



Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS)
Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia

ESTUDO DO PAPEL DOS RECEPTORES ADENOSINÉRGICOS NA
RECONSOLIDAÇÃO RECENTE DE MEMÓRIA ESPACIAL DE LONGA
DURAÇÃO

Dissertação de Mestrado

Anne Karine Bosetto Fiebrantz

Orientador

Prof. Dr. Weber Cláudio Francisco Nunes da Silva

Coorientador

Prof. Dr. Fernando Benetti

Porto Alegre, 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

ESTUDO DO PAPEL DOS RECEPTORES ADENOSINÉRGICOS
NA RECONSOLIDAÇÃO DE MEMÓRIA ESPACIAL DE LONGA
DURAÇÃO

Anne Karine Bosetto Fiebrantz

Orientador

Prof. Dr. Weber Cláudio Francisco Nunes da Silva

Coorientador

Prof. Dr. Fernando Benetti

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas –
Fisiologia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em
Fisiologia

Porto Alegre, novembro de 2018

Dedico esta dissertação aos meus preciosos presentes de Deus.

Mãe e pai, obrigada por tanto amor, carinho e incentivo.

Graças a vocês, cheguei até aqui.

Amo muito vocês!

Agradecimentos

Começo meus agradecimentos com um trecho de uma música que gosto muito e que diz: “Seguro estou nos braços, D’aquele que nunca me deixou. Seu amor perfeito, sempre esteve repousado em mim”. Agradeço à Ele todos os dias por ter me capacitado, por em cada detalhe me ensinar e nunca desistir de mim, até mesmo quando eu queria. Obrigada meu Deus por tudo, obrigada meu Deus por tanto!

A eles que me deram a vida, minha mãe Marlene, exemplo de mulher e de professora que sempre tive dentro de casa. Hoje sigo os teus passos e me orgulho muito ao ver que me aproximo pelo menos um pouco, de tuas tantas qualidades. Ao meu pai Vilson, minha fonte de ânimo, exemplo de garra e persistência, fico imensamente feliz, ao perceber muitas vezes, o quanto somos parecidos. Muito obrigada! Se cheguei até aqui, é porque dentro da minha casa, tive os melhores exemplos. Amo vocês!

Aos meus irmãos Lucas e Larissa, onde cada um com seu jeitinho, me motivou a ser uma irmã melhor a cada dia, espero ser exemplo para vocês. Amo vocês, mais que a mim.

Ao meu amado marido Arthur, por todo apoio, carinho, compreensão e companheirismo. Por ter tido toda a paciência do mundo, nos meus dias mais difíceis. Obrigada por se fazer presente em tantos momentos decisivos, e me mostrar a cada dia, que foste a melhor escolha que já fiz. Esse mestrado seria infinitamente mais difícil, se você não estivesse comigo. Obrigada por abraçar meus sonhos e fazer deles, seus planos também. Te amo muito!

Ao meu sogro Hamilton, minha sogra Mariângela e minha cunhada Ana Paula, por me darem suporte emocional e também financeiro. Por me ajudarem sempre nas viagens à Porto Alegre, sem vocês seria mais difícil. E as minhas cunhadas Ana Luiza e Ana Vitória, por torcerem tanto por mim, e me incentivarem nas horas mais difíceis. Deus foi muito bom comigo, colocando todos vocês na minha vida. Amo muito vocês!

Ao meu orientador, Weber, por acreditar tanto em mim. Por depositar em mim uma confiança que fico honrada em receber. Obrigada por compartilhar sua enorme sabedoria, e me propiciar a oportunidade de conviver com alguém tão sábio e ao mesmo tempo, tão humilde. És um exemplo de orientador! És um

mestre! Espero que um dia, consiga ser uma pesquisadora e professora tão competente como você é. Foste um grande incentivo, para que continuasse na carreira acadêmica, aliás, avante doutorado! Obrigada mestre!

À professora Juliana, por se fazer presente como amiga e como professora, me ajudando na realização dos experimentos e por sempre estar disposta a me ajudar. Obrigada Ju!

Ao pessoal do laboratório, Lari, Alice, Carol, Fer, Flávia, Letícia, Luan, Luana, Maris, Matheus, Renan, Tainá e Vinícius, por me auxiliarem nos experimentos e também pelo ótimo convívio todo o tempo. À minha amiga Elizama, por ter me ajudado tanto nos experimentos e por me apoiar e me incentivar sempre. Sinto falta da nossa convivência diária, obrigada amiga!

Agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para minha formação profissional e pessoal.

Obrigada ao CNPq (Conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico), pelo financiamento da minha bolsa, que tanto me ajudou, principalmente no período em que fiquei em Porto Alegre.

“Jesus olhou para eles e respondeu: “Para o homem é impossível, mas para Deus todas as coisas são possíveis. ””

Mateus 19:26

Muito obrigada!

Anne Karine Bosetto Fiebrantz.

“Nós somos aquilo que fazemos repetidamente. Excelência, então, não é um modo de agir, mas um hábito.”

Aristóteles

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
LISTA DE FIGURAS	12
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	16
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO	17
I.1 – Memória	17
I.2 Classificação das memórias	19
I.3 Mecanismos celulares e moleculares envolvendo a memória	20
I.4. Consolidação da memória	24
I.5 Reconsolidação de memórias.....	25
I.6 Memória espacial	26
I.7 Sistema adenosinérgico	27
I.7.1 Adenosina	27
I.7.2 Receptores adenosinérgicos	30
CAPÍTULO II – HIPÓTESE	36
CAPÍTULO III - OBJETIVOS	39
III. 1 Objetivo geral	39
III. 2 Objetivos específicos	39
CAPÍTULO IV - MATERIAIS E MÉTODOS	41
IV. 1 Animais experimentais.....	41

IV.2 Procedimento cirúrgico	41
IV. 3 Tarefa do Labirinto Aquático de Morris (LAM).....	43
IV.3.1. Versão espacial	43
IV.3.2. Versão espacial: Controle Reforço	44
IV.3.3. Versão espacial: Controle Infusão.....	44
IV.3.4. Versão espacial: Controle Temporal	44
IV.3.5. Versão espacial: Controle Estrutura.....	44
IV. 4 Tratamento farmacológico.....	44
IV. 5 Controle histológico da localização das cânulas-guia e do local da infusão	48
IV. 6 Fármacos utilizados	49
IV.7 N amostral.	50
IV.8 Descarte de resíduos	50
IV.9 Análise Estatística dos Dados.....	51
CAPÍTULO V – RESULTADOS	52
V.1 Curva dose-resposta.....	52
V.2. Reversão receptor-específica do efeito amnésico da adenosina sobre a reconsolidação recente de memória espacial de longa duração recente e remota	55
V.3 Participação da adenosina endógena na reconsolidação recente de memória espacial de longa duração recente e remota.....	59

V.4 Efeito da ativação individual dos receptores adenosinérgicos sobre a reconsolidação recente de memória espacial de longa duração recente e remota	62
V.5 Realização dos controles experimentais.....	65
V.5.1 Controle infusão	65
V.5.2 Controle reforço	68
V.5.3 Controle temporal.....	70
V.5.4 Controle estrutura	72
CAPÍTULO VI - DISCUSSÃO	75
CAPÍTULO VII – CONCLUSÕES	80
CAPÍTULO VIII– REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

