais com diferentes características e demandas.

A tarefa de reconhecimento de objetos caracteriza-se por ser uma memória de conteúdo não aversivo, podendo ser facilmente correlacionada com tarefas de memória de reconhecimento em humanos, as quais são amplamente utilizadas em testes cognitivos para a

avaliação de síndromes amnésicas⁽⁴²⁾. Por sua vez, a tarefa de esquiva inibitória permite a avaliação de memórias emocionais e é uma tarefa amplamente utilizada em estudos farmacológicos de memória⁽⁴³⁾ apresentando grande parte de suas principais rotas bioquímicas, circuitos neurais e processos modulatórios identificados.

2. PROBLEMA E OBJETIVOS

2.1 Problema

O presente estudo teve como problema: Quais os efeitos da administração aguda de morina sobre a memória de reconhecimento e esquiva em ratos adultos?

2.2 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo geral avaliar os efeitos da administração aguda de morina sobre a memória de reconhecimento e esquiva em ratos adultos.

2.3 Objetivos específicos:

Avaliar o efeito da administração aguda de diferentes doses de morina (5,0 e 50,0mmol/Kg) 96 horas antes da sessão de treino da tarefa de reconhecimento do objeto novo sobre a memória de reconhecimento.

Avaliar o efeito da administração aguda de diferentes doses de morina (5,0 e 50,0mmol/Kg) imediatamente após a sessão de treino da tarefa de reconhecimento do objeto novo sobre a memória de reconhecimento.

Analisar o desempenho dos animais na tarefa de esquiva inibitória sob o efeito da administração aguda de diferentes doses de morina 96 horas antes da sessão de treino da tarefa.

Analisar o desempenho dos animais na tarefa de esquiva inibitória sob o efeito da administração aguda de diferentes doses de morina 30 minutos antes da sessão de treino da tarefa.

Analisar o desempenho dos animais na tarefa de esquiva inibitória sob o efeito da administração aguda de morina imediatamente após a sessão de treino da tarefa.

Verificar os efeitos das diferentes doses e tempos de aplicação da morina sobre a STM (avaliado, 90 minutos após a sessão de treino) e LTM (avaliado, 24 horas após a sessão de treino) das tarefas de reconhecimento do objeto novo e esquiva inibitória.

3. MATERIAL E MÉTODOS

No presente estudo, os procedimentos experimentais foram realizados a partir do estabelecido para a utilização de animais em experimentos científicos⁽⁴⁴⁾, estando de acordo com a literatura especializada⁽⁴²⁾, com estudos prévios realizados no Laboratório de Fisiologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul^(45,46) e com os testes estatísticos amplamente utilizados para este tipo de protocolo experimental⁽⁴⁷⁾.

3.1 Animais experimentais

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos com idade de 3 meses provenientes da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde – FEPPS -RS. Os animais foram mantidos no Laboratório de Fisiologia da PUCRS, sob um ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura ambiente de 21° C. Grupos de 4 a 5 ratos foram acondicionados em gaiolas plexiglas (50x40x15cm) com assoalho recoberto por serragem limpa e seca. Alimento (ração padronizada) e água foram fornecidos *ad libitum*, de acordo com as orientações do Manual para Técnicos de Bioterismo⁴⁸

3.2 Tratamentos

Os tratamentos farmacológicos e tarefas comportamentais foram integralmente realizados no Laboratório de Fisiologia da Faculdade de Biociências da PUCRS.

Os animais submetidos as tarefas comportamentais receberam uma (1) injeção intraperitoneal de solução veículo (compondo o grupo controle) ou morina (compondo os grupos experimentais) em um volume de 2ml/Kg de peso corporal. A injeção foi aplicada 96 horas antes da sessão de treino e imediatamente após a sessão de treino da tarefa de reconhecimento do objeto novo e 96 horas ou 30 minutos antes da sessão de treino e imediatamente após a sessão de treino da tarefa de esquiva inibitória . Estes tempos foram determinados com base em literatura específica a respeito dos efeitos da morina sobre o sistema nervoso central ⁽¹⁹⁾.

A morina (Sigma) foi dissolvida em solução veículo (15% Tween-20 em solução salina) e administrada em duas doses aos animais: 5mmol/Kg e 50mmol/Kg utilizando-se seringas descartáveis de 1ml (Injex).

3.3 Tarefas Comportamentais

3.3.1 Esquiva Inibitória

Esta tarefa foi realizada em uma caixa de condicionamento automatizada (Albarsh) de 50x25x25 cm com face frontal de vidro. Na extremidade esquerda da caixa encontra-se uma plataforma de fórmica de 8cm de largura e 25cm de comprimento, situada a 5cm do chão da

caixa. No restante da caixa o assoalho é formado por uma grade de barras de bronze, as quais apresentam 0,1cm de diâmetro e encontram-se separadas umas das outras por um espaço de 1cm. Na sessão treino os animais foram colocados sobre a plataforma de fórmica e sua latência para descer, apoiando as quatro patas na grade de bronze, foi registrada. Quando os animais desceram para a grade de bronze receberam um choque de 0,3 mA durante 2s, sendo retirados da caixa logo após.

Nas sessões de teste (90 minutos pós-treino para a memória de curto prazo e 24 horas pós-treino para a memória de longo prazo após o treino), os procedimentos foram semelhantes àqueles da sessão de treino, exceto pela omissão dos choques. A diferença entre a latência da sessão teste e da sessão treino foi tomada como medida da memória. Foi estabelecido um teto máximo de latência de descida da plataforma correspondente a 180s, de modo que latências superiores a 180s foram computadas como 180s⁽⁴⁹⁾. Os testes para avaliação de STM e LTM foram realizados 90 minutos e 24 horas após a sessão de treino, respectivamente.

3.3.2 Reconhecimento do Objeto Novo

No primeiro dia de execução da tarefa cada rato foi submetido a uma sessão de habituação ao pesquisador (*handling*), durante 1 minuto e meio. No dia seguinte, os ratos foram individualmente habituados, durante 5 minutos, numa caixa de campo aberto (caixa de madeira medindo 45x40x60cm, com a face frontal de vidro), que continha somente serragem. No terceiro dia, durante a sessão de treino, dois objetos idênticos foram colocados no campo aberto e o animal pode explorá-los durante cinco minutos. O tempo gasto pelo animal na exploração de cada objeto foi registrado, utilizando-se 2 cronômetros.

Durante as sessões de testes de retenção, uma de memória de curta duração (realizada 90 minutos após o treino) e outra de memória de longa duração (realizada 24 horas após o treino), o rato foi colocado novamente na mesma caixa, onde um dos objetos familiares, utilizados na sessão de treino, foi substituído por um objeto novo. Na sessão de teste, o animal pode explorar a caixa por cinco minutos.

