

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE GERIATRIA E GERONTOLOGIA

GABRIELA CARDOSO

**A PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA DOPAMINÉRGICO HIPOCAMPAL NA CONSOLIDAÇÃO E  
PERSISTÊNCIA DA MEMÓRIA ESPACIAL**

Porto Alegre  
2010

**DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)**

C268p Cardoso, Gabriela

A participação do sistema dopaminérgico hipocampal na consolidação e persistência da memória espacial / Gabriela Cardoso. Porto Alegre: PUCRS, 2010.

52 f.: il. gráf.

Orientador: Prof. Dr. Iván Antonio Izquierdo.  
Coorientador: Prof. Dr. Martín Pablo Cammarota.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Instituto de Geriatria e Gerontologia. Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica. Área de concentração: Neurociências.

1. DOPAMINA. 2. HIPOCAMPO. 3. MEMÓRIA. 4. APRENDIZAGEM. 5. RETENÇÃO. 6. EXTINÇÃO. 7. RATOS WISTAR. 8. MASCULINO. 9. EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. I. Izquierdo, Iván Antonio. II. Cammarota, Martín Pablo. III. Título.

C.D.D. 153.1  
C.D.U. 612.821.2:599.323.4(043.3)  
N.L.M. WK 725

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
IGG  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GERONTOLOGIA BIOMÉDICA

GABRIELA CARDOSO

**A PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA DOPAMINÉRGICO HIPOCAMPAL NA  
CONSOLIDAÇÃO E PERSISTÊNCIA DA MEMÓRIA ESPACIAL**

Porto Alegre

2010

GABRIELA CARDOSO

**A PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA DOPAMINÉRGICO HIPOCAMPAL NA  
CONSOLIDAÇÃO E PERSISTÊNCIA DA MEMÓRIA ESPACIAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica do Instituto de Geriatria e Gerontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Iván Izquierdo

Coorientador: Prof. Dr. Martín Cammarota

Porto Alegre

2010

Gabriela Cardoso

A PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA DOPAMINÉRGICO HIPOCAMPAL NA  
CONSOLIDAÇÃO E PERSISTÊNCIA DA MEMÓRIA ESPACIAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica do Instituto de Geriatria e Gerontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre.

Aprovada em \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2010.

**Banca Examinadora**

---

Profa. Dra. Denise Cantarelli Machado

---

Profa. Dra. Juliana Sartori Bonini

---

Profa. Dra. Carla Helena A Schwanke

Porto Alegre

2010

Dedico esta dissertação à minha mãe, Eliane Oscar Cardoso, a quem agradeço a minha vida, por seu amor, zelo constante e incondicional.

A meus irmãos, Tiago e Jailson, que sempre estiveram do meu lado.

Ao meu companheiro Ricardo, que faz parte da minha vida e que me apoiou nos momentos difíceis ao subir mais este degrau.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao meu orientador Iván Izquierdo e co-orientador Martín Cammarota por me terem aberto as portas do centro de memória, onde entendi que devemos ser parceiros de nossos sonhos.

Aos membros da banca, Denise Cantarelli Machado, Carla Helena A Schwanke, Juliana Sartori Bonini e demais revisores pela leitura e exame do presente trabalho. Muito obrigada

A Dra Janine por ter confiado na minha dedicação em aprender tudo sobre o centro de memória, desde a minha época de aluna de iniciação científica. Ainda me lembro bem o dia em que me entregaste as chaves do laboratório, uma prova de confiança que esta esperando. Muito obrigada

A Juliana e o Weber, que considero meus padrinhos no laboratório. Foi com eles que aprendi boa parte do que sei hoje no grupo. Obrigada Juju por tudo o que aprendi contigo e por sempre teres sido amiga. Obrigada Webersito, por tudo o que sei sobre o Water maze, pelas musiquinhas cômicas, pelas palhaçadas e parceria nos momentos de espírito crianceseiro.

A Jociane, carinhosamente apelidada de professorinha, por fazer sempre questão de ajudar nas horas de aperto. Obrigada pelo apoio e orientação durante todo o desenvolvimento desta dissertação, me sinto mais preparada para a próxima. Muito obrigada.

Aos demais colegas e amigos do centro de memória **Julia, Cristiane, Lia, Carolina, Siomara, Lucas, Natália, Fernando, Cristiano, Ramón, Pâmela, Clarice, Andressa** (vigarista) aos que compartilho a mais bonita definição da palavra amizade.

## **Canção do Amigo**

*Quando digo  
a palavra amigo  
minha alma abre os postigos.  
Amigo é um código  
sem artigos.  
É um sentimento  
tão mais recente  
quanto mais antigo.  
Amigo não chega  
na hora da colheita.  
Vem plantar o trigo.  
Amigo que é amigo  
desafia as leis do tempo  
e do espaço.  
Viaja no vento,  
longe,  
está contigo.  
E sua presença é doce  
como os figos.  
Amigo  
conhece as confidências  
do silêncio.  
Ao seu lado  
não há maus presságios,  
perigos.  
O mundo não pode  
te ferir,  
magoar,  
pois tens um amigo.  
E o seu abraço  
é um abrigo.*

**Luiz Coronel**

A Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul e ao departamento de gerontologia biomédica pela bolsa de estudos para a realização deste trabalho. Muito Obrigada

Ao programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica, Comissão coordenadora, corpo docente e toda sua equipe administrativa, Paulo Cesar Escoto Rodrigues, Cletiane Dias Rodrigues, Muito Obrigada.

Aos colegas da faculdade, Alice Beker, quem me apresentou ao grupo do centro de memória, Andressa Franco, Teresa Neta, Luciana Navarro, Gustavo Barrios, Raquel Schütz e todos os demais não citados. Muito obrigada pelos momentos felizes que passamos juntos na faculdade de biologia.

Ao meu pai Jair Germano Jung, pela minha educação e em parte, responsável pela pessoa que me tornei hoje.

A Dulce, minha prima, que me incentivou a continuar meus estudos. Muito Obrigada

## RESUMO

Várias evidências sugerem que o sistema dopaminérgico cerebral participa do processamento mnemônico. Contudo, o conhecimento sobre a plena contribuição deste sistema, particularmente na região hipocampal, nos processos de consolidação e persistência ainda precisam ser mais detalhados. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a participação do sistema dopaminérgico hipocampal na consolidação e persistência de memória espacial através da utilização do paradigma de labirinto aquático de Morris (LAM). Animais com implantação bilateral de cânulas na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados durante 5 dias na versão espacial do Labirinto Aquático de Morris (LAM). Os animais receberam a infusão de SCH23390 ou SKF38393 (40 nmol/lado) ou veículo (VEH) imediatamente ou 3 horas após a última sessão de treino. Os resultados mostram que a infusão de SCH23390, antagonista dopaminérgico D1-D5, na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos imediatamente, mas não 3 horas, após o treino na versão espacial do LAM prejudica a consolidação da memória para esta tarefa. Além disso, foi mostrado que a infusão de SKF38393, agonista D1-D5, na região CA1 do hipocampo dorsal imediatamente após o treino em uma versão espacial de aprendizado do LAM, embora não melhore a consolidação da memória para esta tarefa, promove a persistência do traço mnemônico adquirido ao longo dos dias. Juntos, esses resultados apontam para a participação do sistema dopaminérgico hipocampal na consolidação de memórias espaciais bem como para uma potencial modulação positiva na persistência do traço mnemônico armazenado.

**Palavras chave:** Dopamina; Consolidação; Extinção; Hipocampo; Memória; Persistência,

## ABSTRACT

Evidence suggests that the brain dopaminergic system participates in mnemonic processing. However, knowledge about the full contribution of this system, particularly in the hippocampal region in the processes of consolidation and persistence still need to be more detailed. The purpose of this study was to evaluate the participation of the dopaminergic system in the hippocampal consolidation and persistence of spatial memory by using the paradigm of the Morris water maze (LAM). Animals with bilateral implantation of cannulae in the CA1 region of the dorsal hippocampus were trained during 5 days in space version of the Morris water maze (LAM). The animals were infused with SCH23390 or SKF38393 (40 nmol / side) or vehicle (VEH) immediately or 3 hours after the last training session. The results show that infusion of SCH23390, dopamine D1 antagonist-D5, the CA1 region of the dorsal hippocampus of rats immediately but not 3 hours after training in the spatial version of LAM affect memory consolidation for this task. Furthermore, it was shown that the infusion of SKF38393, D1-D5 agonist in CA1 region of the dorsal hippocampus immediately after training in a spatial learning version of LAM, but does not enhance the consolidation of memory for this task, promotes the persistence of mnemonic trace acquired over the days. Together, these results point to the involvement of the hippocampal dopaminergic system in the consolidation of spatial memories as well as a potential upregulation in the persistence of trace mnemonic stored.

**Keywords:** Dopamine; Consolidation; Extinction; Hippocampus; Memory; Persistence.

## LSTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Foto de um animal sendo submetido à cirurgia estereotáxica. ....	22
Figura 2 - Vista geral da sala do LAM do Centro de Memória.....	24
Figura 3 - Fotografia de um rato sobre a plataforma de escape no LAM .....	25
Figura 4 - Infusão de fármacos através das cânulas-guia.....	27
Figura 5 - Desenho esquemático do cérebro de rato mostrando o local de implantação das cânulas de infusão na região CA1 do hipocampo dorsal.....	29
Figura 6 - Efeito do antagonista dopaminérgico D1 (SCH23390), infundido 0 min ou 3 horas após a última sessão de treino, sobre a consolidação da Memória espacial. ....	31
Figura 7- Efeito do agonista dopaminérgico D1 (SKF38393) infundido imediatamente pós-treino sobre a perdurabilidade da Memória espacial. ....	33
Figura 8 - Efeito do agonista dopaminérgico D1 (SKF38393) infundido 3 horas pós-treino sobre a perdurabilidade da Memória espacial.....	34
Figura 9 - Efeito do agonista dopaminérgico D1 (SKF38393), infundido imediatamente após a última sessão de treino, sobre a extinção da Memória espacial.....	36
Figura 10 - Efeito do agonista dopaminérgico D1 (SKF38393), infundido 3 horas após a última sessão de treino, sobre a extinção da Memória espacial.. ....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS

CA1 - Corno de Amon 1

CE - Córtex Entorrinal

DA - Doença de Alzheimer

MCD - Memória de Curta Duração

MLD - Memória de Longa Duração

LAM - Labirinto Aquático de Morris

BDNF - Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

VEH - Veículo

µl - Microlitro

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	OBJETIVOS.....	20
2.1	OBJETIVO GERAL .....	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
3	MATERIAIS E MÉTODOS .....	21
3.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS .....	21
3.2	CIRURGIA ESTEREOTÁXICA.....	21
3.3	MANIPULAÇÃO .....	22
3.4	LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS – LAM .....	22
3.4.1	Protocolo de Aprendizado Longo De Treino .....	24
3.4.2	Protocolo de Aprendizado Curto de Treino.....	25
3.4.3	Protocolo de Aprendizado Reverso .....	25
3.5	TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS .....	26
3.6	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	27
3.7	CONTROLE HISTOLÓGICO DA REGIÃO ESTUDADA E MÉTODO DE EUTANÁSIA .....	28
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	29
4	RESULTADOS.....	30
5	DISCUSSÃO .....	38
6	CONCLUSÕES .....	40
7	REFERÊNCIAS.....	41

## 1 INTRODUÇÃO

A memória pode ser definida como a capacidade de adquirir, armazenar e evocar informações.<sup>1,2</sup> A formação de uma memória ocorre através de diversos processos bioquímicos e metabólicos em distintas estruturas cerebrais. Os mecanismos neurofisiológicos e neuroquímicos que subjazem os processos mnemônicos são um dos temas mais fascinantes da neurociência e objeto de diversos estudos há muito tempo. A formação de memórias envolve alterações na representação neural, através de eventos plásticos que modificam a comunicação entre neurônios<sup>3</sup>, sendo que, eventos plásticos podem incluir alterações na estrutura, na distribuição e no número de sinapses.<sup>4,5</sup>

O processo pelo qual as informações são armazenadas é denominado de consolidação. Nele ocorrem diferentes eventos moleculares, levando à transcrição e tradução gênica, conseqüentemente, à síntese de novas proteínas necessárias para modificações funcionais e estruturais.<sup>6</sup> Acredita-se que o processo de consolidação de memórias de longa duração (MLD) implica no crescimento de novas conexões neurais e rearranjos das já existentes.<sup>7</sup> Postula-se que estes requisitos moleculares decorrentes do processo de consolidação da memória são apenas os passos iniciais de uma série de eventos que evoluem por um período prolongado, em diferentes regiões do cérebro.<sup>8,9</sup>

Nem todas as memórias são iguais. Existem aquelas que se mantêm apenas o tempo suficiente para que possam ser utilizadas e outras que podem ser armazenadas por toda a vida. As memórias, então, podem ser classificadas de acordo com o seu tempo de duração em memórias sensoriais, memórias de curta duração e longa duração.

**Quadro 1 Classificação das memórias de acordo com a sua perdurabilidade.<sup>9</sup>**

	<i>Tempo de permanência</i>	<i>Características</i>
<b>Memórias Sensoriais</b>	Poucos segundos.	Retêm a breve impressão de um estímulo após este ter desaparecido, ou seja, depois que o sistema sensorial correspondente deixa de enviar informação ao cérebro.
<b>Memórias de Curta Duração (MCD)</b>	Menos de 3 horas.	Permite manter “na mente” e em um estado ativo e facilmente acessível uma informação.
<b>Memórias de Longa Duração (MLD)</b>	Dias, meses, anos ou a vida toda.	Contêm informações altamente interconectadas entre si, as quais se encontram armazenadas de forma relativamente permanente, constituindo um sistema de arquivo dinâmico.

As MLD também podem ser classificadas quanto ao seu conteúdo, sendo estas explícitas ou implícitas.

**Quadro 2 Classificação das memórias de longa duração de acordo com o conteúdo.<sup>9</sup>**

	<b>Características</b>	<b>Subdivisões e características</b>	
<b>Explícitas/ Declarativas</b>	Informações que usualmente sabemos que possuímos e às quais temos acesso consciente	<i>Episódicas</i>	Guardam informação acerca de nossas próprias vidas e eventos
		<i>Semânticas</i>	Armazenam informações acerca do mundo que nos rodeia, mas que lembramos sem saber como, quando e onde as adquirimos
<b>Implícitas/ Não- declarativas</b>	Informações às quais não temos acesso consciente, tal como a informação obtida a partir de aprendizados simples como aqueles derivados pelo treino em tarefas de condicionamento clássico e habituação	<i>Representação perceptual</i>	Representações (imagens, sons) sem significado aparente conhecido, mas úteis como dicas facilitatórias da evocação de informações inerentes; memória pré-consciente (priming)
		<i>Procedimentos</i>	Hábitos, habilidades, regras
		<i>Associativa</i>	Associa dois ou mais estímulos (condicionamento clássico), ou um estímulo a uma resposta (condicionamento operante)

Existem algumas memórias que não se encaixam em apenas uma dessas classificações, como é o caso da memória espacial, que envolve aspectos da memória não-declarativa (procedimentos), declarativa (episódica e semântica), bem como de curto e longo prazo.<sup>10,11</sup> A memória espacial tem relação com dois tipos referenciais: a primeira é a referência allocêntrica, que se define pela relação espacial do indivíduo com elementos do ambiente, especialmente objetos e imagens; e a segunda é a referência egocêntrica, relativo à orientação e localização com respeito ao observador

propriamente dito, que utiliza seu próprio posicionamento corporal para traçar coordenadas, como direita/esquerda, acima/abaixo e frente/atrás.<sup>12,13,14</sup>

A memória espacial é uma das principais memórias empregadas na sobrevivência de diferentes espécies, estando relacionada à sua habilidade em adquirir e utilizar informações ambientais, gerando os chamados “mapas cognitivos”. Esses mapas envolvem uma organização da memória de dicas ambientais de acordo com a relevância das relações espaciais entre essas dicas.<sup>15</sup> A partir deles, um indivíduo é capaz de localizar alimento ou água em um determinado local de seu hábitat, de recordar se neste ambiente já foi feita a busca por alimento recentemente ou não, e de lembrar se há a presença de outro indivíduo da mesma espécie ou de um predador em uma determinada área.<sup>16,17</sup>

Avaliações neurofisiológicas de pacientes amnésicos e experimentos em cobaias de laboratório mostraram que a integridade do lobo temporal, que inclui a formação hipocampal, é essencial para o processamento de memórias espaciais.<sup>18,19,20,21,22</sup> Estudos demonstram que a ativação das células do hipocampo está diretamente associada à localização do animal no espaço, sugerindo um papel central desta estrutura na codificação desse tipo de informação.<sup>15</sup> O hipocampo é requerido para formar e armazenar memórias referentes a lugares e eventos que compõem uma determinada experiência<sup>23</sup>, além disso, sabe-se que a região CA1 do hipocampo está envolvida diretamente no processamento da memória espacial.<sup>24</sup>

O hipocampo é uma estrutura encefálica bilateral localizada no lobo temporal e pertencente ao sistema límbico. Este nome deriva de seu formato curvado, pois, quando feitas secções coronais de um cérebro humano, se assemelha a um cavalo marinho (Grego: *hippos* = cavalo, *kampi* = curva). O hipocampo é uma estrutura que está envolvida na formação de memórias de curto e longo prazo.<sup>25</sup> Diferentes áreas corticais aferentes e eferentes interagem com o hipocampo para regular a aquisição e o armazenamento de novas informações.<sup>26</sup>

Existem evidências de que a memória espacial é processada principalmente no lobo temporal medial (LTM), que consiste do hipocampo (incluindo o giro denteado e o complexo subicular) e áreas corticais adjacentes que estão anatomicamente relacionadas ao hipocampo, como os córtices entorrinal, perirrinal e parahipocampal.<sup>27</sup>

Estudos mostram que lesões no hipocampo ou em suas conexões, resultam em um considerável déficit cognitivo na memória espacial, sem efeito em outro tipo de memória.<sup>28</sup> Além disso, estudos utilizando o labirinto de *Heb-Williams* mostram que o hipocampo e o córtex pré-frontal medial são necessários para memória espacial.<sup>29,30,31</sup>

De forma complementar<sup>32</sup>, demonstraram que lesões na porção dorsal do hipocampo, e não na ventral, acarretam déficits cognitivos no desempenho da tarefa de memória espacial e operacional. Ademais, o hipocampo possui um importante papel na retenção de memória espacial na tarefa de labirinto radial de quatro braços<sup>33</sup> e lesão no hipocampo leva a um déficit na memória para contexto, localização e ordem dos eventos previamente apresentados.<sup>34</sup>

Através de um sistema de realidade virtual tridimensional<sup>35</sup>, investigaram a importância do papel hipocampal na referência aloccêntrica da memória espacial em pacientes com lesão hipocampal seletivo em ambos os hemisfério cerebrais, com lesões unilaterais no lobo temporal direito (LTD) ou no esquerdo (LTE). Este estudo observou que o grupo com lesão no LTD possui um declínio considerável no teste, o que não foi observado no grupo com lesão no LTE, reforçando a hipótese de que o hipocampo exerce um importante papel na memória espacial aloccêntrica, mais especificamente o hipocampo direito.

As informações processadas no hipocampo podem ser influenciadas positiva ou negativamente por neuromoduladores.<sup>36,37,38</sup> Um sistema modulatório conhecido que inerva a região CA1 do hipocampo é a via dopaminérgica, provinda de estruturas mesolímbicas como VTA e substancia *nigra*.<sup>39,40,41,42</sup> A dopamina é capaz de exercer um efeito modulador sobre a memória no hipocampo ou alterações na persistência do traço mnemônico, ou até mesmo, uma combinação de ambos os efeitos.<sup>43</sup>

A dopamina é um neurotransmissor do tipo catecolaminérgico. Cerca de 80% do total da dopamina no sistema nervoso central (SNC) encontra-se no estriado, enquanto que o restante está distribuído difusamente pelo córtex e outras regiões cerebrais. A dopamina é sintetizada no cérebro através da ativação da enzima tirosina hidroxilase (TH) que converte o aminoácido tirosina em L-DOPA, que por sua vez é descarboxilado para formar a dopamina. Assim, a taxa de síntese deste neurotransmissor é modulada pela atividade da TH. Os neurônios dopaminérgicos apresentam dois modos distintos

de atividade e liberação: a atividade fásica, representada pelo padrão explosivo de disparos que ocorrem em resposta a estímulos com relevância comportamental; e a atividade tônica que ocorre através do disparo espontâneo destes neurônios. A liberação fásica de dopamina ativa receptores pós-sinápticos e é rapidamente removida da fenda por mecanismos de recaptação, através do transportador de dopamina. A liberação tônica determina os níveis extracelulares deste neurotransmissor em estruturas subcorticais, o que contribui na regulação da intensidade de liberação fásica através da retro-ativação de auto-receptores pré-sinápticos de dopamina implicados na inibição da síntese e liberação dopaminérgica.<sup>44</sup>

Os receptores dopaminérgicos são metabotrópicos acoplados a proteínas G e podem ser encontrados tanto pré quanto pós-sinápticamente. Eles são subdivididos em receptores dopaminérgicos do tipo D1 (receptores D1 e D5), que causam ativação da enzima adenilato ciclase e do tipo D2 (receptores D2, D3 e D4), que inibem esta enzima. Os neurônios dopaminérgicos se encontram organizados em grupos celulares no SNC. Existem quatro principais sistemas dopaminérgicos centrais, sendo que três deles se originam no mesencéfalo. Estes sistemas são também conhecidos como as vias dopaminérgicas.<sup>2</sup>

- Via mesolímbica: da área tegmental ventral (ATV) para diversos componentes do sistema límbico, como o núcleo acumbens, hipocampo e a amígdala; está envolvida em processos como emoção, memória e recompensa.
- Via mesocortical: da área ATV ao neocórtex, em particular ao córtex pré-frontal (CPF); está envolvida em funções cognitivas como atenção, motivação, planejamento e comportamento social.
- Via nigroestriatal: da substância *nigra pars compacta* (SNPc) ao estriado; está envolvida na coordenação sensório-motora e na iniciação do movimento.
- Via Túbero-infundibular: do núcleo arqueado do hipotálamo à glândula pituitária; está envolvida na regulação da liberação de hormônios.