LISTA DE ABREVIATURAS

AC - Adenilato ciclase

ADA – Adenosina desaminase

ADP – Adenosina difosfato

AK – Adenosina quinase

AMPA – Ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-isoxazol propiônico

ATP – Adenosina trifosfato

CA1, CA2 e CA3 – Corno de Amon 1, 2 ou 3

CaMKII - Proteína cinase dependente de cálcio/calmodulina isoforma II

cAMP – Adenosilil monofosfato cíclico

CRE – Elemento responsivo ao cAMP

CREB – Proteína ligante ao CRE

DAG - Diacilglicerol

ENT – Transportador de nucleosídeos

ERK1/2 – Proteína quinase regulada por sinal extracelular isoformas 1 e 2

GABA – Ácido C- aminobutírico

GDP – Guanisilil difosfato

GTP – Guanisilil trifosfato

IMP – Inosina monofosfato

IP₃ – Inositol 3 fosfato

LAM – Labirinto aquático de Morris

LTM – Memória de longa duração

LTP - Potenciação de longa duração

MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno

mRNA – RNA mensageiro

NOS – NO sintase

NTDases – Ecto – 5 – nucleotidases

PIP₂ – Fosfatidil – inositol- bifosfato

PKA – Proteína quinase A

PLC – Fosfolipase C

PPSE – Potencial Pós-Sináptico Excitatório

RAP1- Proteína associada a Ras, isoforma 1

Rsk2 - Proteína quinase S6 – ribossomal isoforma 2

SNC – Sistema Nervoso Central

STM – Memória de curta duração

UDP – Uridina difosfato

UTP – Uridina trifosfato

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1: Organização anatômica da formação hipocampal (KANDEL et al., 2014b, p. 1259).....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 2: Estrutura da adenosina(SACHDEVA; GUPTA, 2013)</i>	<i>29</i>
<i>Figura 3: Formação e catabolismo da adenosina(SACHDEVA; GUPTA, 2013).....</i>	<i>29</i>
<i>Figura 4: Estrutura transmembrânica dos receptores adenosinérgicos(SACHDEVA; GUPTA, 2013).....</i>	<i>31</i>
<i>Figura 5:Distribuição dos receptores adenosinérgicos nas diversas áreas do cérebro, relatando as mudanças de densidade de receptores de acordo com a estrutura.(SEBASTIÃO; RIBEIRO, 2009)</i>	<i>34</i>
<i>Figura 6: Cirurgia estereotáxica.....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 7: Aparato para infusão de fármacos através de cânulas-guia posicionadas durante a cirurgia estereotáxica</i>	<i>46</i>
<i>Figura 8: Introdução da cânula de infusão.</i>	<i>47</i>
<i>Figura 9: Representação esquemática de um corte histológico do hemisfério cerebral, sendo que a parte grifada, mostra a área alvo das infusões realizadas durante os experimentos (SILVA, 2005).....</i>	<i>49</i>
<i>Figura 10: Infusão bilateral intra CA1 dorsal de adenosina imediatamente pós-teste sem reforço prejudica a reconsolidação recente de memória de longa duração relativa à tarefa do LAM, conforme verificado 24 horas e 5 dias após esta reativação.....</i>	<i>55</i>
<i>Figura 11: O efeito amnésico induzido pela infusão bilateral intra-CA1 dorsal de adenosina imediatamente pós-teste sem reforço é parcialmente</i>	

<i>revertido por co-infusão com antagonista A1 e totalmente revertido por co-infusão com antagonista A3.....</i>	<i>58</i>
<i>Figura 12: Infusão bilateral intra CA1 dorsal de antagonistas A1, A2A, A2B e A3 imediatamente pós-teste sem reforço não afeta a reconsolidação recente de memória de longa duração.....</i>	<i>61</i>
<i>Figura 13: Infusão bilateral intra CA1 dorsal de agonistas A1, A2A, A2B e A3 imediatamente pós-teste sem reforço não afeta a reconsolidação recente de memória de longa duração relativa à tarefa do LAM, conforme verificado 24 horas e 5 dias após esta reativação, com exceção do agonista A₃ que prejudicou a estabilidade da memória de longa duração remota verificada 5 dias pós-teste.</i>	<i>64</i>
<i>Figura 14: Infusão bilateral intra CA1 dorsal de adenosina 24 horas após a última sessão de treino não prejudica a evocação de memória de longa duração relativa à tarefa do LAM, conforme verificado 48 horas e 6 dias após a última sessão de treino.</i>	<i>67</i>
<i>Figura 15: Infusão bilateral intra CA1 dorsal de adenosina imediatamente pós-teste com reforço não prejudica a reconsolidação recente de memória de longa duração relativa à tarefa do LAM, conforme verificado 24 horas e 5 dias após esta reativação.</i>	<i>69</i>
<i>Figura 16: : Infusão bilateral intra CA1 dorsal de adenosina 3 horas pós-teste sem reforço não prejudica a reconsolidação recente de memória de longa duração relativa à tarefa do LAM, conforme verificado 24 horas e 5 dias após esta reativação.....</i>	<i>71</i>
<i>Figura 17: Infusão bilateral intra córtex occipital médio-lateral de adenosina imediatamente pós-teste sem reforço não prejudica a reconsolidação</i>	

***recente de memória de longa duração relativa à tarefa do LAM, conforme
verificado 24 horas e 5 dias após esta reativação. 73***

RESUMO

Até o momento não existem evidências suficientes que expliquem o papel dos receptores adenosinérgicos na reconsolidação de memória espacial de longa duração. Neste trabalho nós demonstramos que quando a adenosina é infundida bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos (10 nmol/lado), imediatamente após uma sessão de teste de evocação realizada 24 horas pós-treino na tarefa do labirinto aquático de Morris (LAM), mas não 3 horas pós-teste, há prejuízo na reconsolidação recente da memória espacial previamente formada, conforme verificado em novos testes de evocação realizados 24 horas (reteste recente) e 5 dias (reteste remoto) após o primeiro teste. Este efeito amnésico da adenosina foi revertido pelos antagonistas A₁ (DPCPX, 50 nmol/lado) e A₃ (MRS 3777, 50 nmol/lado), mas foi mimetizado apenas pelo agonista A₃ (HEMADO), e apenas no reteste remoto, não tendo causado qualquer efeito amnésico no reteste recente. Dentre os antagonistas, o antagonista A₃ melhorou o desempenho mnemônico dos ratos no reteste remoto. Portanto nossos resultados indicam que a adenosina age na região CA1 hipocampal prejudicando a reconsolidação recente de memória espacial para a tarefa do LAM através de um mecanismo que envolve a ativação de receptores A₁ e A₃, e que a adenosina endógena presente na mesma região pode participar como modulador da reconsolidação recente da memória de longa duração remota, prejudicando sua persistência via receptores A₃.

ABSTRACT

There is currently insufficient evidence to explain the role of adenosinergic receptors on the reconsolidation of long-term spatial memory. Here, we show that when adenosine is bilaterally infused into the CA1 region of the dorsal hippocampus of rats (10 nmol/side), immediately after a 24-hour post-training retrieval test session in the Morris water maze (MWM), but not later, there is an impairment on the recent reconsolidation of the spatial memory previously formed, as it was verified in new retrieval tests performed 24 hours (recent retest) and 5 days (remote retest) after the first test. This amnesic effect of adenosine was blocked by A₁ antagonists (DPCPX, 50 nmol/side) and A₃ (MRS 3777, 50 nmol/side), but was mimicked only by the A₃ agonist (HEMADO), and only in the remote retest, inasmuch as any amnesic effect was seen in the recent retest. Among the antagonists, the A₃ antagonist enhanced the mnemonic performance of the rats in the remote retest. Therefore, our results indicate that adenosine acts in the hippocampal CA1 region, impairing the recent spatial memory reconsolidation of for the MWM task, through a mechanism involving the activation of A₁ and A₃ receptors, and that endogenous adenosine present in the same brain region may participate as modulator of the recent long-term memory reconsolidation, impairing its persistence through A₃ receptors.