Um índice de preferência, a razão entre a quantidade de tempo gasto na exploração de qualquer um dos objetos (na sessão de treino) ou o objeto novo (sessão de teste) sobre o tempo total gasto explorando ambos os objetos, foi utilizado como uma medida de memória de reconhecimento. Assim, a proporção do tempo total que o animal gastou investigando o objeto novo é o “índice de reconhecimento” expresso pela taxa $T_B/(T_A + T_B)$, onde T_A =tempo gasto explorando o objeto familiar e T_B =tempo gasto explorando o objeto novo ⁽⁴²⁾.

3.4 Análise Estatística

Os diferentes grupos experimentais submetidos às tarefas de reconhecimento do objeto novo e esQUIVA inobitória foram comparados quanto ao seu desempenho na sessão de treino por meio da análise de variância de Kruskal-Wallis ⁽⁴⁹⁾.

As comparações entre as sessões de treino e teste de um mesmo grupo foram realizadas utilizando o teste de Wilcoxon .

O tempo total de exploração dos objetos na sessão de treino foi comparado entre os grupos através da análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey, quando necessário⁽⁴²⁾.

Em todas as comparações, $p \leq 0,05$ foi considerado significativo estatisticamente.

4. RESULTADOS

4.1 Efeitos da Administração Aguda de Morina sobre a Memória de Reconhecimento em Ratos Adultos

Para avaliar os efeitos da administração aguda de morina sobre a memória de reconhecimento, os animais foram submetidos à tarefa de reconhecimento do objeto novo e receberam morina nas doses de 5,0mmol/Kg e 50,0mmol/Kg em dois diferentes tempos: 96 horas antes da sessão de treino e imediatamente após a sessão de treino da tarefa.

4.1.1 Efeitos da Administração Aguda de Morina 96 horas antes da Sessão de Treino da Tarefa de Reconhecimento do Objeto Novo

A análise de variância de Kruskal-Wallis indicou que não houve diferença significativa entre as sessões de treino dos animais que receberam solução veículo e as dos animais que receberam morina nas doses de 5,0mmol/Kg e 50mmol/Kg 96 horas antes da sessão de treino da tarefa.

Pelo teste de Wilcoxon foi comparado o índice de reconhecimento da sessão de treino com os índices de reconhecimento da sessões de teste dentro dos grupos, indicando que os

animais que receberam morina, nas doses 5,0mmol/Kg e 50,0mmol/Kg, apresentaram um bloqueio completo de memória de curta duração (90 minutos após o treino) e longa duração (24 horas após o treino), pois não demonstraram preferência pelo objeto novo nas sessões de teste (fig. 1).

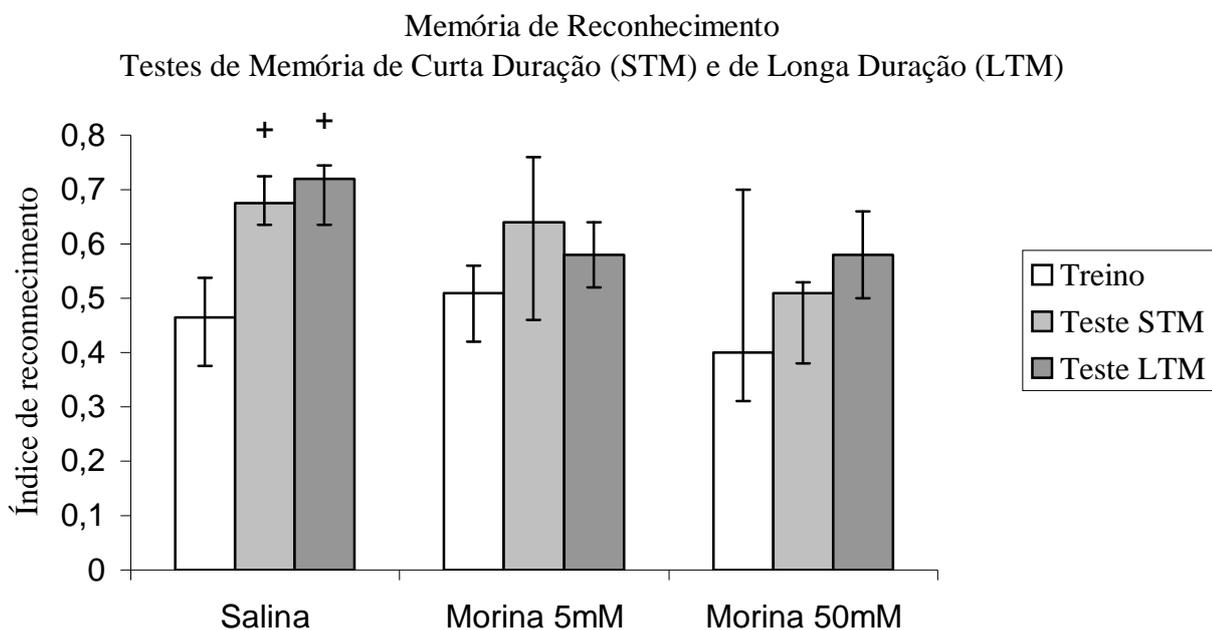


Figura 1 . Efeito da administração aguda de morina 96 horas antes da sessão de treino sobre a memória de reconhecimento. O teste de retenção de memória de curta duração (STM) foi realizado 90 minutos após o treino; o teste de retenção de memória de longa duração (LTM) foi realizado 24 horas após o treino. Os dados estão expressos através da mediana e intervalos interquartis, n=12-15 animais por grupo. As diferenças entre as sessões de treino e teste de cada grupo, foram avaliadas pelo teste de Wilcoxon, estando indicadas através de: + $P \leq 0,04$.

A análise de variância de uma via (ANOVA) mostra que o tempo total de exploração dos objetos durante a sessão de treino na tarefa de reconhecimento do objeto novo foi diferente estatisticamente entre os grupos que receberam solução veículo e os grupos que receberam morina (Tabela 1).

Tabela 1. Tempo total de exploração de ambos os objetos na sessão de treino na tarefa de reconhecimento do objeto novo em ratos que receberam morina nas doses de 5,0mmol/Kg e 50,0mmol/Kg 96 horas antes da sessão de treino.

Grupo	Tempo total de exploração de ambos os objetos durante a sessão de treino (s)*
Salina (n=12)	22,17 ± 5,7+
Morina 5,0mmol/Kg (n=15)	32,62 ± 13,89
Morina 50,0mmol/Kg (n=15)	34,73 ± 10,58

Legenda: * dados expressos como Média ± Erro Padrão. As diferenças no tempo total de exploração de ambos os objetos na sessão de treino na tarefa de reconhecimento do objeto novo em ratos que receberam morina, nas doses de 5,0mmol/Kg e 50,0mmol/Kg, 96 horas antes da sessão de treino estão indicadas através de + $p \leq 0,02$

Assim, verificou-se que a administração aguda de morina nas doses de 5,0mmol/Kg e 50,0mmol/Kg 96 horas antes da sessão de treino da tarefa de reconhecimento do objeto novo foi amnésica para a memória de reconhecimento de curta e de longa duração.