Achados sugerem que neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral e substância *nigra* desempenham um papel importante na retenção de memória de curto prazo.<sup>45</sup> O sistema dopaminérgico participa do processamento mnemônico, pois a

ativação dos receptores D1/D5 durante a codificação da memória é necessária para a formação de um traço de memória persistente no hipocampo.<sup>46</sup> Receptores dopaminérgicos do tipo D2 no hipocampo estão relacionados à memória visuoespacial<sup>47</sup>, esta classe de receptores parece estar envolvida na plasticidade sináptica no hipocampo, pois antagonista de receptores D2 inibem a potenciação de longa duração nessa estrutura.<sup>48,49</sup>

Estudos mostram que a dopamina participa da modulação da plasticidade sináptica no hipocampo durante o armazenamento de uma informação espacial.<sup>50,51,52,53,54</sup> O papel do sistema dopaminérgico ganhou grande destaque nos últimos anos, pois existem fortes indícios de que este neurotransmissor está envolvido com patologias relacionadas ao envelhecimento, como é o caso da doença de Parkinson. Experimentos realizados pós-morte em pacientes que apresentavam a doença de Parkinson mostram níveis significativamente baixos de dopamina nos gânglios da base<sup>55</sup>, além disso, uma das características desta doença neurodegenerativa é a perda de neurônios dopaminérgicos na substância *nigra*<sup>56,57</sup>, acarretando em anomalias nos movimentos, comportamentos e memórias.<sup>58,59</sup>

A memória é uma habilidade fortemente associada à qualidade de vida e ao bem-estar do idoso, além de exercer importante influência sobre a autonomia e independência na vida cotidiana.<sup>60</sup> Considerando que 50% dos idosos apresentam queixas freqüentes e que o declínio da capacidade cognitiva (DCC) decorre ou dos processos fisiológicos do envelhecimento normal, ou de um estágio de transição para as demências, estudos epidemiológicos mostram que idosos com declínio da capacidade cognitiva apresentam maiores riscos de desenvolver a Doença de Alzheimer (DA), em particular aqueles com déficit de memória episódica.<sup>61</sup>

O constante avanço na área das neurociências pode influenciar direta e positivamente a qualidade de vida da sociedade, aumentando a expectativa de vida ao garantir melhor prognóstico para doenças de difícil tratamento (esquizofrenia, depressão, etc.) ou incuráveis até o presente momento, como as doenças de Parkinson e Alzheimer, que incidem sobre a população idosa, acarretando justamente na perda progressiva da memória.

Uma maneira de se compreender os mecanismos que subjazem o surgimento e a ontogenia das doenças neurodegenerativas é analisar os mecanismos envolvidos nos processos de formação, armazenamento e evocação de memórias, para que seja possível detectar o que pode estar acontecendo de anormal nestes mecanismos, e subseqüentemente determinar à origem destas doenças que afetam uma função tão nobre do cérebro como a memória, uma vez que sem memória, o indivíduo perde a referência de si próprio, sua personalidade.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o papel do sistema dopaminérgico hipocampal nos processos de consolidação e persistência de memória espacial em ratos.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Investigar o papel do sistema dopaminérgico no processo de consolidação da memória espacial em ratos, utilizando o paradigma de Labirinto Aquático de Morris.

Investigar o papel do sistema dopaminérgico na persistência da memória espacial em ratos, utilizando o paradigma de Labirinto Aquático de Morris.

Investigar o papel do sistema dopaminérgico na extinção da memória espacial em ratos, utilizando o paradigma de Labirinto Aquático de Morris.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos de 3 meses de idade, pesando em média 320 g. Os animais foram mantidos em caixas moradias contendo 5 animais cada, em ambiente climatizado (temperatura de 21-23°C), submetidos a um ciclo claro/escuro de 12 h, com água e comida *ad libitum*; que foram adquiridos da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) e mantidos no biotério do Centro de Memória no Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS. O projeto referente ao presente estudo foi apreciado e aprovado pela comissão científica do IGG e pelo CEUA. (Anexo 1). Foram tomadas precauções com o intuito de minimizar o sofrimento dos animais e de reduzir o número de animais utilizados. Todos os experimentos realizados estiveram de acordo com as normas dos “*Principles of laboratory animal care*” (NIH publication N° 85-23, revised 1996).

#### 3.2 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Os animais utilizados foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas guia de 0,2 mm de calibre posicionadas 1,0 mm acima do hipocampo, seguindo as coordenadas (AP -4,2 mm, LL  $\pm$ 3,0 mm, DV -2,0 mm) do Atlas de Paxinos e Watson.<sup>62</sup> Todo o procedimento foi realizado com os animais previamente anestesiados com ketamina (“Francotar”; Virba, ou “Vetanarcol”; König) juntamente com Xilazina (“Coopazine”; Coopers), administrados intra-peritonealmente (*i.p.*), nas doses de 75 mg/Kg e 10 mg/Kg, respectivamente. Uma vez recuperados da anestesia, os animais eram recolocados em suas caixas-moradia, sem ter ocorrido troca entre os mesmos em cada caixa ao longo de todo o experimento.



**Figura 1** - Foto de um animal sendo submetido à cirurgia estereotóxica para a implantação de cânulas de infusão na região CA1 do hipocampo dorsal.

### 3.3 MANIPULAÇÃO

Quatro dias após a cirurgia, os animais foram submetidos a duas sessões de manipulação. Durante cada sessão os animais foram levados do biotério até a sala onde os experimentos seriam conduzidos, retirados da caixa-moradia e manuseados durante 5 minutos. Após 24 horas da última sessão de manipulação os animais foram submetidos aos paradigmas comportamentais.

### 3.4 LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS – LAM

O LAM foi desenvolvido há quase 20 anos por Richard G. Morris (1986) como um instrumento para investigar aprendizado espacial em roedores. A relativa simplicidade do LAM é indubitavelmente uma das razões para seu sucesso. Na sua versão espacial (também denominada de “plataforma oculta”), esta tarefa está baseada em uma capacidade universal, a utilização de dicas ambientais para encontrar um alvo que, ao permitir o escape de uma situação desprazerosa, atua como reforço positivo. De fato, o

LAM é o modelo comportamental mais amplamente usado para analisar a participação do hipocampo no processamento de informação espacial. O paradigma é plástico o suficiente como para poder ser adaptado com êxito à análise de diferentes fases e modalidades do processamento do traço mnemônico espacial, onde um maior número de sessões de treino, ou bem a execução do mesmo durante vários dias conduz ao estabelecimento de um mapa mnemônico perdurável, claramente evidenciado pelo surgimento de uma marcada preferência espacial. O fato de que a intensidade e a duração do treinamento possam ser alteradas com conseqüências previsíveis na magnitude da resposta adquirida e da preferência espacial estabelecida, facilita a análise correlativa entre os dados comportamentais e suas contrapartidas bioquímicas. Além disso, a possibilidade de modificar a localização do escape no labirinto após sua posição original ter sido aprendida permite avaliar a transformação do traço mnemônico produzida pela adição de nova informação.

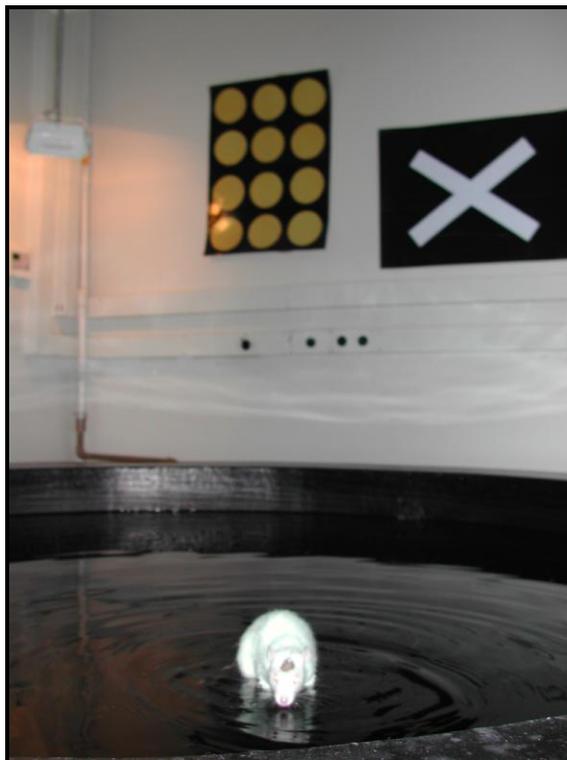
O LAM utilizado no presente trabalho encontra-se em uma sala ampla, bem iluminada (iluminação indireta) e sem janelas, a qual foi especialmente construída nas instalações do Centro de Memória do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS. O labirinto em si consiste de uma piscina circular feita de concreto rebocado e impermeabilizado pintada da cor preta (2 m de diâmetro e 0,6 m de altura). A piscina está conceitualmente dividida em 4 quadrantes imaginários idênticos. Dois centímetros abaixo da água (mantida entre 21–23°C durante todo o experimento) e oculta da vista do sujeito experimental encontra-se uma plataforma de escape de 12 cm de diâmetro. A superfície da plataforma é abrasiva para permitir que o animal suba nela assim que a detectar. O LAM está rodeado de numerosos elementos claramente visíveis e de cores e motivos contrastantes ainda que comportamentalmente neutros (figuras, fotografias, desenhos geométricos e abstratos, etc.) pendurados nas paredes da sala. Estes elementos servem como dicas de localização espacial e sua posição pode ser mudada a vontade do experimentador.