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

I.1 – Memória

Define-se por memória a capacidade de armazenar informações que possam ser utilizadas posteriormente. Já o aprendizado refere-se a uma mudança no comportamento, que resulta da aquisição de conhecimento acerca do mundo, e a memória resulta do processo pelo qual esse conhecimento é codificado, armazenado e posteriormente evocado. Se essa possibilidade de armazenamento não existisse, o indivíduo esqueceria pessoas e lugares que antes conhecia e não seria capaz de utilizar e compreender a linguagem ou executar tarefas que anteriormente havia aprendido, não lembraria os momentos mais felizes ou mais tristes da sua vida, e perderia até mesmo o sentido da sua identidade pessoal. O aprendizado e a memória são essenciais para pleno funcionamento e sobrevivência independente de pessoas e animais (KANDEL et al., 2014a, cap. 65)

O primeiro dos processos mnemônicos é a *aquisição*, que consiste na entrada de um evento qualquer nos sistemas neuronais ligados a memória. Entendemos por “eventos” qualquer informação memorizável incluindo pensamentos e emoções, ou seja, todas aquelas características do mundo externo, e aquelas relacionadas ao interior. Após a entrada dessas informações, ocorre uma seleção do que realmente será armazenado, sendo preferido aquilo que foi mais relevante para cognição, mais marcantes para emoção, mais focalizados pela atenção, mais fortes sensorialmente ou aqueles que forem priorizados por critérios, até então desconhecidos. (KANDEL et al., 2014b).

Após a aquisição e a seleção, essas informações são armazenadas por um período de tempo, que pode se estender desde alguns segundos a até mesmo por anos. E esse processo é denominado de *retenção* da memória, ou seja, quanto tempo essas lembranças ficam de algum modo disponíveis para serem lembradas. Com o passar do tempo, alguns desses aspectos acabam aparentemente desaparecendo, processo denominado *esquecimento*, sendo então o esquecimento um passo limitante para o tempo de retenção dessas memórias.

Do que foi dito anteriormente, dentre os vários dados de um evento adquirido, alguns serão esquecidos imediatamente, outros serão armazenados durante um certo período e apenas poucos serão armazenados na memória por um período prolongado. Quando esse armazenamento é duradouro, diz-se que houve *consolidação* da memória, processo que permite que a informação seja armazenada por um longo período ou até mesmo permanentemente. A região do cérebro que mais tem sido estudada em relação a consolidação da memória é o sistema hipocampal. (DUDAI; EISENBERG, 2004)

I.2 Classificação das memórias

As memórias podem ser classificadas quanto ao seu tempo de retenção: memória ultrarrápida ou imediata, memória de curta duração e memória de longa duração; e também podem ser classificadas quanto à natureza de seu conteúdo: memória explícita ou declarativa, memória implícita ou não declarativa e memória operacional ou de trabalho (SQUIRE, ZOLA, 1996).

As mesmas estão sumarizadas de acordo com o **Quadro 1**.

Quadro 1: Classificação das memórias quanto a sua natureza do seu conteúdo e seu tempo de retenção.

Tipo de Memória quanto ao conteúdo	Subtipos	Características	Principais regiões cerebrais envolvidas em sua formação
Declarativa ou Explícita (pode ser descrita por meio de palavras ou por comportamento com significado atrelado)	• Episódica (eventos)	Tem uma referência temporal; memória de fatos seqüenciáveis temporalmente.	• Lobo Medial Temporal • Diencéfalo
	• Semântica (fatos)	Envolve conceitos atemporais; memória de conhecimentos, cultural. Mapas espaciais.	
Não-declarativa ou Implícita (não pode ser descrita por meio de palavras)	• De representação perceptual, memória pré-ativa (<i>priming</i>)	Representações (imagens, sons) sem significado aparente conhecido, mas úteis como dicas facilitatórias da evocação de informações inerentes; memória pré-consciente.	• Neocórtex
	• De procedimentos	Hábitos, habilidades, regras.	• Estriado • Cerebelo
	• Associativa	A habilidade de associar dois ou mais estímulos (condicionamento clássico), ou um estímulo a uma resposta (condicionamento operante).	• Amígdala (respostas emocionais) • Cerebelo (respostas musculares esqueléticas)
	• Não associativa	Atenua uma resposta (habituação) ou a aumenta (sensibilização) através da repetição de um mesmo estímulo.	• Reflexos
Operacional		Processamento contínuo (<i>on-line</i>) das informações recém-adquiridas e/ou recém-evocadas; permite o raciocínio e o planejamento do comportamento.	• Córtex pré-frontal • Córtex parietal posterior

I.3 Mecanismos celulares e moleculares envolvidos na memória

Duas estruturas críticas para a formação de memórias são o córtex pré-frontal e o hipocampo (SQUIRE; ZOLA, 1996). O córtex pré-frontal medeia memória de trabalho, fica disponível por um curto período de tempo. Já o hipocampo é composto por duas partes principais, o giro denteado e o corno de Amon, este subdividido em três campos enumerados de 1 a 3, e abreviados em CA1, CA2 e CA3. O hipocampo é necessário para que as informações declarativas sejam armazenadas de uma forma mais estável, por períodos que vão de dias até mesmo anos. Acredita-se que o sítio final para o armazenamento de memórias declarativas seja o córtex cerebral (DUDAI, 2004).

O hipocampo recebe sinais sensoriais do córtex entorrinal. A principal eferência do hipocampo se dá pelos neurônios piramidais de CA1, que se projeta de volta para o córtex entorrinal e ao subículo, outra estrutura do lobo temporal medial (**Figura 1**). As informações do córtex entorrinal alcançam os neurônios de CA1 por meio de duas vias excitatórias, uma via direta e outra indireta. Juntas, essas vias são as chamadas vias perfurantes. A via direta tem sua origem nos neurônios da camada III do córtex entorrinal, e estes estabelecem sinapses nos dendritos mais distais dos neurônios de CA1. Já na via indireta, os neurônios da camada II, alcançam os neurônios de CA1 por via trissináptica. Os neurônios da camada II projetam-se pela via perfurante para células granulares do giro denteado. Os axônios dessas células projetam-se nas vias musgosas, excitando células piramidais de CA3, e então os axônios dessas células projetam-se pela via dos colaterais de Schaffer para estabelecer sinapses excitatórias nas regiões mais proximais dos dendritos das células piramidais de CA1 (KANDEL et al., 2014b).