4.1.2 Efeitos da Administração Aguda de Morina Imediatamente após a Sessão de Treino da Tarefa de Reconhecimento do Objeto Novo

A análise de variância de Kruskal-Wallis indicou que não houve diferença significativa entre as sessões de treino dos animais que receberam solução veículo e dos animais que receberam morina nas doses de 5,0mmol/Kg e 50mmol/Kg imediatamente após a sessão de treino da tarefa .

O teste de Wilcoxon comparou o índice de reconhecimento da sessão de treino e o índice de reconhecimento da sessão de teste dentro dos grupos indicando que a morina

administrada na dose de 5mmol/Kg apresentou efeito amnésico na memória de curta e de longa duração, enquanto que a morina administrada na dose de 50mmol/Kg apresentou efeito amnésico apenas na memória de longa duração (fig.2).

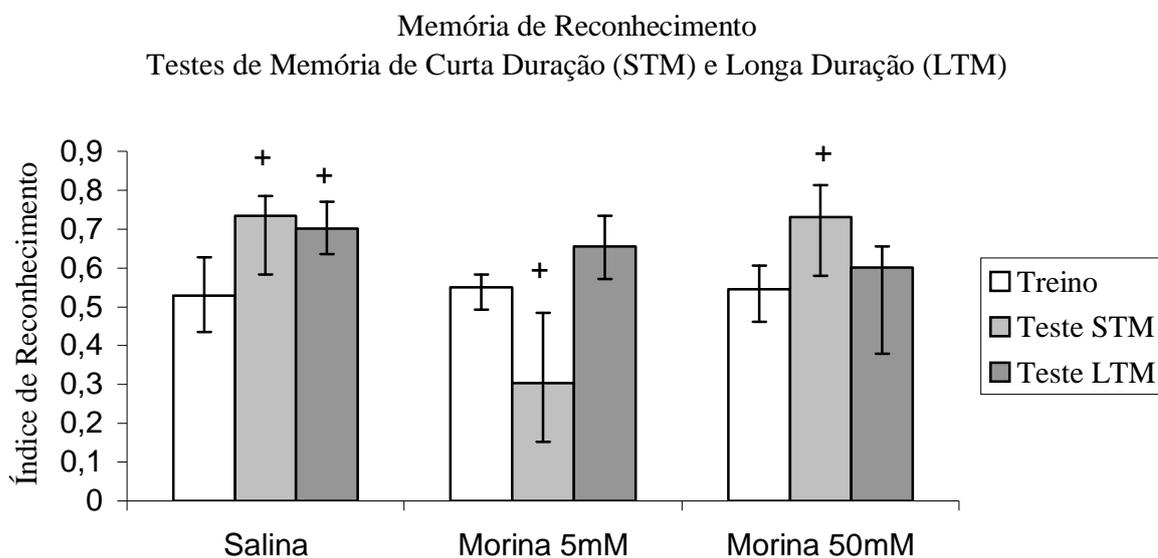


Figura 2 . Efeito da administração aguda de morina imediatamente após a sessão de treino sobre a memória de reconhecimento. O teste de retenção de memória de curta duração (STM) foi realizado 90 minutos após o treino; o teste de retenção de memória de longa duração (LTM) foi realizado 24 horas após o treino. Os dados estão expressos através da mediana e intervalos interquartis, n=12-15 animais por grupo. As diferenças entre as sessões de treino e teste de cada grupo, foram avaliadas pelo teste de Wilcoxon, estando indicadas através de: + P≤ 0,04.

A análise de variância de uma via (ANOVA) mostrou que o tempo total de exploração dos objetos durante a sessão de treino da tarefa comportamental não foi diferente estatisticamente entre o grupo controle e os grupos que receberam morina nas doses de 5,0mmol/kg e 50,0mmol/Kg (Tabela 2).

Tabela 2. Tempo total de exploração de ambos os objetos na sessão de treino na tarefa de reconhecimento do objeto novo em ratos adultos que receberam morina nas doses de 5,0mmol/Kg e 50,0mmol/Kg imediatamente após a sessão de treino.

Grupo	Tempo total de exploração de ambos os objetos durante a sessão de treino (s)*
Salina (n=12)	23,90 ± 14,17
Morina 5,0mmol/Kg (n=12)	21,59 ± 6,20
Morina 50,0mmol/Kg (n=12)	27,25 ± 6,84

Legenda: * dados expressos como Média ± Erro Padrão.

Verificou-se que a administração de morina na dose de 5mmol/Kg, imediatamente após a sessão de treino da tarefa de reconhecimento do objeto novo, gerou um efeito amnésico sobre a memória de curta e longa duração. Entretanto, a administração de morina na dose de 50,0mmol/Kg bloqueou apenas a memória de reconhecimento de longa duração.

4.2 Efeitos da Administração Aguda de Morina sobre a Memória de Esquiva Inibitória em Ratos Adultos

Para avaliar os efeitos da administração aguda de morina sobre a memória de esquiva inibitória, os animais submetidos à tarefa comportamental receberam morina nas doses de 5,0mmol/Kg e 50,0mmol/Kg em dois diferentes tempos: 30 minutos antes da sessão de treino e imediatamente após a sessão de treino da tarefa e morina na dose de 50,0mmol/Kg 96 horas antes da sessão de treino da tarefa.

4.2.1: Efeitos da Administração Aguda de Morina 96 Horas Antes da Sessão de Treino da Tarefa de Esquiva Inibitória

O teste U de Mann-Withney indicou que não houve diferença significativa entre as sessões de treino dos animais que receberam solução veículo e dos animais que receberam morina na dose de 50mmol/Kg 96 horas antes da sessão de treino da tarefa.

O teste de Wilcoxon comparou as latências de descida da plataforma da sessão de treino com as latências de descida da plataforma das sessões de teste dentro dos grupos,

indicando que os animais que receberam morina não apresentaram qualquer déficit de memória de longa duração (24 horas após o treino), pois houve uma diferença significativa entre as latências de descida da plataforma ($p \leq 0,001$) como podemos observar na figura 3.