**Figura 2** - Vista geral da sala do LAM do Centro de Memória do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS.

#### 3.4.1 Protocolo de Aprendizado Longo De Treino

O treino na versão espacial do LAM consistiu de 1 sessão diária de 8 largadas durante 5 dias. A plataforma de escape foi mantida na mesma posição durante os 5 dias de treino. Cada uma das 8 largadas diárias foi iniciada de uma posição distinta da piscina de acordo com um padrão pseudo-aleatório gerado por um sistema computadorizado desenvolvido em nosso laboratório. A duração máxima de nado para a localização da plataforma é de 60 s. Os animal que não encontram a plataforma neste período de tempo foram conduzidos até a mesma pelo experimentador, onde o animal permaneceu sobre a mesma durante 30 s. A retenção da memória no LAM foi avaliada em um teste na ausência da plataforma de escape com duração de 60 s, realizado 24 e 120 horas após o treino. Durante a sessão de teste foram mensurados: a) o tempo que o animal permaneceu nadando no quadrante alvo (quadrante onde esteve localizada a plataforma durante as sessões de treino); b) o tempo que levou para encontrar a posição onde estava localizada a plataforma nas sessões de treino e c) o número de vezes que o animal cruzou esta posição.



**Figura 3** - Fotografia de um rato sobre a plataforma de escape no LAM

#### 3.4.2 Protocolo de Aprendizado Curto de Treino

O protocolo utilizado para o aprendizado curto na versão espacial do LAM foi o mesmo apresentado acima, assim como as seções de testes, com a diferença de que os animais foram submetidos a 2 sessões diárias de treino de 8 largadas.

#### 3.4.3 Protocolo de Aprendizado Reverso

Os animais foram treinados no LAM utilizando o protocolo de aprendizado longo (descrito em 3.4.1), realizando-se uma sessão diária de oito largadas durante cinco dias. No sexto dia realizou-se o aprendizado reverso, em que a plataforma de escape

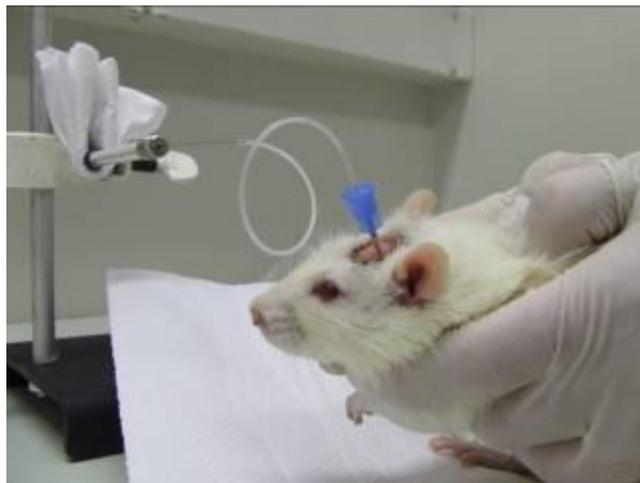
foi movida do quadrante original (ORI) para o quadrante oposto/reverso (REV). O treino com a plataforma na localização reversa (aprendizado reverso) foi realizado em um único dia e consistiu de 8 largadas consecutivas. A retenção da memória foi avaliada 24 e 120 horas após a oitava largada de aprendizado reverso mediante um teste na ausência da plataforma de escape durante o qual se avaliou: a) o tempo que o animal permaneceu nadando no quadrante ORI e no REV; b) o tempo que levou para encontrar a posição onde estava localizada a plataforma nas sessões de treino nos quadrantes ORI e VER; e c) o número de vezes que o animal cruzou estas posições.

O protocolo de aprendizado reverso foi utilizado para avaliar a resistência do traço mnemônico a extinção. A tarefa da extinção consiste em nos mostrar a resistência do traço mnemônico referente ao quadrante original, após os animais terem sido treinados em um quadrante oposto. Assim, comparamos entre o grupo SKF e salina, por qual quadrante houve ou não preferência pelo animal, indicando se a ativação de receptores D1 e D5 durante o aprendizado obteve alguma influência sobre a capacidade desta traço mnemônico aprendido, sofrer interferência de um aprendizado subsequente conflitante (quadrante oposto).

### 3.5 TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS

Os fármacos utilizados foram o agonista do receptor D1, SKF38393, e o antagonista do receptor D1, SCH23390, obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). As doses utilizadas foram determinadas com base em experimentos pilotos e em estudos prévios mostrando seus efeitos sobre aprendizado e memória, e em outras variáveis comportamentais e fisiológicas.<sup>63,64,65,66,67,68</sup> Para a realização dos tratamentos farmacológicos foi utilizado uma micro-seringa Hamilton acoplado a um tubo de polietileno com uma agulha de infusão (0,05 mm de diâmetro). Foram infundidos bilateralmente 1 µl/lado de fármaco ou 1 µl/lado solução salina (salina 0,9%; VEH) a uma velocidade de 1 µl/min com o auxílio de uma bomba de infusão (KD Scientific). Ao

término, a agulha de infusão foi deixada no local por 30-60 s adicionais para evitar refluxo das substâncias infundidas.



**Figura 4** - Infusão de fármacos através das cânulas-guia esterotaxicamente implantadas. A agulha de infusão, maior em comprimento do que a cânula-guia é introduzida na luz desta, atingindo a região-alvo onde se deseja que o fármaco ou salina sejam infundidos.

### 3.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

#### Grupo SCH23390 - Consolidação:

Os animais foram divididos randomicamente em 2 grupos (A e B), onde o grupo A recebeu o antagonista ou veículo imediatamente (0'min) após cada sessão de treino, durante os 5 dias de treino. O grupo B recebeu o antagonista ou veículo 3 horas após cada sessão de treino, durante os 5 dias de treino. Os animais de ambos os grupos foram testados 24 e 120 horas após o ultimo dia de treino.

#### Grupo SKF38393 – Perdurabilidade:

Os animais foram divididos randomicamente em 2 grupos (C e D), onde o grupo C recebeu o agonista ou veículo imediatamente (0'min) após cada sessão de treino, durante os 2 dias de treino. O grupo D recebeu o agonista ou veículo 3 horas após cada

sessão de treino, durante os 2 dias de treino. Os animais de ambos os grupos foram testados 24 e 120 horas após o último dia de treino.

Grupo SKF38393 – Extinção:

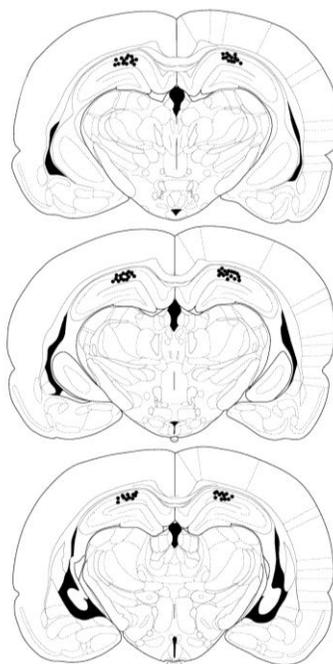
Os animais foram divididos randomicamente em 2 grupos (E e F), onde o grupo E recebeu o agonista ou veículo imediatamente (0'min) após cada sessão de treino, durante os 5 dias de treino. O grupo F recebeu o agonista ou veículo 3 horas após cada sessão de treino, durante os 5 dias de treino. No sexto dia os grupos foram submetidos ao protocolo de aprendizado reverso. Os animais de ambos os grupos foram testados 24 e 120 horas após o último dia de treino.

### 3.7 CONTROLE HISTOLÓGICO DA REGIÃO ESTUDADA E MÉTODO DE EUTANÁSIA

Após o término dos experimentos comportamentais os animais tiveram a posição de suas cânulas conferida histologicamente, e a região cerebral atingida pela infusão foi avaliada, visando garantir que apenas os dados comportamentais de animais que efetivamente receberam a correta administração dos fármacos fossem incluídos na análise estatística final.

Para isso, após os procedimentos comportamentais os animais foram submetidos à infusão bilateral de uma solução de azul de metileno a 4% através das cânulas; quinze minutos depois, foram sacrificados e seus cérebros removidos e colocados em uma solução de formol 4% por um período de 4 dias, quando então se procedeu a análise histológica, considerando-se somente os animais com a localização correta das cânulas.

Todos os animais foram sacrificados ao final dos experimentos, por decapitação. A morte destes animais por este método se justifica pela necessidade da obtenção dos encéfalos, tanto para análise histológica quanto para a utilização futura em experimentos bioquímicos.



**Figura 5** - Desenho esquemático do cérebro de rato mostrando o local de implantação das cânulas de infusão na região Ca1 do hipocampo dorsal.

### 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o software Graph-Pad Prism e os dados foram analisados utilizando-se ANOVA de duas vias com uma variável repetida no tempo seguido do teste *post-hoc* de *Newman-Keuls*. As latências das sessões de teste, bem como as porcentagens de tempo gasto no quadrante alvo, foram analisadas utilizando-se teste *t* de *Student*, tratamento vs. veículo. Valores de *p* menores do que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

## 4 RESULTADOS

Com o objetivo de verificar a participação do sistema dopaminérgico no processo de consolidação da memória espacial, animais com implantação bilateral de cânulas na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados durante 5 dias na versão espacial do LAM. Imediatamente (Fig. 6 A) e 3 horas (Fig.6 B) após o término das 8 sessões de treino diários os animais receberam a infusão bilateral de SCH23390 (40 nmol / lado) ou veículo (VEH). A retenção da memória espacial foi verificada em um teste realizado 24 e 120 h, após a última sessão de treino, através da avaliação da latência de escape (Fig.6 C) e (Fig.6 D) e percentagem de tempo gasto no quadrante alvo (Fig.6 E) e (Fig.6 F).

Na figura 6A, pode-se observar que o grupo que recebeu infusão de SCH imediatamente após a última sessão de treino, apresenta um pior desempenho na curva de aprendizagem em relação ao grupo controle. Este efeito não é observado quando o SCH é infundido 3 horas após a última sessão de treino.

Quando os animais que receberam infusão de SCH imediatamente, mas não 3 horas pós treino, são testados 24 e 120 h pós-treino, (Fig. 6 C e D) apresentam uma latência maior para encontrar o local da plataforma que o grupo controle.