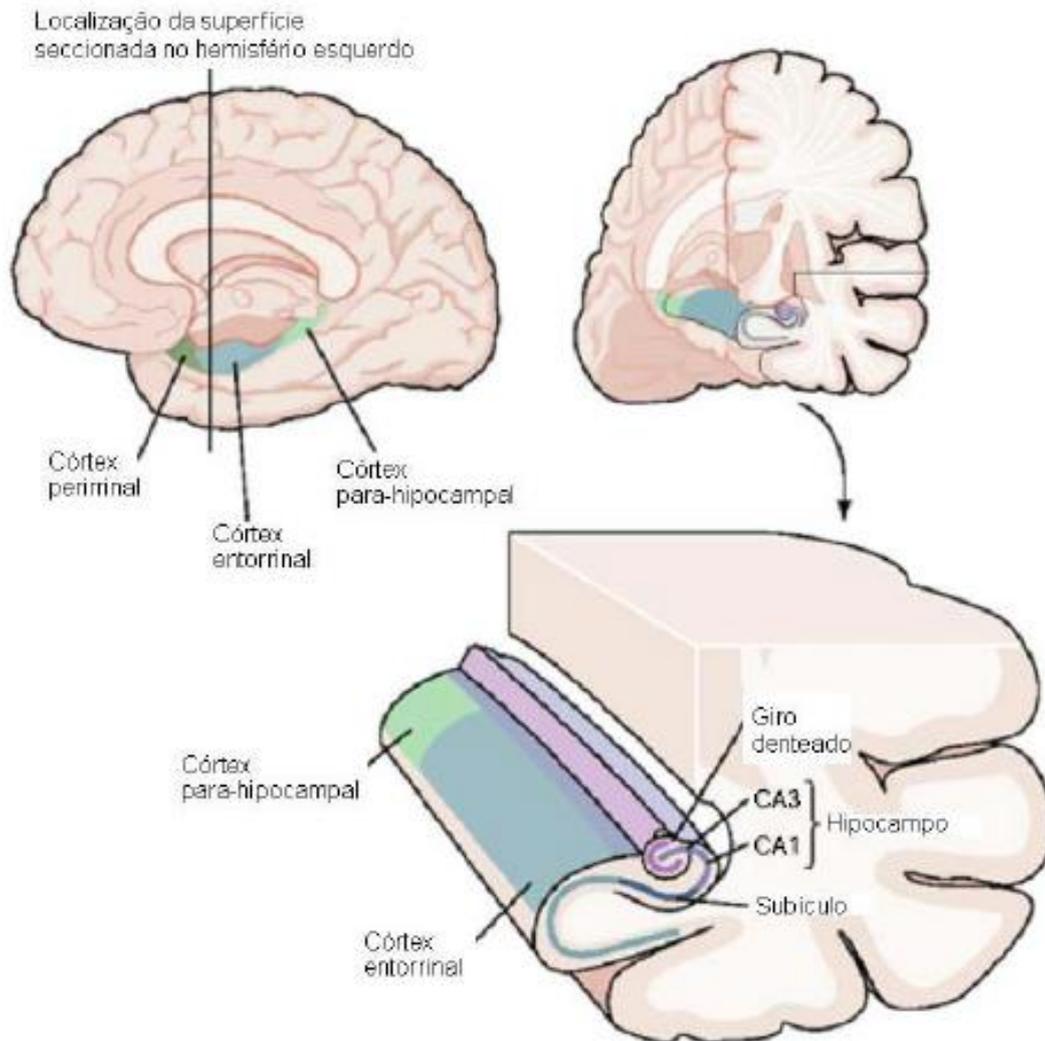


Figura 1: Organização anatômica da formação hipocampal (KANDEL et al., 2014b, p. 1259)

Lesões em relação a via direta parecem não alterar a aquisição de memórias, mas sim a capacidade de armazenar aquelas informações por um longo período, um processo chamado de *consolidação*.

Em 1973, Timothy Bliss e Terje Lomo (BLISS T, 1973) descobriram que o estágio inicial da via trissináptica, a via perfurante da camada II do córtex entorrinal para os neurônios granulares do giro denteado, é sensível à atividade prévia. Uma breve salva de estímulos de alta frequência produz uma potenciação de longa duração (LTP), um aumento de longa duração na amplitude dos potenciais excitatórios pós-sinápticos nos neurônios granulares do giro denteado. A LTP pode durar dias ou até mesmo semanas, fenômeno descrito pela primeira vez no hipocampo, justamente a região diretamente envolvida com

a consolidação de memórias. Estudos nessas diferentes vias mostraram que a LTP não é uma forma única de plasticidade sináptica, ao invés disso ela compreende uma família de processos que reforçam a transmissão sináptica em diferentes sinapses hipocâmpais (LAMPRECHT; LEDOUX, 2004). O glutamato liberado nas sinapses das vias musgosas liga-se a receptores glutamatérgicos dos tipos AMPA e NMDA na membrana pós-sináptica dos neurônios de CA3. Entretanto, geralmente os receptores NMDA tem apenas um papel menor na transmissão sináptica nessa via. Na célula pré-sináptica, o influxo de cálcio ativa um complexo adenilato ciclase dependente de cálcio/calmodulina, aumentando assim a produção de cAMP e ativando a proteína cinase A (PKA). Isso leva a um aumento de glutamato a partir dos terminais das fibras musgosas, resultando na LTP (LYNCH, 2004).

Já na LTP que ocorre na via das colaterais de Schaffer, assim como nos terminais das fibras musgosas da região de CA3, o glutamato liberado dos terminais das colaterais de Schaffer ativa ambos os receptores, AMPA e NMDA, na membrana pós-sináptica dos neurônios piramidais de CA1. Entretanto, diferente do que ocorre no sistema das fibras musgosas, a LTP na via das colaterais de Schaffer requer a ativação dos receptores NMDA na célula pós-sináptica, o que dispara uma complexa cascata de sinalização pós-sináptica. A abertura de canais de NMDA, diferentemente dos receptores AMPA, requer que os dois eventos ocorram de modo simultâneo. Primeiro, como qualquer receptor ionotrópico, o glutamato deve se ligar ao receptor NMDA para abrir o canal. No entanto, quando a membrana está no potencial de repouso ou apenas modestamente despolarizada, por uma estimulação sináptica fraca, a ligação do glutamato por si é insuficiente para que os receptores NMDA conduzam íons, pois o poro do receptor/canal é bloqueado por magnésio extracelular. Para que o receptor funcione de maneira eficiente, a membrana pós-sináptica deve sofrer uma despolarização significativa, para expelir, por repulsão eletrostática, o magnésio ligado. Devido ao bloqueio dos receptores de NMDA pelo magnésio, em voltagens negativas próximas ao potencial de repouso, os potenciais pós-sinápticos excitatórios são gerados principalmente pela abertura dos receptores AMPA. Uma salva de forte atividade pós-sináptica durante a indução de LTP abre um grande número de receptores AMPA, gerando um potencial excitatório pós-sináptico somado o suficiente para gerar um potencial de ação pós-

sináptico. O potencial de ação gera uma forte despolarização, capaz de expelir o magnésio do poro do receptor NMDA, permitindo a entrada de mais sódio e de cálcio por este canal, contribuindo ainda mais para a despolarização pós-sináptica. Assim, a ativação desses receptores leva a um aumento significativo na concentração intracelular de cálcio nas células pós-sináptica. O aumento de cálcio é vital para a indução da LTP. O aumento de cálcio ativa diversas vias intracelulares de transdução de sinais a jusante, incluindo a ativação da proteína cinase II dependente de cálcio/calmodulina (CaMKII), da proteína cinase C e da tirosina cinase. Essas vias de sinalização levam a alterações que estimulam a resposta da célula pós-sináptica ao glutamato e aumentam a quantidade de glutamato liberado dos terminais pré-sinápticos nas colaterais de Schaffer. A LTP apresenta características que a tornam muito apropriada para o mecanismo de armazenamento da memória de longa duração. Primeiro pelo que foi proposto por Timothy Bliss e Terje Lomo, segundo, pelo fato de ser induzida rapidamente e por fim, que uma vez induzida é estável por horas ou até mesmo dias (BLISS, 1993; LYNCH, 2004)

Até agora, um grande número de abordagens experimentais tem mostrado que a inibição da LTP hipocampal interfere com a memória espacial, um tipo de memória cuja consolidação mais depende da função hipocampal (MARTIN; CLARK, 2007). A tarefa comportamental mais empregada para avaliar esta memória é o labirinto aquático de Morris (D'HOOGHE; DEYN, 2001). Assim, temos o mecanismo da LTP como um cenário de fundo para estudar o funcionamento bioquímico de um tipo de memória cuja codificação e armazenamento é dependente do hipocampo.