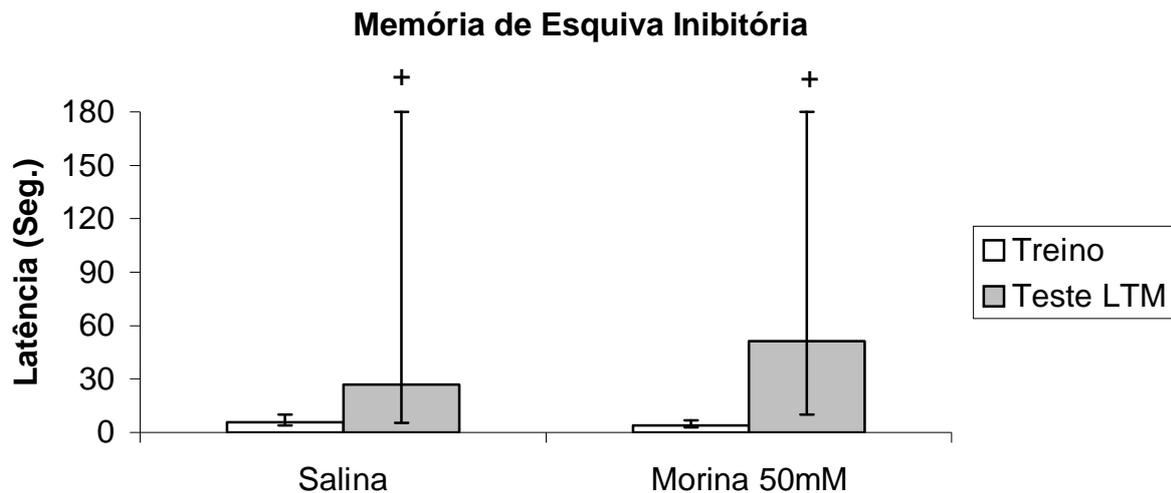


Figura 3. Efeito da administração aguda de morina 96 horas antes da sessão de treino sobre a memória de esquiva inibitória. O teste de retenção de memória de longa duração (LTM) foi realizado 24 horas após o treino. A latência é o tempo que o animal levou para descer da plataforma. Os dados estão expressos através da mediana e intervalos interquartis, $n=13-15$ animais por grupo. As diferenças entre os grupos que receberam morina e o grupo controle estão indicadas através de: (+ $p \leq 0,001$ para o teste de Wilcoxon) e demonstram que não houve déficits de memória.

Assim, verificou-se que a administração aguda de morina na dose de 50,0mmol/Kg 96 horas antes da sessão de treino da tarefa de esquiva inibitória não foi causou déficits de memória de longa duração.

4.2.2 Efeitos da Administração Aguda de Morina 30 minutos Antes da Sessão de Treino da Tarefa de Esquiva Inibitória

O teste U de Mann-Withney indicou que não houve diferença significativa entre as sessões de treino dos animais que receberam solução veículo e dos animais que receberam morina na dose de 50mmol/Kg 30 minutos antes da sessão de treino da tarefa.

O teste de Wilcoxon comparou as latências de descida da plataforma da sessão de treino com as latências de descida da plataforma das sessões de teste dentro dos grupos, indicando que os animais que receberam morina em ambas as doses não apresentaram qualquer déficit de memória de longa duração (24 horas após o treino), visto que, houve uma diferença significativa entre as latências de descida da plataforma como podemos observar na figura 4.

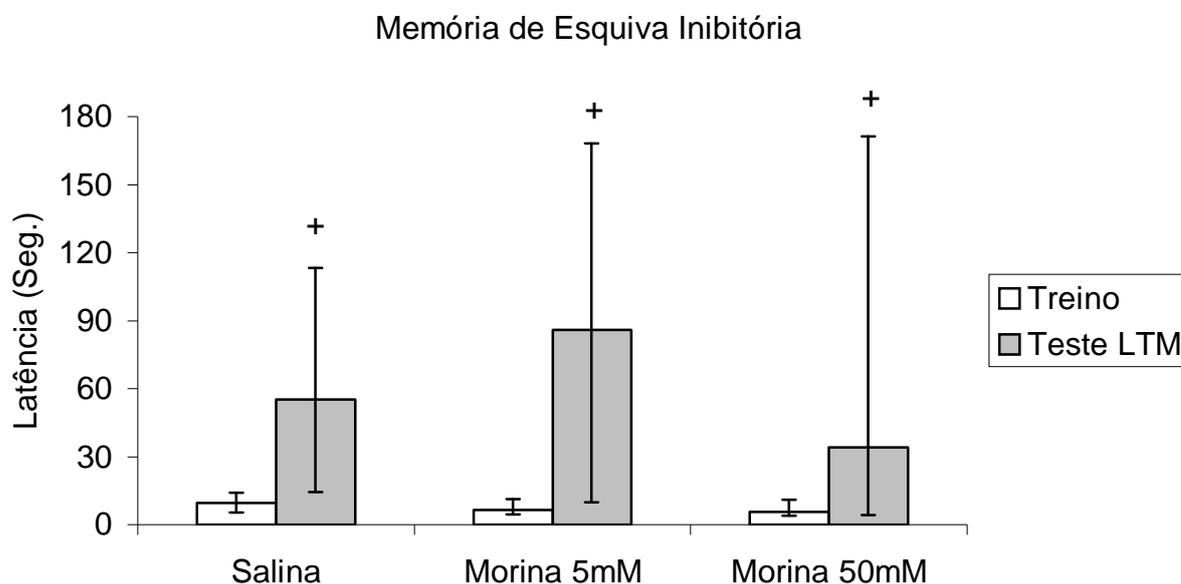


Figura 4. Efeito da administração aguda de morina 30 minutos antes da sessão de treino sobre a memória de esquiva inibitória. O teste de retenção de memória de longa duração (LTM) foi realizado 24 horas após o treino. A latência é o tempo que o animal levou para descer da plataforma. Os dados estão expressos através da mediana e intervalos interquartis, n=08-10 animais por grupo. As diferenças entre os grupos que receberam morina e o grupo controle estão indicadas através de: (+ $p \leq 0,04$ para o teste de Wilcoxon) e demonstram que não houve déficits de memória.

Assim, verificou-se que a administração aguda de morina nas doses de 5,0mmol/Kg e 50,0mmol/Kg 30 minutos antes da sessão de treino da tarefa de esquiva inibitória não causou déficits de memória de longa duração.

4.2.3 Efeitos da Administração Aguda de Morina Imediatamente após a Sessão de Treino da Tarefa de Esquiva Inibitória

A análise de variância de Kruskal-Wallis indicou que não houve diferença significativa entre as sessões de treino dos animais que receberam solução veículo e dos animais que receberam morina nas doses de 5,0mmol/Kg e 50mmol/Kg imediatamente após a sessão de treino da tarefa.

O teste de Wilcoxon comparou as latências de descida da plataforma da sessão de treino com as latências de descida da plataforma das sessões de teste dentro dos grupos, indicando que os animais que receberam morina em ambas as doses não apresentaram qualquer déficit de memória de curta duração ou longa duração, tendo se verificado que houve uma diferença significativa entre as latências de descida da plataforma como podemos observar na figura 5.