Ao que se refere ao percentual de tempo de exploração no quadrante alvo (Fig.6 E e F), é possível notar que em ambos os dias de testes realizados, 24h e 120h após o última sessão de treino, os grupos SCH 0 min permaneceram menos tempo explorando o quadrante alvo, ao contrário do que se observa nos grupos SCH 3h. A análise dos resultados sugere que a infusão bilateral diária de SCH23390 na região CA1 do hipocampo imediatamente, mas não 3 h, após cada sessão de treino dificulta a consolidação da memória espacial.

## Dopamina - Consolidação

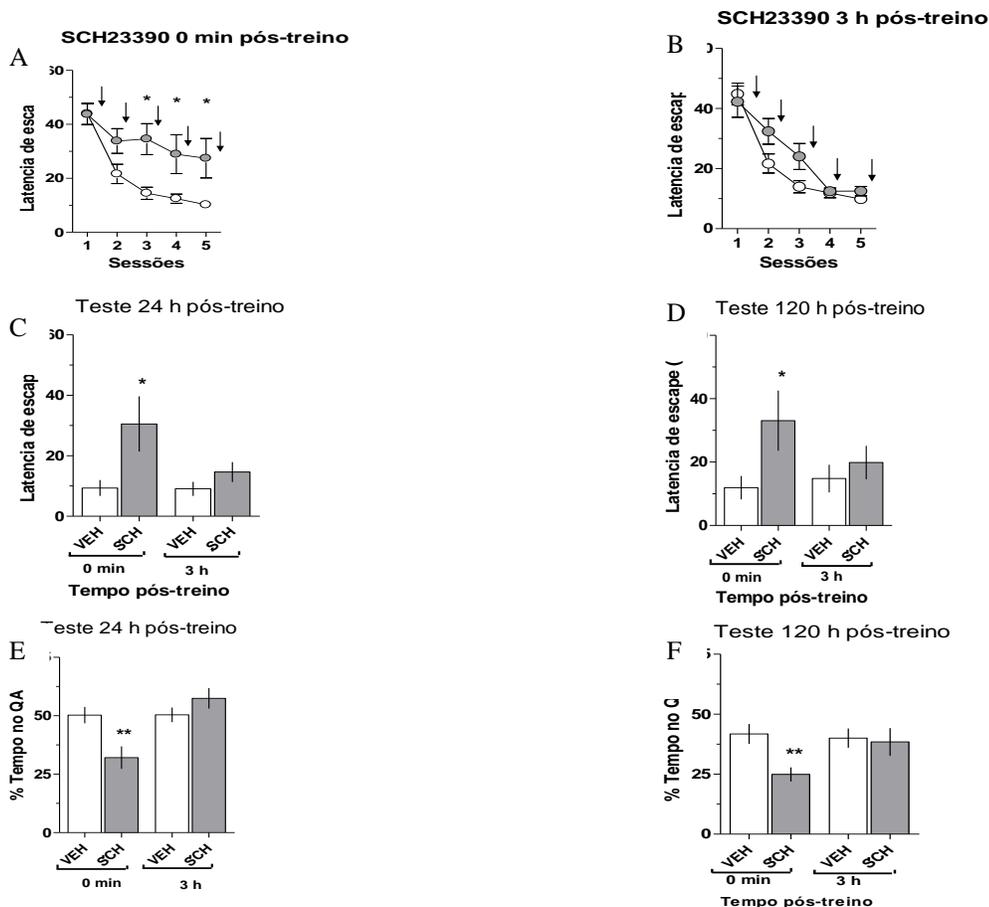


Figura 6 - Efeito do antagonista dopaminérgico D1 (SCH23390), infundido 0 min ou 3 horas após a última sessão de treino, sobre a consolidação da Memória espacial. Animais com cânulas bilaterais na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados durante 5 dias na versão espacial do Labirinto Aquático de Morris (LAM). Os animais receberam a infusão de SCH23390 (40 nmol/lado; SCH) ou veículo (VEH) imediatamente (A) ou 3 h após cada sessão de treino (B) durante 5 dias (8 ensaios por dia). Foi verificada a retenção de memória através de um teste (60s sem plataforma) realizado 24 ou 120h após a última sessão de treino (C, D). Os dados estão expressos em blocos de oito ensaios/dia, como média ( $\pm$  EPM) da latência de escape para a plataforma durante o treino (A, B); média ( $\pm$  EPM) da latência de escape até o local onde a plataforma estava durante as sessões de treino (C, D); e, média ( $\pm$  EPM) do percentual de tempo de nado no quadrante alvo (TQ) no teste (E, F). \*  $p < 0,05$  [ANOVA duas vias (A) ou teste t (C)], e \*\*  $p < 0,01$  [teste t (D)] vs VEH,  $n = 7-9$  por grupo.

Com o objetivo de verificar a participação do sistema dopaminérgico na persistência da memória espacial, animais com implantação bilateral de cânulas na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados durante 2 dias na versão espacial do LAM. Imediatamente (Fig.7 A) após o término das 8 sessões diárias de treino, os animais receberam infusão bilateral de SKF38393 (40 nmol / lado) ou veículo (VEH). A retenção de memória espacial foi avaliada em um teste realizado 24 h, após a última sessão de treino, sendo representado a latência de escape (Fig. 7 B) e percentagem no quadrante alvo (Fig.7 D) e 5 dias depois da última sessão de treino representando latência de escape e percentagem de tempo no quadrante alvo, respectivamente ( C e E)

Na figura 7 A, pode-se verificar que não há diferença na taxa de consolidação ao longo dos dias entre os animais tratados com SKF e veículo. Porém no gráfico B, os animais do grupo SKF infundidos imediatamente, mas não 3 h pós treino (Fig 8. gráfico B) encontraram a plataforma de escape em um tempo significativamente menor que o grupo controle. Entretanto esta diferença não foi verificada no tempo de busca, dos animais, pelo quadrante em que se encontrava a plataforma, tanto quanto pelos animais infundidos imediatamente como pelos infundidos 3 horas após as sessões de treino (Fig.7 D e Fig.8 D).

Quando foi realizado um teste de retenção da memória espacial 5 dias após o treino, verificamos que os animais do grupo SKF, infundidos imediatamente pós treino, necessitaram de menos tempo para localizar a plataforma que o grupo controle (Fig.7 C), mas esse efeito não foi visto quando o SKF é infundido 3 horas pós treino (Fig.8 C). Além disso, diferentemente do que ocorre 24 horas pós-treino, no teste 120 h pós treino os animais do grupo que receberam SKF imediatamente, mas não 3 horas pós treino, gastam mais tempo na procura pela plataforma no quadrante alvo do que o grupo controle (Fig.7 E e Fig.8 E).

Com o protocolo de dois dias no LAM verificou-se que a infusão de SKF38393 imediatamente após cada sessão diária de treino aumenta a persistência da memória espacial.

## Dopamina – Perdurabilidade

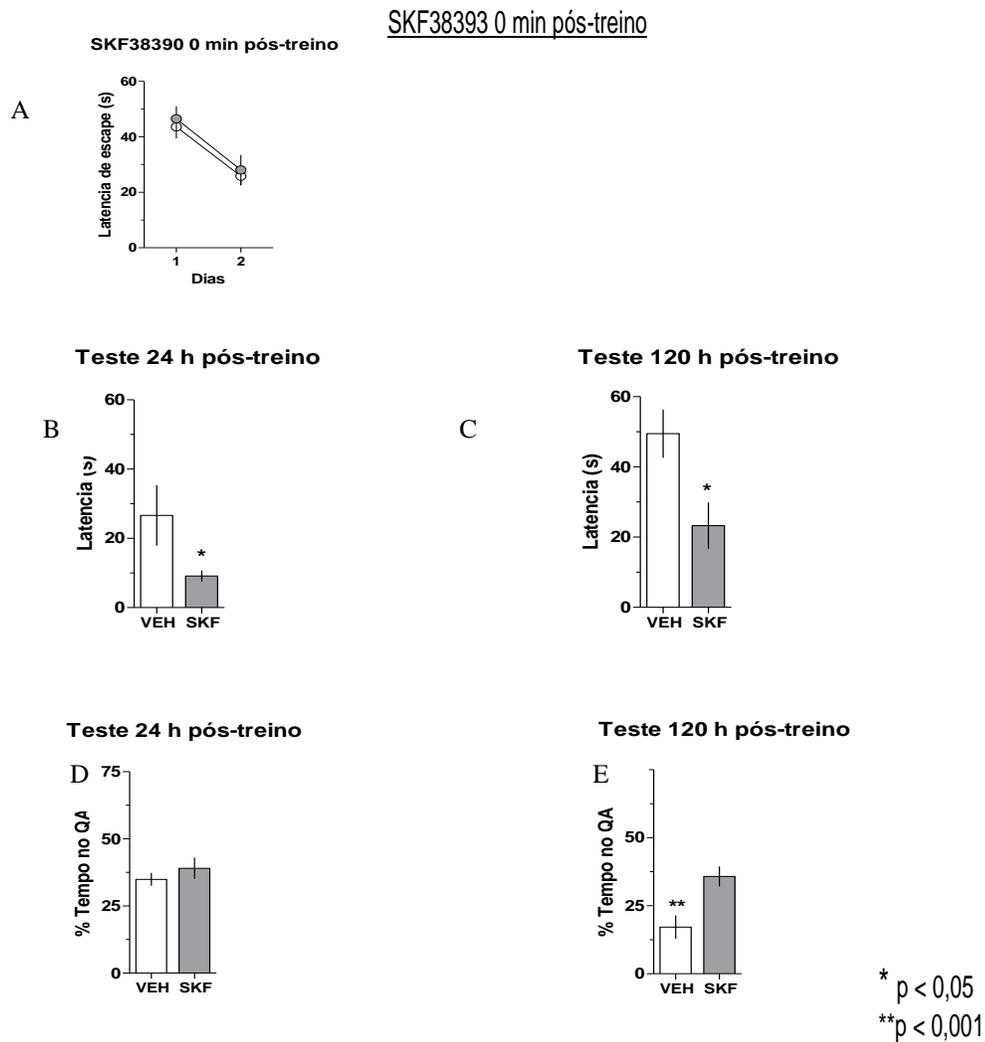


Figura 7- Efeito do agonista dopaminérgico D1 (SKF38393) infundido imediatamente pós-treino sobre a perdurabilidade da Memória espacial. Animais com implantação bilateral de cânulas na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados durante 2 dias na versão espacial do Labirinto Aquático de Morris (LAM). Imediatamente (A) após cada sessão de treino diário (8 ensaios por sessão) os animais receberam a infusão bilateral de SKF38393 (40 nmol / lado; SKF) ou veículo (VEH). A retenção da memória espacial foi verificada em um teste (60s, sem plataforma) realizada 24 h (B,D) e 5 dias depois da última sessão de treino (C, E). Os dados estão expressos como blocos de oito ensaios/dia; média ( $\pm$  EPM) da latência de escape para a plataforma (A); como média ( $\pm$  EPM) da latência de fuga para nadar até o local onde a plataforma estava durante as sessões de treino (B, C); e, como média ( $\pm$  EPM) do percentual de tempo de nado no quadrante alvo (TQ) durante o teste (D, E). \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  [teste t] vs VEH,  $n = 7-9$  por grupo.