I.4. Consolidação da memória

A consolidação de memórias é o processo em que ocorre estabilização dos traços mnemônicos componentes de uma memória após a sua aquisição (MCGAUGH, 2000). Durante o aprendizado ocorrem nas circuitarias neurais subjacentes alterações fisiológicas reversíveis na transmissão sináptica dos neurônios componentes, e essas alterações precisam ser estabilizadas para que essa memória possa persistir de alguma forma (MCGAUGH, 2000). As alterações reversíveis seriam o correspondente molecular da memória de curta duração (STM) e as alterações permanentes, da memória de longa duração (LTM). (LAMPRECHT and LEDOUX, 2004). Como as alterações moleculares são geralmente transitórias, não são um mecanismo suficiente para explicar a durabilidade da LTM (DUDAI, 2002), sendo que há fortes evidências de que a LTM necessita de alterações na morfologia sináptica, o que por sua vez, exige síntese de novas proteínas, sendo essa a principal característica que diferencia a LTM da STM (IZQUIERDO et al., 1998). Vários experimentos mostram que o período crítico para síntese proteica, é imediatamente após o treino (QUEVEDO et al., 2004). Ou seja, durante o treino ocorre a ativação de cascatas intracelulares de transdução de sinal nas redes neuronais requisitadas, que convertem as ações dos neurotransmissores envolvidos em respostas intracelulares. Assim, através da mobilização de segundos mensageiros, as respostas convergem rumo a modificação do padrão de expressão gênica, havendo síntese de novos RNA mensageiros, que posteriormente serão traduzidos em novas proteínas (DUDAI; EISENBERG, 2004). Essas novas proteínas sintetizadas serão empregadas na reestruturação das sinapses envolvidas, visando alterar de forma duradoura a sensibilidade dessas sinapses aos sinais neurotransmissores. As principais mudanças estruturais que ocorrem nessas sinapses são o aumento na quantidade de vesículas de armazenamento desses neurotransmissores, de sítios de liberação para essas vesículas e de terminais pré-sinápticos, concomitantemente com mudanças estruturais nas espinhas dendríticas pós-sinápticas, que aumentam sua capacidade de geração de potenciais pós-sinápticos excitatórios. (DUDAI; EISENBERG, 2004; LAMPRECHT; LEDOUX, 2004).

I.5 Reconsolidação de memórias

Após a consolidação, uma memória pode permanecer estavelmente armazenada, e circunstancialmente ser evocada quando necessário, mas isso não significa que esta memória estará cristalina e indefinidamente gravada, insensível a todo tipo de evento pós-consolidação. Ao invés disso, as memórias consolidadas tornam-se labilizadas quando reativadas, o que ocorre quando são evocadas. Durante essa nova fase de fragilidade, essas memórias podem ter sua retenção prejudicada se houver bloqueio da síntese de proteínas ou da transcrição gênica, de forma semelhante ao que ocorre na fase inicial de *consolidação*. (MORRIS et al., 2006; SILVA et al., 2008) Como um conjunto semelhante de interferências pode afetar a estabilidade de memórias quando agem tanto na fase inicial do aprendizado quanto logo após a evocação, o processo que converte a memória labilizada pela evocação em uma forma novamente estável é denominado *reconsolidação* (DUDA; EISENBERG, 2004)(ALBERINI, 2005).

A reconsolidação é justificável pelo ponto de vista de que é a capacidade que temos de modificar algumas memórias, para que memórias antigas possam ser integradas a memórias mais recentes, para que possamos atualizar memórias armazenadas no passado, ou até mesmo a substituição de memórias que representem de maneira mais fidedigna a nossa realidade atual (ALBERINI, 2005).

Entretanto, o processo de *reconsolidação* ocorre apenas quando há ausência do estímulo de reforço que havia estado presente durante o aprendizado. Se na evocação houver a presença do estímulo de reforço, o processo de labilização seguido da *reconsolidação* não ocorre, mas ao invés há apenas um reforço do traço mnemônico consolidado. Esta é uma sutil, porém importante diferença entre os processos de *consolidação* e *reconsolidação*. Por outro lado, se no momento da evocação houver um estímulo conflitante com aquele que desencadeou o aprendizado, dispara-se um outro processo, a *extinção*.(OSAN; TORT; AMARAL, 2011)

I.6 Memória espacial

Evidências indicam que o hipocampo é necessário para a aquisição, consolidação, evocação e armazenamento das informações espaciais (HOOGE; DEYN, 2010).

Muitas células hipocampais disparam quando um dado rato está em algum lugar em particular, cuja localização seja definida. Trata-se das *place cells*, ou então as chamadas células de lugar. As células de lugar são neurônios específicos no hipocampo que disparam quando o animal ocupa um lugar específico em um ambiente, e como elas possuem diferentes campos de localização (locais onde eles são acionados), é possível deduzir que essa diferente ativação de acordo com a localização do animal forneça um mapa cognitivo para o mesmo. Assim, o rato consegue fazer uma associação e reconhecer ambientes, devido ao fato de suas células de lugar que disparam, do mesmo local, quando o animal se encontra no mesmo local que já associou anteriormente. (MOSER; ROWLAND; MOSER, 2015).

As memórias espaciais possuem a importante característica de ser cognitivamente muito relevante, visto que vários estudos psicológicos demonstram que nosso raciocínio é ancorado em analogias espaciais (HERWEG; KAHANA, 2018) . Ainda, é o tipo de memória com melhor extrapolabilidade de resultados de modelos animais para humanos (CRYSTAL, 2016).

A tarefa do labirinto aquático de Morris (LAM) é talvez o paradigma de aprendizado mais utilizado para investigar o processamento de memórias espaciais (DE HOZ; MARTIN; MORRIS, 2004) (SCHIMANSKI; NGUYEN, 2004), onde os animais são treinados para escapar da água, utilizando dicas espaciais, na forma de figuras, fixadas no ambiente onde os ratos são treinados. Análises comportamentais do aprendizado no LAM indicam que há a mobilização de um grupo de processos cognitivos ligados ao armazenamento e evocação das informações visuais, e outro com o planejamento de estratégias de navegação.

I.7 Sistema adenosinérgico

I.7.1 Adenosina

Diferentes sistemas neurotransmissores participam em maior ou menor grau da modulação de todos os processos relacionados à memória (IZQUIERDO et al., 2006). No sistema nervoso central, a adenosina, o ATP (adenosina trifosfato), o UDP e o UTP (uridina difosfato e trifosfato, respectivamente) desempenham funções como moléculas de sinalização extracelular. (BURNSTOCK et al., 2011; SEBASTIÃO; RIBEIRO, 2009)

A adenosina é um nucleosídeo endógeno composto por adenina acoplada à uma ribose (**Figura 2**), sendo um composto essencial presente em todas as células vivas. Nos mamíferos, a concentração extracelular de adenosina está diretamente ligada à carga de energia celular, onde existe um ajuste fino entre a concentração de adenosina extracelular e adenosina intracelular. Dessa forma, a adenosina exerce um importante papel homeostático. Quando sua concentração intracelular aumenta, significa que muito ATP está sendo hidrolisado em ADP, bem como ADP em AMP e AMP em adenosina, sinalizando que por algum motivo está havendo um grande consumo de energia na célula, em uma taxa maior do que a produção de energia, isto é, de ATP (LATINI; PEDATA, 2001). No caso dos neurônios, isso é ainda mais destacável, visto que o neurônio é a célula que mais gasta energia por tempo devido sua atividade geradora de potenciais de ação, que demanda muita atividade de bombas Na^+ - K^+ -ATPase para manter o potencial de repouso da membrana neuronal. Quanto mais ativo estiver um neurônio, mais potenciais de ação ele produz, e de mais ATP precisa para suprir suas bombas Na^+ - K^+ -ATPase. Ainda, o neurônio utiliza como substrato energético apenas o lactato, desta forma sendo totalmente dependente do metabolismo oxidativo (KANDEL et al., 2014a, cap. 6) . Portanto, a adenosina é um importante sinalizador de situações geradoras de excitotoxicidade neuronal.

A adenosina é formada tanto em sítios intracelulares quanto extracelulares, e essas vias garantem a manutenção das concentrações de adenosina intracelular através de controle enzimático. Dois principais mecanismos foram identificados que a princípio, contribuem para a formação de

a adenosina extracelular: um é baseado na secreção de adenosina de forma bi-direcional, através de transportadores de nucleosídeos (ENT), e um segundo mecanismo baseado na adenosina formada pela quebra de ATP, por uma cascata de ectoenzimas, as ecto-5-nucleotidases (NTDase) (CUNHA, 2005). A liberação de adenosina pela quebra de ATP, é diretamente proporcional a frequência de estimulação nervosa, ou seja, quanto maior a frequência, maior a quebra e conseqüente formação de adenosina. Já a contribuição de adenosina via transportadores de nucleosídeos, para aumento da concentração extracelular de adenosina, se dá em frequências mais baixas de estimulação nervosa (CUNHA, 2005). Já intracelularmente, a principal enzima que influencia a concentração extracelular de adenosina, é a adenosina quinase (AK), que está presente na maioria dos tipos de células, incluindo neurônios e glia.