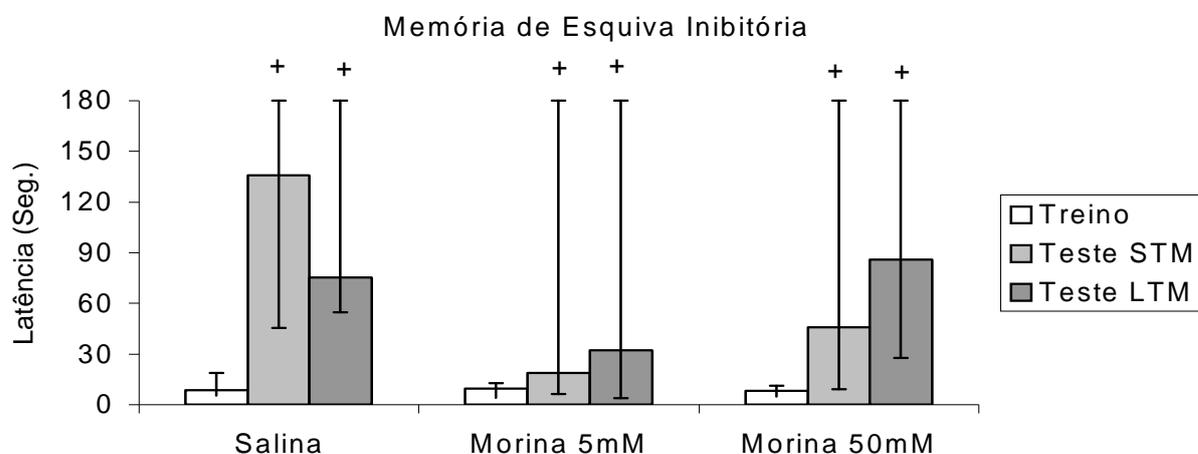


Figura 5. Efeito da administração aguda de morina imediatamente após a sessão de treino sobre a memória de esquiva inibitória. O teste de retenção de memória de curta duração (STM) foi realizado 90 minutos após o treino e o de longa duração (LTM) foi realizado 24 horas após o treino. A latência é o tempo que o animal levou para descer da plataforma. Os dados estão expressos através da mediana e intervalos interquartis, n=08-10 animais por grupo. As diferenças entre os grupos que receberam morina e o grupo controle estão indicadas através de: (+ $p \leq 0,05$ para o teste de Wilcoxon) e demonstram que não houve déficits de memória.

Assim, verificou-se que a administração aguda de morina em ambas as doses (5,0mmol/Kg e 50,0mmol/Kg) imediatamente após a sessão de treino da tarefa de esquiva inibitória não causou déficits de memória curta duração ou longa duração.

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Ao realizar a análise dos resultados obtidos no presente estudo ficou evidente o efeito diferenciado que a morina apresentou sobre o desempenho dos animais nas tarefas de memória de reconhecimento do objeto novo e esQUIVA inibitória: este flavonóide promoveu um bloqueio completo da STM e LTM da memória de reconhecimento, em praticamente todos os tempos e as doses de administração (a única exceção foi a dose de 50mmol/Kg injetada imediatamente pós-treino, que não causou prejuízo a STM), não promovendo alterações significativas em nenhuma dose e tempo de aplicação sobre a memória da tarefa de esQUIVA inibitória.

Considerando-se os efeitos da morina verificados, as diferenças observadas nos resultados das duas tarefas comportamentais poderiam ser explicadas através das diferentes demandas destes testes de memória.

A tarefa de esQUIVA inibitória apresenta caráter aversivo e envolve aprendizado associativo, uma vez que o animal deve evitar o choque nas patas. Por outro lado, a tarefa de reconhecimento do objeto novo é uma tarefa de caráter não aversivo que envolve aprendizado não associativo^(39,42). Portanto, é provável que os mecanismos subjacentes ao estabelecimento destes dois tipos de memória sejam distintos, resultando numa “vulnerabilidade” diferenciada frente aos efeitos da morina.

Embora já exista uma boa compreensão das rotas bioquímicas, circuitos neurais e processos modulatórios envolvidos no estabelecimento da memória da esquia inibitória^(39,43), os conhecimentos relativos as bases moleculares e estruturas nervosas subjacentes à memória de reconhecimento do objeto são pouco conhecidas⁽³⁹⁾. Entretanto, sabe-se que uma estrutura comum a estes dois tipos de memória é o hipocampo^(39,42). Assim, se considerarmos que a modulação da aquisição e das fases iniciais da consolidação de memórias processadas no hipocampo, em tarefas aversivas, é responsável por distinguir as memórias com maior carga emocional das demais e fazer com que as primeiras sejam melhor gravadas⁽³⁹⁾, pode-se levantar a hipótese de que os possíveis efeitos da morina sobre esta estrutura sejam minimizados ou neutralizados pelo efeito facilitador que a amígdala promove na mesma. Como o reconhecimento do objeto novo é uma tarefa não aversiva, esta facilitação hipocampal pela amígdala estaria ausente.

Uma vez que foram observadas diferenças significativas no tempo total de exploração dos objetos dos animais que receberam as injeções de morina pré-treino, torna-se necessário considerar que esta substância poderia estar atuando sobre outros aspectos funcionais do Sistema Nervoso Central, como na atividade locomotora e exploratória, motivação, ansiedade ou aspectos sensoriais.

Neste contexto, é importante ressaltar que as duas tarefas comportamentais provavelmente apresentem sensibilidades diferenciadas a interferência destes aspectos neurocomportamentais⁽⁴⁹⁾, sendo este um dos fatores que poderia contribuir para os resultados diferenciados do desempenho dos animais nas duas tarefas realizadas. Entretanto, mesmo que a morina apresente efeitos sobre estes outros aspectos comportamentais, é provável que ela atue sobre mecanismos diretamente envolvidos na memória, uma vez que a morina injetada pós-treino não provocou alterações no tempo total de exploração dos objetos, mas prejudicou o desempenho dos animais nas sessões de teste.

Adicionalmente, a administração de morina na dose de 50mmol/Kg pós-treino foi amnésica somente na LTM, ou seja, a aquisição e os mecanismos da STM foram integralmente preservados, indicando que o prejuízo da LTM estaria relacionado a mecanismos envolvidos especificamente na consolidação da memória de longa duração.

De acordo com o exposto até o momento, percebe-se a necessidade de estudos adicionais utilizando tarefas comportamentais específicas para avaliação dos efeitos da morina sobre aspectos motores, sensoriais e exploratórios dos animais, até porque a literatura evidencia uma ampla gama de ações farmacológicas dos flavonóides, entre as quais efeitos sobre atividade locomotora ⁽⁵⁰⁾.

Embora os resultados obtidos até o momento indiquem que a morina pode interagir com os mecanismos envolvidos no estabelecimento da memória de reconhecimento, somente com a realização destes estudos adicionais será possível definir o grau de impacto da morina sobre este tipo de memória. É importante salientar que a maior parte dos estudos relacionados aos efeitos dos flavonóides sobre aspectos cognitivos mostra efeitos benéficos dos mesmos ^(22,23,27), os quais tem sido relacionados principalmente com o potencial antioxidante e possível papel neuroprotetor destes compostos. Trabalhos evidenciando prejuízo de aspectos cognitivos ocasionados por flavonóides são muito mais raros, principalmente no que diz respeito especificamente à memória. Neste contexto, Salgueiro et al demonstraram que a quercitina promove amnésia anterógrada na tarefa da esquivia inibitória, não apresentando efeitos sobre a tarefa de habituação ⁽⁵⁰⁾.