## Dopamina – Perdurabilidade

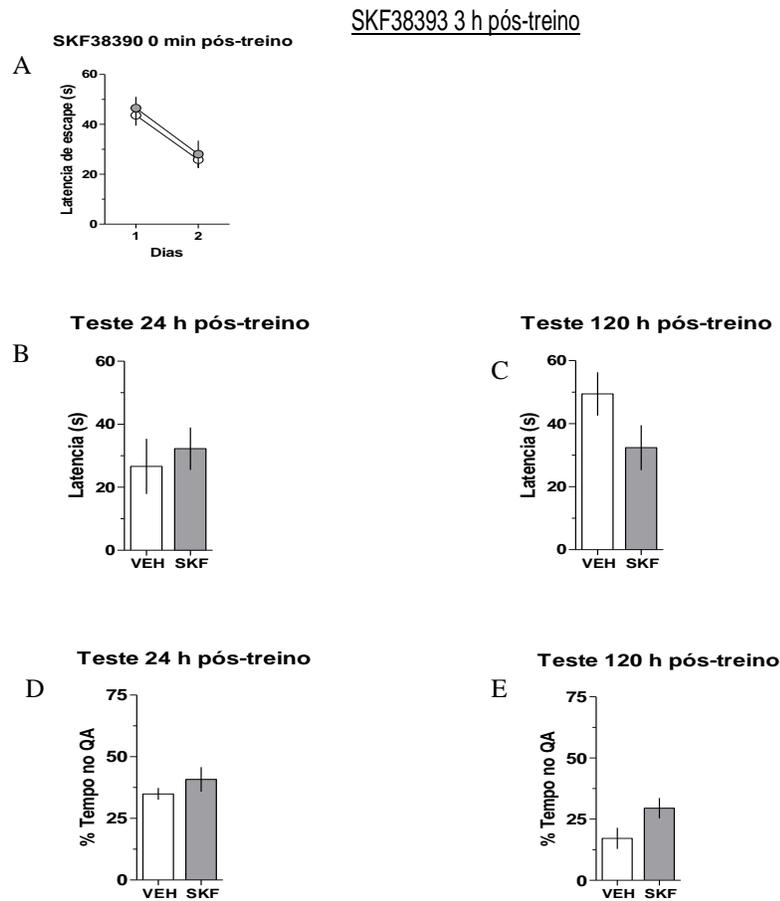


Figura 8 - Efeito do agonista dopaminérgico D1 (SKF38393) infundido 3 horas pós-treino sobre a perdurabilidade da Memória espacial. Animais com implantação bilateral de cânulas na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados durante 2 dias na versão espacial do Labirinto Aquático de Morris (LAM). Três horas (A) após cada sessão de treino diário (8 ensaios por sessão) os animais receberam a infusão bilateral de SKF38393 (40 nmol / lado; SKF) ou veículo (VEH). A retenção de memória espacial foi verificada em um teste (60seg, sem plataforma) realizado 24 h (B, D) e 5 dias depois da última sessão de treino (C, E). Os dados estão expressos como blocos de oito ensaios/dia; média ( $\pm$  EPM) da latência de escape para a plataforma (A); como média ( $\pm$  EPM) da latência de fuga para nadar até o local onde a plataforma estava durante as sessões de treino (B, C); e, como média ( $\pm$  EPM) do percentual de tempo de nado no quadrante alvo (TQ) durante o teste (D, E). \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  [teste t] vs VEH,  $n = 7-9$  por grupo.

Com o objetivo de verificar o papel do sistema dopaminérgico na extinção da memória espacial, animais com implantação bilateral de cânulas na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados durante 5 dias na versão espacial do LAM. Imediatamente (Fig. 9 A) ou 3 horas (Fig.10 A) após o término das 8 seções de treino diários os animais receberam a infusão bilateral de SKF38393 (40 nmol / lado) ou veículo (VEH).durante os 5 dias de treino No sexto dia, sem administração de fármacos, ambos os grupos foram submetidos a uma sessão de 8 ensaios consecutivos de um dia no aprendizado reverso (Fig.9 e 10 B). A retenção de memória espacial foi verificada em um teste realizado 24 e 120 h após o treino no aprendizado reverso. Os resultados foram apresentados como latência de escape nos quadrantes original e reverso para ambos os grupos, SKF/VEH 0 min pós treino (Fig. 9 C) e SKF/VEH 3 h pós treino (Fig.10 C). Além disso, verificamos a percentagem de tempo gasto no quadrante alvo e reverso para ambos os grupos, SKF/VEH 0 min pós treino (Fig.9 D) e SKF/VEH 3 h após a sessão de treino (Fig.10 D).

No teste realizado 24 e 120 hs pós-treino reverso (Fig. 9 C e Fig.10 C) verificou-se que os animais do grupo SKF, infundidos imediatamente e 3 horas pós-treino, não mostram diferença significativa em relação ao grupo controle para encontrar o local original da plataforma ou o reverso. Quanto ao tempo de permanência nos quadrantes alvo e reverso, não houve diferença significativa entre os grupos que receberam SKF ou VEH, imediatamente ou 3 horas (Fig. 9 D e Fig. 10 D), quando testados 24 horas após o treino. Quando foi avaliado este mesmo parâmetro 120 hs pós treino reverso, diferentemente do que ocorre no teste 24 horas pós reverso, os animais que receberam SKF imediatamente (Fig. 9 D), mas não 3 horas pós treino ( Fig. 10 D), gastaram mais tempo, que o grupo controle, na procura pela plataforma no quadrante original do que no reverso,

Pode-se observar que SKF38393 quando infundido imediatamente após cada sessão diária de treino, mas não 3 horas após, aumenta a persistência da memória espacial, não ocorrendo a extinção do traço mnemônico, comparados com o grupo controle, mesmo quando os grupos foram treinados no aprendizado reverso

## Dopamina – Extinção

SKF38393 0 min pós-treino

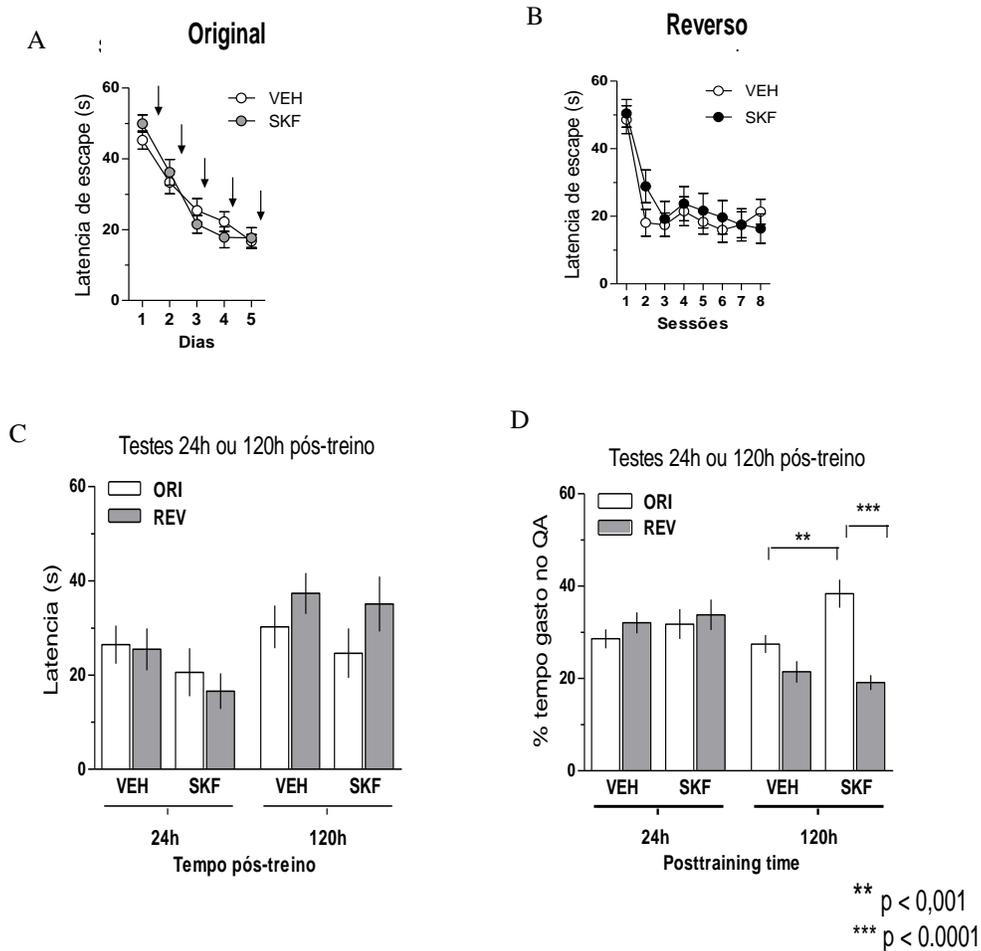


Figura 9 - Efeito do agonista dopaminérgico D1 (SKF38393), infundido imediatamente após a última sessão de treino, sobre a extinção da Memória espacial. Animais com cânulas bilaterais na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados durante 5 dias na versão espacial do Labirinto Aquático de Morris (LAM). (A) Os animais receberam a infusão intra-CA1 de SKF38393 imediatamente após cada sessão de treino, quando treinados apenas no quadrante original, 24h depois da última sessão de treino, os mesmos foram submetidos a uma sessão de 8 ensaios consecutivos de aprendizado reverso (B). Foi verificada a retenção de memória através de um teste (60s, sem plataforma) realizado 24h ou 120 horas após a última sessão de treino (C e D). Os dados estão expressos em blocos de oito ensaios/dia, como média ( $\pm$  EPM) da latência de escape para a plataforma durante o treino (A, B); média ( $\pm$  EPM) da latência de escape até o local onde a plataforma estava durante as sessões de treino (C); e, média ( $\pm$  EPM) do percentual de tempo de nado no quadrante alvo e no quadrante reverso (TQ) durante o teste (D).