Existem essencialmente três sistemas que podem ser responsáveis pela inativação e remoção da adenosina nos tecidos: adenosina desaminase, adenosina quinase e o sistema de captação (LATINI; PEDATA, 2001) **(Figura 3)**. Os inibidores de adenosina desaminase (ADA) e adenosina quinase (AK) têm recebido considerável atenção na tentativa de aumentar as concentrações de adenosina endógena. A inibição da adenosina quinase exibe potencial neuroprotetor, em áreas como dor e inflamação (SACHDEVA; GUPTA, 2013) Sob condições hipóxicas, a adenosina atinge altas concentrações no interior da célula através da liberação de adenosina no espaço extracelular através de transportadores de nucleosídeos. A outra via principal que contribui para altas concentrações extracelulares de adenosina durante o estresse metabólico, é a liberação e degradação de nucleotídeos precursores de adenina (ATP, ADP e AMP) pela cascata de ectonucleotidases. O acúmulo de adenosina é limitado pelo seu catabolismo para a inosina, pela adenosina- desaminase. (SACHDEVA; GUPTA, 2013)

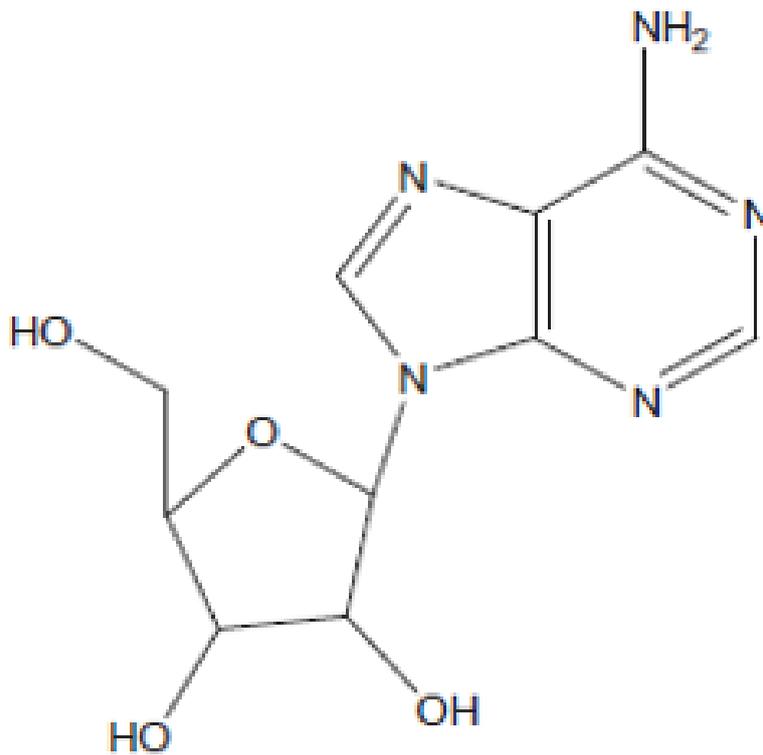


Figura 2: Estrutura da adenosina(SACHDEVA; GUPTA, 2013)

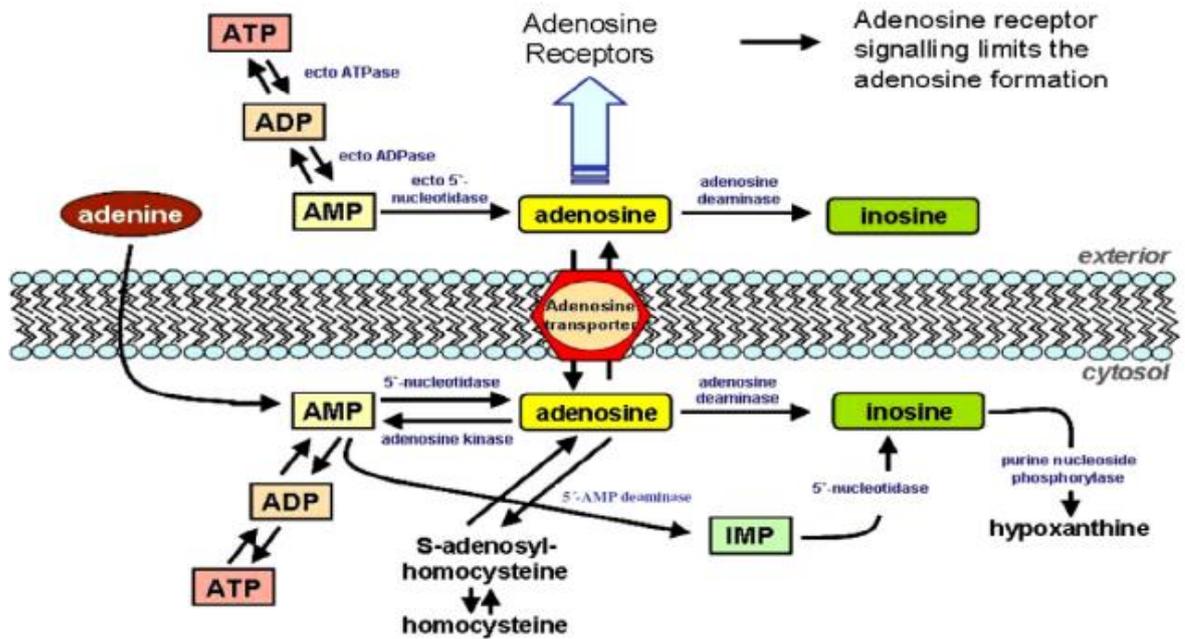


Figura 3: Formação e catabolismo da adenosina(SACHDEVA; GUPTA, 2013)

Há uma grande densidade de receptores adenosinérgicos em várias regiões cerebrais (SEBASTIÃO; RIBEIRO, 2009), que desempenham um papel-chave no controle da excitabilidade neuronal e, em particular, na liberação de neurotransmissores. Ou seja, a adenosina age como um “controlador do fluxo” de informações cerebrais, e não como transmissora de informação propriamente dita. Ainda não existem evidências disponíveis de que ocorra o acúmulo de adenosina em vesículas sinápticas para posterior liberação, entretanto, a adenosina está intimamente ligada à secreção de neurotransmissores e conseqüentemente à frequência e intensidade de disparo neuronal (CUNHA, 2005).