Como existem indícios dos efeitos da morina sobre a memória de reconhecimento, torna-se relevante estabelecer relações entre os efeitos conhecidos da morina em eventos bioquímicos e fisiológicos do organismo e aqueles envolvidos na memória. Desta forma, torna-se possível vislumbrar aspectos a serem abordados futuramente com o objetivo de elucidar os mecanismos pelos quais a morina poderia estar prejudicando a memória de

reconhecimento do objeto novo. O estabelecimento destas relações torna-se ainda mais importante se considerarmos que a tarefa de reconhecimento do objeto novo pode ser facilmente correlacionada com tarefas de memória de reconhecimento em humanos, que são amplamente utilizadas em testes cognitivos para a avaliação de síndromes amnésicas^(39,42).

Como anteriormente citado na revisão da literatura, os efeitos dos flavonóides sobre diversos aspectos fisiológicos e bioquímicos do organismo dependem do tipo de substância, da concentração usada e de sua via de aplicação^(20,21,29,30,31,32). Esta observação aplica-se também ao caso específico da morina que, a exemplo de vários outros compostos de sua classe, pode apresentar tanto efeitos anti como pró-oxidantes, dependendo da dose a que o tecido é submetido⁽³⁴⁾. Por um lado, a capacidade de proteção da morina contra a ação de radicais livres em vários tipos de células está amplamente documentado. Por outro lado, seus efeitos pró-oxidantes já foram demonstrados em experimentos in vitro utilizando cultura de linfócitos⁽³⁴⁾.

Yen GC et al⁽³⁴⁾, sugerem que a morina induz a produção de superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e está relacionada a menor viabilidade de linfócitos em cultura, induz danos ao DNA e peroxidação lipídica nos mesmos e é capaz de inibir a glutathione redutase.

Em relação ao efeito de substâncias pró e antioxidantes no sistema nervoso, é importante ressaltar que o estresse oxidativo é considerado um fator de risco na incidência de declínios cognitivos, que ocorrem durante o envelhecimento normal além de estar envolvido em vários processos neurodegenerativos como a Doença de Alzheimer^(5,27). Fatores pró-oxidantes poderiam interferir em diversos aspectos da função neuronal, prejudicando os mecanismos envolvidos no estabelecimento da memória. Estudos sugerem que os flavonóides possuem importante papel na prevenção da neurodegeneração, especialmente nos declínios cognitivos relacionados com a idade^(51,52,53).

O tratamento crônico ou subcrônico com uma variedade de antioxidantes, entre os quais os flavonóides, protege contra o estresse oxidativo e o declínio do aprendizado e da memória em ratos⁽⁵⁾. Da mesma forma, investigações realizadas em humanos demonstraram efeitos positivos destas substâncias na função cognitiva e memória de idosos saudáveis bem como em pacientes com Doença de Alzheimer associada à demência^(51,52,53).

Se, a partir do exposto acima, interpretar-se os resultados do presente trabalho procurando relacioná-los com os efeitos conhecidos da morina no estresse oxidativo e a relação deste com aspectos cognitivos, poderia ser levado a considerar a possibilidade de que as alterações no desempenho da tarefa de reconhecimento do objeto seriam resultantes de um efeito pró-oxidante da morina sobre o sistema nervoso. Entretanto, é pouco provável que esta seja a explicação (ou a única explicação) dos prejuízos de memória observados, uma vez que os danos ocasionados pelos radicais livres promovem alterações muito mais abrangentes⁽⁵⁴⁾ nas células do que a interação com mecanismos especificamente envolvidos na memória. Portanto, se as concentrações de morina utilizadas estivessem gerando dano oxidativo esperar-se-ia que os animais apresentassem prejuízo da memória nas duas tarefas comportamentais, pois altos níveis de ROS geram efeitos tóxicos na transmissão sináptica, além de inibirem a LTP no hipocampo⁽⁵⁴⁾.

Um outro tipo de abordagem que leva a relacionar efeitos conhecidos da morina com mecanismos envolvidos no estabelecimento da memória, diz respeito a interferência deste flavonóide no metabolismo de fosfoinosítídeos, lipídeos fisiologicamente importantes na regulação de processos celulares⁽¹⁹⁾, e o papel destes na memória. Estudos sugerem que os efeitos antitumorais da morina seriam resultantes da inibição da PIPK (fosfatidilinositolfosfato quinase), uma enzima envolvida na transdução de sinais intracelulares⁽¹⁹⁾. Entretanto, este efeito inibitório sobre a PIPK é observado também em células sadias do sistema nervoso central, onde poderia vir a promover prejuízos sobre a

memória, uma vez que a PIPK está envolvida na fosforilação sequencial de PI em PIP e PIP₂, respectivamente ⁽¹⁹⁾.

A PIP₂ (fosfatidilinositol-4-5-bifosfato) está envolvida nos mecanismos relacionados ao estabelecimento de vários tipos de memória ⁽¹⁹⁾, pois provavelmente participa da transdução de sinal em vários níveis. Primeiramente, a PIP₂ gera dois segundos mensageiros, o IP₃ (inositol-1,4,5-trifosfato), um mobilizador de Ca⁺⁺, e o DG (diaglicerol) que, por sua vez, é o responsável pela ativação da PKC⁽¹⁹⁾. Uma queda gradual e contínua da PIPK, geraria, conseqüentemente, queda de PIP₂ e atividade PKC, enzima necessária na ativação do processo de formação da memória de curta duração (STM) e na memória de longa duração (LTM).^(19,39,43)

Estudos mostram que a PKC é essencial para a aquisição de memória de curta e longa duração em tarefas aversivas de aprendizado associativo, como a tarefa de esQUIVA inibitória, em diversas tarefas que envolvem medo condicionado, em que os animais são treinados pela exposição reiterada e prolongada a um estímulo condicionado determinado (som, luz) ou indeterminado (ambiente)^(55,56), e em tarefas de aprendizagem espacial, como o labirinto aquático de Morris ⁽⁵⁶⁾.

Cheng, ⁽¹⁹⁾ demonstrou que a morina administrada intraperitonealmente foi capaz de diminuir o nível da atividade da PIPK em extratos de cérebros de ratos. O decréscimo da atividade parece ser dependente da dose administrada. A uma concentração de 10mmol/Kg não foram observadas mudanças na atividade da PIPK; a uma concentração de 30mmol/KG, foi observado 40% de decréscimo na atividade desta enzima; a uma concentração de 90mmol/Kg ocorreu uma queda ainda maior na atividade enzimática. Neste estudo a queda da atividade da PIPK mostrou-se tempo-dependente, pois é observada uma queda gradual e contínua da atividade enzimática ao longo de 4 dias. Portanto, considerando-se estas

informações, poderíamos supor que o efeito amnésico da morina poderia estar relacionado, pelo menos em parte, a depressão na atividade da PIPK e, conseqüentemente, da PKC.