## Dopamina – Extinção

SKF38393 3 h pós-treino

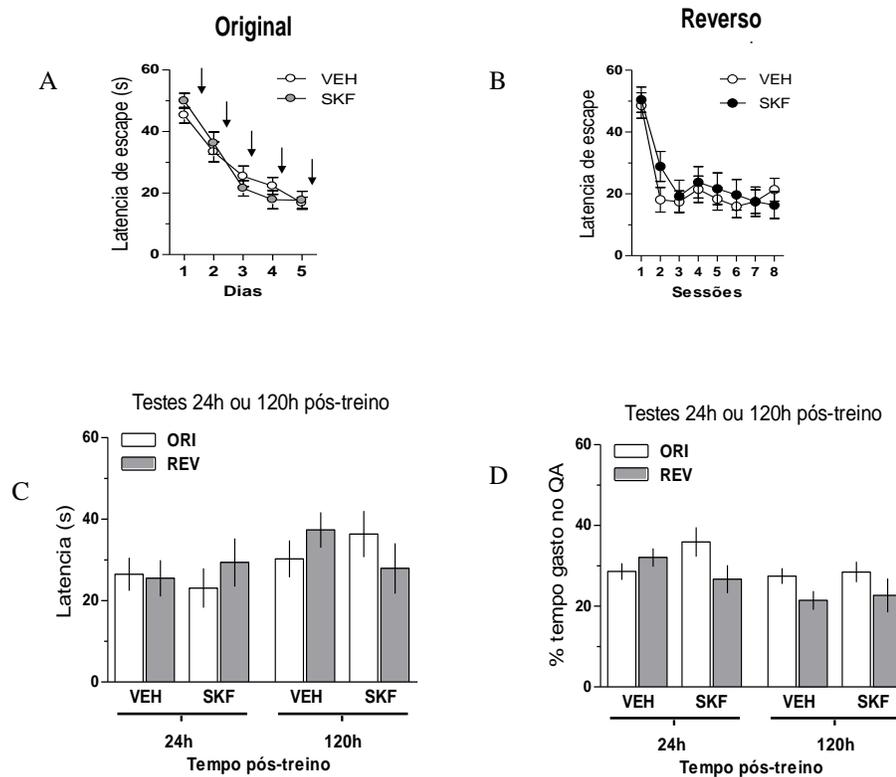


Figura 10 - Efeito do agonista dopaminérgico D1 (SKF38393), infundido 3 horas após a última sessão de treino, sobre a extinção da Memória espacial. Animais com cânulas bilaterais na região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados durante 5 dias na versão espacial do Labirinto Aquático de Morris (LAM) (A). Os animais receberam a infusão intra-CA1 de SKF38393 3h após cada sessão de treino, quando treinados apenas no quadrante original. 24h após a última sessão de treino os mesmos foram submetidos a uma sessão de 8 ensaios consecutivos de aprendizado reverso (B). Foi verificada a retenção de memória através de um teste (60 seg, sem plataforma) realizado 24h ou 120h após a última sessão de treino (C). Os dados estão expressos em blocos de oito ensaios/dia, como média ( $\pm$  EPM) da latência de escape para a plataforma durante o treino (A, B); média ( $\pm$  EPM) da latência de escape até o local onde a plataforma estava durante as sessões de treino (C); e, média ( $\pm$  EPM) do percentual de tempo de nado no quadrante alvo e no quadrante reverso (TQ) no teste (D).

## 5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram com os dados previamente descritos na literatura sobre o envolvimento do sistema dopaminérgico hipocampal nos processos de consolidação e persistência do traço mnemônico.<sup>7,69,70,71</sup> Pois, observou-se que a consolidação da memória espacial requer a participação de receptores D1, indo ao encontro de outros trabalhos que mostraram que além da memória espacial, memória aversiva e de reconhecimento requerem a ativação dos receptores da família D1.<sup>72</sup>

Diferentemente dos estudos sobre o processo de consolidação, poucos trabalhos têm investigado o envolvimento do hipocampo na persistência da memória espacial, provavelmente porque, acredita-se que inicialmente o armazenado de uma memória é mantido temporariamente no hipocampo e mais tarde, transferido para o córtex para um armazenamento persistente.<sup>73</sup> No entanto, estudos têm mostrado que a atividade neural hipocampal é necessária para a consolidação e armazenamento de informação espacial durante 5 dias após o treinamento em ratos no LAM.<sup>74</sup> Desta forma, avaliar os mecanismos moleculares que participam na persistência da memória pode ajudar a compreender e tratar os déficits de armazenamento da memória associado com o envelhecimento natural e patologias. Pouco se sabe atualmente, sobre os mecanismos celulares e moleculares envolvidos em promover a persistência da memória.<sup>75</sup> Estudos recentes vêm abordando esta questão, centrando-se principalmente no córtex cerebral como a região de memória de armazenamento permanente. Poucos trabalhos têm avaliado o envolvimento do hipocampo na persistência da memória, logo, com o objetivo de avaliar o papel do sistema dopaminérgico hipocampal na perdurabilidade de memórias espaciais foi realizado este trabalho. Assim, os resultados apresentados na presente dissertação corroboram com trabalhos prévios que sugerem a ativação de receptores dopaminérgicos D1/D5 na formação de um traço mnemônico persistente no hipocampo. Uma das cascatas bioquímicas que parece estar envolvido neste processo foi mostrado num artigo do presente grupo de pesquisa,<sup>71</sup> sugerem que BDNF (*Brain-*

*derived neurotrophic factor*) é regulado pelo sistema dopaminérgico e parece ser essencial para a perdurabilidade de memórias aversivas em ratos.

Investigações da memória de medo em ratos demonstrou que a persistência da MLD requer expressão de BDNF no hipocampo 12 horas após o treino.<sup>7</sup>

Para corroborar com os dados obtidos com o sub-treino no LAM (protocolo 2 dias) se fez uso do protocolo de aprendizado reverso para avaliar a força do traço mnemônico perante um aprendizado conflitante, cujo objetivo é causar extinção do aprendizado original.

Ao avaliar-se o efeito do agonista dopaminérgico D1 quando infundido imediatamente após a última sessão de treino de aprendizado no quadrante original verificou-se que os ratos infundidos com SKF possuem o traço mnemônico preservado em relação ao grupo controle quando testado 6 dias após o aprendizado reverso e não 24 horas. Este fato pode ser devido ao efeito teto de aprendizado no LAM quando os animais são testados 24 hs ao contrário do que ocorre 6 dias.

## **6 CONCLUSÕES**

O sistema dopaminérgico hipocampal está envolvido no processo de inicial da consolidação da memória espacial em ratos.

O sistema dopaminérgico hipocampal está envolvido na persistência da memória espacial em ratos.

O sistema dopaminérgico hipocampal está envolvido na extinção da memória espacial em ratos.

## 7 REFERÊNCIAS

1. Izquierdo I, Vianna MR, Izquierdo LA, Barros DM, Szapiro G, Coitinho AS, et al. Memory retrieval and its lasting consequences. *Neurotox Res* 2002; 4 (5-6):573-93.
2. Kandel E, Jessell T, Schwartz J. *Principles of Neural Science*. McGraw-Hill Medical: Columbia University, 2000. 1414p.
3. Dudai Y. *The neurobiology of memory. Concepts, findings, trends*. Oxford University Press, 1999. Oxford, UK.
4. Rusakov DA, Davies HA, Harrison E, Diana G, Richter-Levin G, Bliss TV et al. Ultrastructural synaptic correlates of spatial learning in rat hippocampus. *Neuroscience* 1997; 80:69-77.
5. Geinisman Y. Structural synaptic modifications associated with hippocampal LTP and behavioral learning. *Cereb Cortex* 2000; 10 (10):952-62.
6. Izquierdo I, Bevilaqua L, Rossato J, Bonnini J, Medina J, Cammarota M. Different molecular cascades in different sites of the brain are in charge of memory consolidation. *Trends in Neurosci* 2006; v. 29: 496-505.
7. Bekinschtein P, Cammarota M, Igaz LM, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Medina JH. Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. *Neuron*, 2007; 53 (2): 261-77.
8. Izquierdo I, Medina J. The biochemistry of memory and its regulation by modulatory systems. *Psychobiology* 1997; 25: 1-9.
9. Izquierdo I, McGaugh JL. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. *Behavioural Pharmacology* 2000; 11 (7-8): 517-34.
10. Moscovitch ML, Nadel, G, Winocur, A, Gilboa and R.S. Rosenbaum. The cognitive neuroscience of remote episodic, semantic and spatial memory. *Curr Opin Neurobiol* 2006; 16: 179–90.
11. Kesner RP, Hunsaker M R. The temporal attributes of episodic memory. *Behav Brain Res*. Epub ahead of print 2009.

12. Potì P. Aspects of spatial cognition in capuchins. (*Cebus apella*) frames of reference end scale of space. *Anim cog* 2000; 3: 69-77.
13. Ma Y Y, Tain B P, Wilsin FA. Dissociation of egocentric and allocentric spatial processing in prefrontal cortex. *Neuroreport* 2003; 14: n.13. p.1737-741.
14. Potì P, Bartolommei P, Saporiti M. Landmark use bay *Cebus apella*. *Int J primatol* 2005; 26: n. 4, 921-48.
15. Eichenbaum H. Neurobiology. The topography of memory. *Nature* 1999; 402(6762):597-9.
16. Tomasello M, Call J. Primate cognition. New York: Oxford University Press, 517, 1997.
17. Best PJ, White AM, Minai A. Spatial processing in the brain: The activity of hippocampal place cells. *Annu Rev Neurosci* 2001; 24: 459-86.
18. Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* 1988; 31(1):47-59.
19. Logothetis NK, Sheinberg DL. Visual object recognition. *Annu Rev Neurosci.* 1996; 19:577-621.
20. Clark RE, Zola SM, Squire LR. Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. *J Neurosci* 2000; 20:8853-60.
21. Riesenhuber M, Poggio T. Neural mechanisms of object recognition. *Curr Opin Neurobiol* 2002; 12:162-8.
22. Mo L, Yang Z, Zhang A, Li X. The repair of the injured adult rat hippocampus with NT-3-chitosan carriers. *Biomaterials* 2009. Epub ahead of print 2009.
23. Singer AC, Frank LM. Rewarded outcomes enhance reactivation of experience in the hippocampus. *Neuron* 2009; 64(6):910-21.
24. Kesner RP, Hunsaker MR. The temporal attributes of episodic memory. *Behav Brain Res* 2009.
25. Izquierdo I, Medina JH, Izquierdo LA, Barros DM, de Souza MM, Mello e Souza T. Short- and long-term memory are differentially regulated by monoaminergic systems in the rat brain. *Neurobiol Learn Mem* 1998a; 69:219-24.