Sendo assim, em resumo, a adenosina afeta diretamente uma variedade de processos sinápticos, vias de sinalização e desempenha um papel importante na regulação de vários sistemas neurotransmissores no sistema nervoso central (SNC), mesmo não se tratando de um neurotransmissor clássico. Ao contrário de um neurotransmissor clássico, a adenosina não é armazenada em vesículas sinápticas, nem atua exclusivamente em sinapses. A sua secreção e absorção são mediadas por transportadores de nucleosídeos bidirecionais, em que a direção do transporte depende apenas do gradiente de concentração entre o citoplasma e o espaço extracelular. A adenosina é, portanto, considerada um neuromodulador, que afeta a atividade neural através de múltiplos mecanismos pré-sinápticos, controlando a liberação do neurotransmissor, e também agindo no terminal pós-sináptico causando hiper ou despolarização de neurônios e, de forma não sináptica, via efeitos regulatórios nas células da glia (BOISON et al., 2012)

I.7.2 Receptores adenosinérgicos

Até o momento foram descritos quatro tipos de receptores de adenosina ligados à membrana, denominados receptores A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃. Esses receptores foram clonados em diferentes espécies sendo eles caracterizados como receptores transmembrana, metabotrópicos, acoplados à proteína G (CUNHA, 2005; RALEVIC; BURNSTOCK, 1998). Primeiramente, os receptores de adenosina eram divididos em dois grandes grupos: receptores A₁ e receptores

A₃, ambos acoplados à uma proteína G inibitória (G_i), onde uma vez ativadas, regulariam negativamente a atividade da enzima adenilato ciclase; e receptores A_{2A} e A_{2B}, acoplados à uma proteína G excitatória (G_s), que ativaria de forma positiva a enzima adenilato ciclase. Entretanto, essa classificação já não é mais tão específica, mesmo sendo amplamente utilizada, devido ao fato de que, os receptores de adenosina mostraram ligação para diferentes proteínas G, com consequentes sistemas de transdução diferentes, de acordo com o tipo celular. Assim, a princípio, os receptores de adenosina são receptores com o potencial de se ligar a diferentes proteínas G e a diferentes sistemas de transdução de acordo com o seu grau de ativação e com a sua localização celular (SEBASTIÃO; RIBEIRO, 2009). (Figura 4)

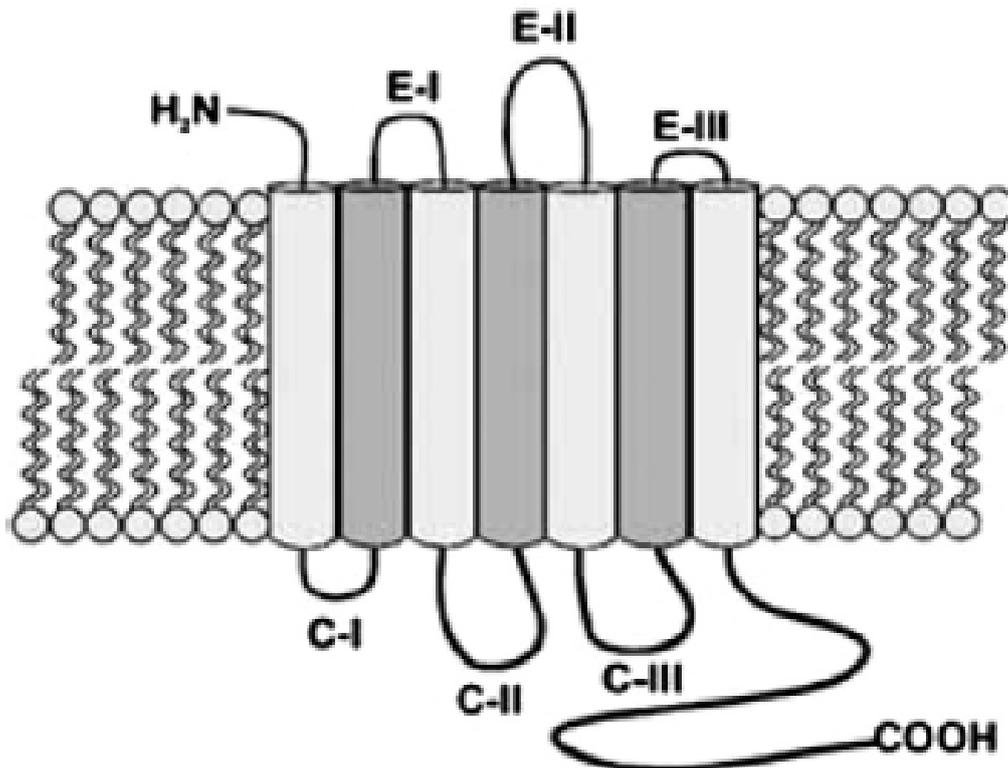


Figura 4: Estrutura transmembrânica dos receptores adenosinérgicos(SACHDEVA; GUPTA, 2013)

1.7.2.1 Receptor adenosinérgico A₁

O receptor A₁ é altamente expresso no córtex cerebral, no cerebelo, no hipocampo (**Figura 5**) e no corno dorsal da medula espinhal (SEBASTIÃO; RIBEIRO, 2009), sendo acoplado à uma G_i, onde a ativação dos receptores A₁ está associada a inibição da adenilato ciclase, à ativação das correntes de K⁺ e em alguns casos à ativação da PLC (fosfolipase C). Dessa forma, os receptores A₁ controlam eficientemente os receptores NMDA, bem como canais de cálcio sensíveis à voltagem localizados pós-sinapticamente. Além do fato de serem receptores de meia vida longa, e quando ativados de forma sustentada exibem *down regulation* em relação à densidade de receptores (CUNHA, 2005; SEBASTIÃO; RIBEIRO, 2009) (**Tabela 2**)

1.7.2.2 Receptor adenosinérgico A₂

Em contraste com as ações dos receptores A₁, relacionadas com a inibição da função neuronal, o conhecimento sobre o papel dos A₂ na modulação da atividade neuronal é mais limitado.

Diferentemente do receptor A₁, a estimulação do receptor A₂ resulta na ativação da adenilato ciclase, resultando na elevação do cAMP. Os receptores A₂ são mais amplamente distribuídos que os receptores A₁, e ligam a adenosina com menos afinidade do que os receptores A₁. Os receptores A₂ são subdivididos nos receptores A_{2A} e A_{2B}, com base na alta e baixa afinidade pela adenosina, respectivamente (LIVINGSTON; HEANEY; ENNIS, 2004). Os receptores A_{2A} são expressos no estriado e também, em níveis mais baixos, em outras regiões e em células gliais (**Figura 5**) (BOISON et al., 2012; SEBASTIÃO; RIBEIRO, 2009). Os receptores A_{2A} são abundantes no caudado putâmen e no núcleo accumbens (**Tabela 2**), onde demonstram modular a neurotransmissão de ácido c-aminobutírico (GABA), glutamato, glicina, acetilcolina, noradrenalina e serotonina em diferentes regiões do cérebro. (CUNHA, 2005)

Já os receptores A_{2B} são altamente expressos no trato gastrointestinal, na bexiga, no pulmão e nos mastócitos, sendo expressos em níveis baixos no cérebro (**Tabela 2**) (SEBASTIÃO; RIBEIRO, 2009). O receptor A_{2B}, embora

estruturalmente relacionado ao receptor A_{2A} , capaz de ativar a adenilato ciclase, é funcionalmente muito diferente. Foi postulado que este subtipo pode utilizar sistemas de transdução de sinal diferentes da adenilato ciclase devido a estas diferenças funcionais (LIVINGSTON; HEANEY; ENNIS, 2004). Entre todos os receptores de adenosina, o receptor A_{2B} é um receptor de baixa afinidade que se acredita que permanece silencioso sob condições fisiológicas e somente é ativado em consequência do aumento dos níveis de adenosina extracelular (Ryzhov et al., 2008). A ativação do receptor A_{2B} , ativa as enzimas amplificadoras adenilato ciclase e a fosfolipase C, através da ativação das proteínas G_s e G_q , respectivamente.