Entretanto, como anteriormente mencionado, os mecanismos bioquímicos subjacentes ao estabelecimento deste tipo de memória, inclusive no que diz respeito à necessidade da participação da PKC, ainda não foram devidamente elucidados. Adicionalmente, seria de se esperar que uma queda importante na atividade da PKC, resultante da aplicação de morina, promovesse amnésia também na esquivia inibitória, já que estudos utilizando inibidores da PKC, infundidos no hipocampo 30 minutos após o treino, demonstram efeitos amnésicos irreversíveis nesta tarefa.

Portanto, torna-se relevante a realização de trabalhos futuros que procurem elucidar estes aspectos. Mas, mesmo que a morina estivesse agindo pela via da PKC para produzir os prejuízos de memória observados, é preciso considerar que os flavonóides são substâncias que apresentam efeitos sobre outras cascatas bioquímicas que também são importantes para o estabelecimento da memória.

Estudos sugerem que a capacidade dos flavonóides em prevenir desordens neurológicas talvez esteja relacionada com a sua capacidade de facilitar a modulação intracelular da cascata bioquímica da proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK) que, além de estar envolvida no processo de formação da memória, é responsável pela sobrevivência e morte neuronal durante o desenvolvimento e envelhecimento do sistema nervoso central, bem como por doenças neurodegenerativas⁽³⁰⁾.

Além disso, o fato de que a PKC e a MAPK não estimulam vias de sinalização completamente independentes uma da outra, mas funcionam como uma “rede” na qual as rotas bioquímicas, estimuladas por estas duas enzimas, apresentam pontos de interação em diferentes momentos do processamento da memória, deixando claro que a interferência na

atividade de uma destas enzimas pode promover alterações bastante profundas em diferentes aspectos relacionados aos mecanismos subjacentes à memória⁽⁵⁷⁾.

Portanto, as rotas bioquímicas, nas quais a PKC e a MAPK estão envolvidas, podem ser encaradas como um alvo bastante efetivo para o efeito de diversas substâncias exógenas, entre as quais encontram-se os flavonóides. Neste contexto sugerimos que a interação entre a morina, PKC, MAPK e memória é um aspecto relevante a ser analisado futuramente.

Em resumo, o presente trabalho demonstrou que a morina é capaz de alterar o desempenho dos animais na tarefa de memória de reconhecimento do objeto novo, ao contrário do que foi observado na tarefa de esquiva inibitória, onde o flavonóide sob investigação não promoveu alterações nas sessões de teste. Conclui-se, portanto, que a morina é capaz de produzir amnésia nas doses de 5 e 50mmol/Kg quando injetada 96 horas antes ou imediatamente após o treino da tarefa de memória de reconhecimento do objeto novo. Adicionalmente, este composto mostrou-se capaz de interferir em mecanismos envolvidos no estabelecimento da memória de curto e longo prazo desta tarefa comportamental.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ Camarano A A . Envelhecimento da População Brasileira: Uma Contribuição Demográfica. In: Tratado de Geriatria e Gerontologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p. 58-71.
- ² Arking R. Biology of Aging: Observations and Principles. 2 ed. Massachusetts: Sinauer Associates Publishers; 1998.
- ³ Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. American Physiological Society 2002; 47-95.
- ⁴ Piccoli JCE, Trois RLS, Jeckel-Neto EA. Morina e Quercitina: possíveis efeitos no processo de envelhecimento. Revista de Medicina da PUCRS 2002; 12/2: 155-161.
- ⁵ Liu R, Liu IY, Bi X, Thompson RF, Doctrow SR, Malfroy B, Baudry M. Reversal of age-related learning déficits and brain oxidative stress in mice with superoxide dismutase/catalase mimetics. PNAS 2003; 100(14): 8526-8531.
- ⁶ Funcional foods: position of the American Dietetic Association. J AM Diet Assoc 1999;99:1278-1285.
- ⁷ Jeckel-Neto EA, Cunha GL. Teorias Biológicas do Envelhecimento. In: Tratado de Geriatria e Gerontologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p.13-19.
- ⁸ Wickens AP. The causes of aging. Preston: Hardwood Academic Publishers; 1998.
- ⁹ Hart RW, Turturro A Theories of Aging. In: Rothstein M, editor. Review of Biological Research in Aging. New York: Liss AR; 1983. p.5-18.

-
- ¹⁰ Hayflick L. Como e porque envelhecemos. Rio de Janeiro: Campus, 1996.
- ¹¹ Finch CE. Longevity, Senescence and the Genome. Chicago: University of Chicago Press; 1990.
- ¹² Masoro EJ. How Aging Occurs. In: Challenges of Biological Aging. New York: Springer; 1999. p.47-73.
- ¹³ Yu BP, Yang R. Critical evaluation of the free radical theory of aging. Ann N Y Sci 1996;46(6):1-11.
- ¹⁴ Mates JM, Pérez-Gómez C, Castro IN. Antioxidant Enzymes and Human Diseases. Clinical Biochemistry 1999; 32(8):595-603.
- ¹⁵ Tiwari AK. Imbalance in antioxidant defence and human diseases: Multiple approach of natural antioxidants therapy. Current Science 2001; 81(9): 1179-1187.
- ¹⁶ Carvalho D, Bruscato N, Nascimento JC, Schwanke CHA, Heuser E, Cruz IBM. Alimentos funcionais: substâncias bioativas que atuam na promoção de saúde. R Med PUCRS 2003; 13(4):428-439.
- ¹⁷ Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Resolução nº18, de 30 de abril de 1999 (republicada em 03/12/1999) e Resolução nº 19, de 30 de abril de 1999 (republicada em 10/12/1999). Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/18-99.htm> e <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/19-99.htm>.
- ¹⁸ Masoro EJ. Possible interventions to retard aging. In: Challenges of biological aging. New York: Springer, 1999. p.171-187.
- ¹⁹ Cheng CHK. In vitro and in vivo inhibitory actions of morin on rat brain phosphatidylinositolphosphate kinase activity. Life Sciences 1997; 61:2035-2047.
- ²⁰ Wu TW, Fung KP, Zeng LH et al. Molecular properties and myocardial salvage effects of morin hydrate. Biochem Pharmacol 1995;49:537-543.