26. Izquierdo I, Izquierdo LA, Barros DM, Mello e Souza T, de Souza MM, Quevedo J. et al. Differential involvement of cortical receptor mechanisms in working, short-term and long-term memory. *Behav Pharmacol* 1998b; 9:421-7.
27. Zola-Morgan S, Squire LR. Neuroanatomy of memory. *Annu Rev Neurosci* 1993; 16:547-63.
28. Broadbent NJ, Squire LR, Clark RE. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(40):14515-20.
29. Winocur G and Moscovitch M. Hippocampal and prefrontal cortex contributions to learning and memory: Analysis of lesion and aging effects on maze learning in rats, *Behav Neurosci* 1990; 104 (4): 544–51.
30. Rogers JL and Kesner RP. Lesions of the dorsal hippocampus or parietal cortex differentially affect spatial information processing, *Behav Neurosci* 2006; 120 (4): 852–60.
31. Churchwell JC, Morris AM, Musso ND, Kesner RP. Prefrontal and Hippocampal Contributions to Encoding and Retrieval of Spatial Memory. *Neurobiol Learn Mem* 2010; Epub ahead of print.
32. Pothuizen HH, Zhang WN, Jongen-Rêlo AL, Feldon J, Yee BK. Dissociation of function between the dorsal and the ventral hippocampus in spatial learning abilities of the rat: a within-subject, within-task comparison of reference and working spatial memory. *Eur J Neurosc.* 2004; 705-12.
33. Ramos JMJ. The perirhinal cortex and long-term spatial memory in rats. *Brain Res* 2002; 947: 294-98.
34. Eichenbaum H. "Hippocampus: Cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory," *Neuron* 2004; 44: 109–20.
35. Parslow DM, Morris RG, Fleminger S, Rahman Q, Abrahams S, Recce M. Allocentric spatial memory in humans with hippocampal lesions. *Acta Psychol (Amst)* 2005; 123-47.
36. Gasbarri A, Sull A, Packard MG. The dopaminergic mesencephalic projections to the hippocampal formation in the rat. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 1997; 21: 1–22.

37. Jay TM. Dopamine: A potential substrate for synaptic plasticity and memory mechanisms. *Prog. Neurobiol* 2003; 69: 375–90.
38. Wittmann BC, Schott BH, Guderian S, Frey JU, Heinze HJ, Duzel E. Reward-related fMRI activation of dopaminergic midbrain is associated with enhanced hippocampus-dependent long-term memory formation. *Neuron* 2005; 45: 459–67.
39. Carter, DA. and Fibiger, HC. Ascending projections of presumed dopamine-containing neurons in the ventral tegmentum of the rat as demonstrated by horseradish peroxidase. *Neuroscience* 1977; 2: 569–76.
40. Scatton B, Simon H, Le Moal M, Bischoff S. Origin of dopaminergic innervation of the rat hippocampal formation. *Neurosci Lett* 1980; 125-31.
41. Swanson LW. The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: A combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Res. Bull* 1982; 9: 321–53.
42. Gasbarri A, Verney C, Innocenz R, Campana E, Pacitti C. Mesolimbic dopaminergic neurons innervating the hippocampal formation in the rat: A combined retrograde tracing and immunohistochemical study. *Brain Res* 1994; 668: 71–79.
43. Colin M. O'Carroll, Stephen J. Martin, Johan Sandin, et al. Dopaminergic modulation of the persistence of one-trial hippocampus-dependent memory. *Learn. Mem* 2006; 13: 760-69.
44. Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 1998; 189-225.
45. Hefco V, Yamada K, Hefco A, Hritcu L, Tiron A, Nabeshima T. Role of the mesotelencephalic dopamine system in learning and memory processes in the rat. *Eur J Pharmacol* 2003; 475(1-3):55-60.
46. O'Carroll CM, Martin SJ, Sandin J, Frenguelli B, Morris RG. Dopaminergic modulation of the persistence of one-trial hippocampus-dependent memory. *Learn Mem* 2006; 13(6):760-9.
47. Takahashi H, Kato M, Takano H, Arakawa R, Okumura M, Otsuka T, et al. Differential contributions of prefrontal and hippocampal dopamine D(1) and D(2) receptors in human cognitive functions. *J Neurosci* 2008; (46):12032-8.

48. Frey U, Schroeder H, Matthies H. Dopaminergic antagonists prevent long-term maintenance of posttetanic LTP in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Brain Res.* 1990; 522:69–75.
49. Manahan-Vaughan D, Kulla A. Regulation of depotentiation and long-term potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats by dopamine D2-like receptors. *Cereb Cortex* 2003; 13:123–35.
50. Otmakhova NA, Lisman JE. D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub> dopamine receptor activation increases the magnitude of early long-term potentiation at CA1 hippocampal synapses. *J Neurosci* 1996; 16:7478–86.
51. Matthies H, Becker A, Schröder H, Kraus J, Höllt V, Krug M. Dopamine D1-deficient mutant mice do not express the late phase of hippocampal long-term potentiation. *Neuroreport* 1997; 8:3533–35.
52. Swanson-Park JL, Coussens CM, Mason-Parker SE, Raymond CR, Hargreaves EL, Dragunow M. et al. A double dissociation within the hippocampus of dopamine D1/D5 receptor and beta-adrenergic receptor contributions to the persistence of long-term potentiation. *Neuroscience* 1999; 92:485–97.
53. Li S, Cullen WK, Anwyl R, Rowan MJ. Dopamine-dependent facilitation of LTP induction in hippocampal CA1 by exposure to spatial novelty. *Nat Neurosci* 2003; 6:526–31.
54. Liu N, Xue B, Xing H, Xu L, Jiang SX. Dopamine-dependent long-term depression in hippocampus of rat induced by exposure to spatial novelty. *Sheng Li Xue Bao* 2009; 61(6):511-16.
55. Iversen SD, Iversen LL. Dopamine: 50 years in perspective. *Trends Neurosci* 2007; 30(5):188-93.
56. Mendez I, Viñuela A, Astradsson A, Mukhida K, Hallett P, Robertson H. Dopamine neurons implanted into people with Parkinson's disease survive without pathology for 14 years. *Nat Med* 2008;14(5):507-9.
57. Matsui H, Takahashi R. Pathological mechanisms of Parkinson's disease. *Brain Nerve* 1999; 61(4):441-6, 229.

58. Rodriguez-Oroz MC, Jahanshahi M, Krack P, Litvan I, Macias R, Bezard E et al. Initial clinical manifestations of Parkinson's disease: features and pathophysiological mechanisms. *Lancet Neurol* 2009; (12):1128-39.
59. Surmeier DJ, Guzman JN, Sanchez-Padilla J. Calcium, cellular aging, and selective neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Cell Calcium*.2010; 4. Epub ahead of prin.
60. Allegri RF, Drake M, Thomson A. Neuropsychological findings in patients with middle temporal lobe epilepsy. *Rev Neurol* 1999; 1160-3.
61. Charchat-Fichman H, Caramelli P, Sameshima K, Nitrini R. Decline of cognitive capacity during aging. *Rev Bras Psiquiatr* 2005; 79-82.
62. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press: San Diego, 119p, 1986.
63. Alvarez EO, Banzan AM. Effects of localized histamine microinjections into the hippocampal formation on the retrieval of a one-way active avoidance response in rats. *J Neural Tran. General Section* 1995; 101: 201-11.
64. Alvarez EO, Banzan AM. Hippocampal histamine receptors: possible role on the mechanisms of memory in the rat, II. *J Neural Tran* 1996; 103:147-56.
65. Orsetti M, Ghi P, Di Carlo G. Histamine H(3)-receptor antagonism improves memory retention and reverses the cognitive deficit induced by scopolamine in a two-trial place recognition task. *Behav Brain Res* 2001;124:235-42.
66. Giovannini MG, Efoudebe M, Passani MB, Baldi E, Bucherelli C, Giachi F et al. Improvement in fear memory by histamine-elicited ERK2 activation in hippocampal CA3 cells. *J Neurosci* 2003; 23:9016-23.
67. Knoche A, Yokoyama H, Ponomarenko A, Frisch C, Huston J, Haas HL. High-frequency oscillation in the hippocampus of the behaving rat and its modulation by the histaminergic system. *Hippocampus* 2003; 13:273-80.
68. Baldi E, Bucherelli C, Schunack W, Cenni G, Blandina P, Passani MB. The H3 receptor protean agonist proxyfan enhances the expression of fear memory in the rat. *Neuropharmacology* 2005; 48:246-51.

69. Bekinschtein P, Cammarota M, Katche C, Slipczuk L, Rossato JI, Goldin A. et al. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(7):2711-6.
70. Izquierdo I, Bevilaqua LR, Rossato JI, da Silva WC, Bonini J, Medina JH. et al. The molecular cascades of long-term potentiation underlie memory consolidation of one-trial avoidance in the CA1 region of the dorsal hippocampus, but not in the basolateral amygdala or the neocortex. *Neurotox Res* 2008; 14(2-3):273-94.
71. Rossato JI, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Medina JH, Cammarota M. Dopamine controls persistence of long-term memory storage. *Science* 2009; 325(5943):1017-20.
72. Dudai Y, Morris RGM. To consolidate or not to consolidate: What are the questions? In *Brain, perception, memory. Advances in cognitive sciences* (ed. J.J. Bolhuis). Oxford University Press, Oxford, UK, 2001.
73. Zola-Morgan SM, Squire LR. The primate hippocampal formation: evidence for a time-limited role in memory storage. *Science* 1990; 250(4978):288-90.
74. Riedel G, Micheau J. Introduction: molecular mechanisms of memory formation from receptor activation to synaptic changes. *Cell Mol Life Sci* 1999, 55:521-4.
75. Dudai Y. Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. *Curr Opin Neurobiol* 2002; 12(2):211-6.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS

Ofício 101/09 – CEUA

Porto Alegre, 22 de outubro de 2009.

Senhor Pesquisador:

O Comitê de Ética para o Uso de Animais apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 09/00122, intitulado: **“A participação do sistema dopaminérgico hipocampal na consolidação e persistência da memória espacial”**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,

  
Prof. Dr. Anamaria Gonçalves Feijó  
Coordenadora do CEUA – PUCRS

Ilmo. Sr.  
Prof. Dr. Ivan Izquierdo  
N/Universidade

PUCRS

Campus Central  
Av. Ipiranga, 6690 – Prédio 60, sala 314  
CEP: 90610-000  
Fone/Fax: (51) 3320-3345  
E-mail: [ceua@pucrs.br](mailto:ceua@pucrs.br)