-
- ²¹ Wu TW, Fung Kp et al. Antioxidation of human low density lipoprotein by morin hydrate. *Life Sci* 1995; 57: 51-56.
- ²² Nijveldt RJ et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Society for Clinical Nutrition* 2001; 74: 418-425.
- ²³ Wang HK. The therapeutic potential of flavonoids. *Expert Opin Investig Drugs* 2000; 9(9): 2103-2119.
- ²⁴ Suzuki M, Wilcox BJ, Wilcox CD. Implications from and food cultures for cardiovascular diseases: longevity. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2001; 10(2): 165-171.
- ²⁵ Jiang F, Jones GT, Husband AJ, Dusting GJ. Cardiovascular protective effects of synthetic isoflavone derivatives apolipoprotein e-deficient mice. *J Vasc Res.* 2003; 40(3): 276-284.
- ²⁶ Hertog MGL, Feskens EJM et al. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Eldery Study. *Lancet* 1993; 342: 1007-1011.
- ²⁷ Bastianetto S, Quirion R. Natural extracts as possible agents of brain aging. *Neurobiol Aging* 2002; 23(5): 891-897.
- ²⁸ Yodanis KA, Spencer JP, Schroeter H, Rice-Evans C. Dietary flavonoids as potential neuroprotectants. *Biol Chem* 2002; 383(3-4): 503-519.
- ²⁹ Kok LDS, Wong YP, Wu TW et al. Morin hydrate: a potential antioxidant in minimizing the free-radicals-mediated damage to cardiovascular cells by anti-tumor drugs. *Life Sci* 2000; 67:91-99.
- ³⁰ Schroeter H, Boyd C et al. MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and nitric oxide. *Neurology of Aging* 2002; 23: 861-880.
- ³¹ Sahu SC, Gray GC. Lipid peroxidation and DNA damage induced by morin and naringenin in isolated rat liver nuclei. *Food Chem Toxicol* 1997; 35: 443-447.

-
- ³² Sujihara N, Arakawa T, Ohnishi M et al. Anti and pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with alpha-linolenic acid. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 1313-1323.
- ³³ Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. *Neurociências. Desvendando o sistema nervoso*. 2 ed. Artmed, 2002.
- ³⁴ Yen GC, Duh PD, Tsai HL, Huang SL. Pro-oxidative Properties of Flavonoids in Human Lymphocytes. *Biosci Biotechnol Biochem* 2003; 67(6): 1215-1222.
- ³⁵ Silva RH et al. Role of hippocampal oxidative stress in memory deficits induced by sleep deprivation on mice. *Neuropharmacology* 2004; 46: 895-903.
- ³⁶ Yassuda MS. Memória e Envelhecimento Saudável. In: *Tratado de Geriatria e Gerontologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p. 914-920.
- ³⁷ Squire LR, Kandel ER. *Memória: da mente às moléculas*. Trad. Carla Dalmaz e Jorge A Quillfeldt. Porto Alegre: Artmed, 2003.
- ³⁸ Carlson NR. *Physiology of behaviour*. Boston: Allyn and Bacon, 1991. Cap.15: Physiology and biochemistry of memory. p. 480-510.
- ³⁹ Izquierdo I. *Memória*. Porto Alegre: Artmed, 2002.
- ⁴⁰ Bromberg E. Envolvimento do NO, GMPc e PKA nos processos hipocâmpais subjacentes à consolidação da memória. Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia. Porto Alegre: UFRGS, 1994.
- ⁴¹ Foster TC. Involvement of hippocampal synaptic plasticity in age-related memory decline. *Brain Res Rev* 1999; 30: 236-249.
- ⁴² Schröder N, O'Dell SJ, Marshal JF. Neurotoxic methamphetamine regimen severely impairs recognition memory in rats. *Synapse* 2003; 49:89-96.
- ⁴³ McGaugh JL, Izquierdo I. The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. *Science* 2000; 21: 1467-1465.

-
- ⁴⁴ Raimundo MM. Os Deveres dos Pesquisadores para com os Animais de Experimentação: uma proposta de auto-regulamentação [dissertação]. Porto Alegre (RS): UFRGS; 2000. Disponível em <http://www.bioética.ufrgs.br/animdir.htm>
- ⁴⁵ Lima MNM, Laranja D, Izquierdo L, Bromberg E, Schroder N. Bupropion impairs long-term recognition memory In. XXI CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO LATINO-AMERICANA DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS (ALACF), 2003, Ribeirão Preto – SP. Anais do XXI do Congresso da ALACF, 2003, v.1.
- ⁴⁶ Lima MNM, Laranja D, Izquierdo L, Bromberg E, Schroder N. Effects of acute bupropion treatment on recognition memory in adult wistar rats In. XVIII Reunião da FESBE, 2003, Pinhais, Anais da XVIII Reunião da FESBE, 2003, v.1.
- ⁴⁷ Sokal RR, Rohlf FJ. The principles and practice of statistics in biological research. 2^oed.; New York: W.H. Freeman and company, 1980.
- ⁴⁸ De Luca RR. Manual para técnicos de bioterismo. São Paulo: FINEP; 1996.
- ⁴⁹ Roesler R, Schröder N, Vianna MR et al. Differential involvement of hippocampal and amygdalar NMDA receptors in contextual and aversive aspects of inhibitory avoidance memory in rats. Brain Res 2003; 975(1-2):207-13.
- ⁵⁰ Salgueiro JB et al. Anxiolytic Natural and Synthetic Flavonoid Ligands of the Central Benzodiazepine Receptor Have no Effect on Memory Tasks in Rats. Pharmacology Biochemistry and Behaviour 1997;58(4): 887-891.
- ⁵¹ Cockle SM, Kimbe S, Hindmarch I. The effects of Ginko Biloba extract (LI 1370) supplementation on activities of dayli living in free living older volunteers: a questionnaire survey. Hum Psychopharm Clin 2000; 15: 227-235.
- ⁵² Wesnes KA, et al. The memory enhancing effects of a Ginko Biloba/Panax ginseng combination in healthy middle-aged volunteers. Psychopharmacologia 2000; 152(4):353-361.

-
- ⁵³ Schroeter H, et al. MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiology of Aging* 2002; 23: 861-880.
- ⁵⁴ Watson JB, Khorasami, Persson A, Huang KP, Huang FL, O'Dell TJ. Age-Related Deficits in Long-term Potentiation Are Insensitive to Hydrogen Peroxide: Coincidence With Enhanced Autophosphorylation of Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II. *Journal of Neuroscience Research* 2002; 70: 298-308.
- ⁵⁵ Ahi J, Radulovic J, Spiess J. The role of hippocampal signaling cascades in consolidation of fear memory. *Behavioural Brain Research* 2004; 149: 17-31.
- ⁵⁶ Vianna MRM, et al. Role of hippocampal Signaling Pathways in Long-Term Memory and oxidant stress in aged female rat brains. *Neuroscience Letters* 2003; 353: 225-228.
- ⁵⁷ Roberson ED, et al. The mitogen-activated protein kinase cascade couples PKA and PKC to cAMP response element binding protein phosphorylation in area CA1 of hippocampus. *J. Neurosci.* 1999; 19: 4337-4348.