Curiosamente e diferentemente de receptores A_1 , estímulos estressantes crônicos causam um aumento da expressão e densidade desses receptores, muitas vezes de forma mascarada. (CUNHA, 2005)

1.7.2.3 Receptor adenosinérgico A_3

A presença de receptores adenosinérgicos A_3 foi demonstrada em ratos em 1992 (ZHOU et al., 1992) e em humanos em 1993 (SALVATORE, et al., 1993). O receptor A_3 é amplamente distribuído, sendo encontrado no rim, testículo, pulmão, mastócitos, eosinófilos, neutrófilos, coração e no córtex cerebral, tendo uma distribuição aparentemente moderada no cerebelo e hipocampo e baixa na maioria das outras áreas do cérebro (FREDHOLM et al., 2000; HUANG et al., 2005; LIVINGSTON; HEANEY; ENNIS, 2004; SEBASTIÃO; RIBEIRO, 2009) (**Tabela 2**). Assim como o receptor A_1 , a estimulação do receptor A_3 , resulta na inibição da adenilato ciclase. Dessa forma, sabe-se que estes receptores estão co-localizados no hipocampo e há uma interação entre esses receptores, surtindo efeitos opostos na liberação de glutamato. Além disso, quando comparados os receptores A_1 e A_3 , os receptores A_{2A} também podem facilitar a liberação de alguns neurotransmissores que não são controlados por A_1 , como GABA ou noradrenalina. Ainda, receptores de adenosina A_1 e A_{2A} são caracterizados por sua alta afinidade pela adenosina, enquanto os receptores A_{2B} e A_3 apresentam afinidade significativamente menor pela adenosina. (**Figura 5**).

AR distribution in the CNS

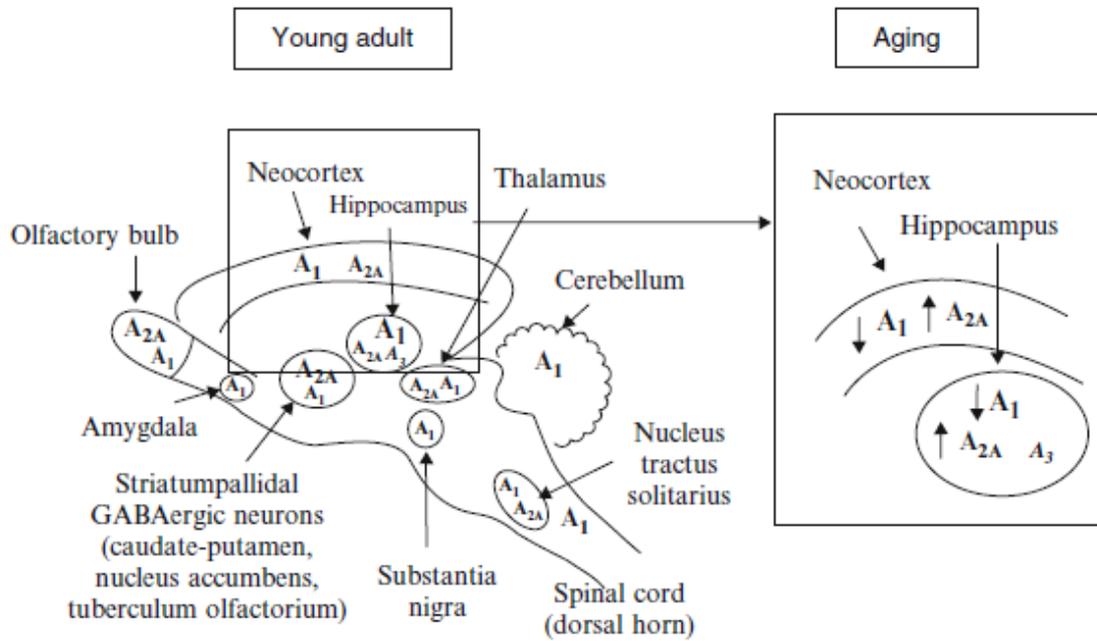


Figura 5: Distribuição dos receptores adenosinérgicos nas diversas áreas do cérebro, relatando as mudanças de densidade de receptores de acordo com a estrutura. (SEBASTIÃO; RIBEIRO, 2009)

Tabela 2: Nível de expressão dos receptores adenosinérgicos.

Nível de expressão	Receptor A₁	Receptor A_{2a}	Receptor A_{2b}	Receptor A₃
Alta expressão	Cérebro (córtex, hipocampo e cerebelo), medula espinhal e átrio. (POULSEN; QUINN, 1998)	Bulbo olfatório, timo e leucócitos (FREDHOLM et al., 2000)	Ceco, cólon e bexiga	Testículos e mastócitos (ratos) (POULSEN; QUINN, 1998)
Expressão intermediária	Outras regiões cerebrais, Músculo esqueléticos, fígado, Rim e tecido adiposo (POULSEN; QUINN, 1998)	Coração, pulmão, vasos sanguíneos e nervos periféricos (FREDHOLM et al., 2000)	Pulmão e vasos sanguíneos (Cacciari, 2005)	Cerebelo e hipocampo (POULSEN; QUINN, 1998)
Baixa expressão	Pulmões e pâncreas (POULSEN; QUINN, 1998)	Outras regiões cerebrais (FREDHOLM et al., 2000)	Tecido adiposo, glândula adrenal e cérebro (Cacciari, 2005)	Tireóide, maioria das regiões cerebrais, glândula suprarrenal, fígado e baço (POULSEN; QUINN, 1998)

CAPÍTULO II – HIPÓTESE

O **Quadro 2** resume a sequência de eventos característica da potenciação de longo prazo (LTP), um modelo já descrito acima, de plasticidade sináptica, sendo que o mesmo já foi comprovado experimentalmente e com muitas evidências de que seja a principal engrenagem em nível celular que subjaz a etapa de consolidação (WHITLOCK et al., 2006)

Quadro 2: Principais mecanismos moleculares que até o presente momento já foram demonstrados subjazerem a LTP na região CA1 do hipocampo.

- 1) Chegada dos primeiros potenciais de ação (PA) nos terminais pré-sinápticos dos colaterais de Schaffer, e indução da fusão das vesículas contendo glutamato (o principal neurotransmissor excitatório do SNC) com a membrana, resultando em liberação de glutamato na fenda sináptica;
- 2) Ligação do glutamato aos receptores AMPA, resultando na abertura do canal deste receptor, permitindo a entrada na célula de íons Na^+ ;
- 3) A estimulação repetitiva dos colaterais de Schaffer determina PPSEs na espinha dendrítica pós-sináptica, que se somam temporalmente, mantendo a despolarização. Quando esta atinge um limiar crítico, o receptor NMDA muda de conformação, havendo então a liberação do íon Mg^{2+} que bloqueia seu canal iônico. Este canal desbloqueado se abre desde que o glutamato da fenda se ligue em seu sítio específico no receptor NMDA. Trata-se, portanto, de um mecanismo de detecção de atividade simultânea na pré e na pós-sinapse;
- 4) A abertura do canal iônico do NMDA permite a entrada de Ca^{2+} na espinha dendrítica elevando o nível intracelular de Ca^{2+} ;
- 5) O aumento do nível intracelular de Ca^{2+} ativa na espinha dendrítica a enzima NOS. Esta produz NO a partir de L-arginina presente na célula;
- 6) O NO difunde-se ao longo de poucos diâmetros celulares, de modo que embora possa se mover livremente, seu raio de ação é limitado. Ao penetrar na terminação pré-sináptica, induzirá um aumento na probabilidade de liberação de vesículas contendo glutamato em resposta a um determinado potencial de ação, mas se, e apenas se, conseguir atingir a terminação em tempo de coincidir com a atividade ainda em curso de chegada de potenciais de ação nesta terminação. Resulta disso que a ação do NO é atividade-dirigida, atuando apenas naquelas sinapses que estiverem ativas no momento do desencadeamento da LTP, e ação sobre sinapses vizinhas pode ter a vantagem de amplificar a LTP em curso. Esta fase caracteriza a chamada fase imediata da LTP;
- 7) O glutamato presente na fenda também se liga a receptores do tipo metabotrópicos, mGlu1 e mGlu5. Ativados, estes receptores ligam-se a uma proteína G (G_q). Esta muda de conformação, e sua subunidade α_q diminui sua afinidade por GDP, trocando-o por GTP. Uma vez com GTP, a subunidade α separa-se das outras duas subunidades ($\beta\gamma$);
- 8) A subunidade α_q -GTP difunde-se pela face citoplasmática da membrana e liga-se a PLC, ativando-a. Esta ativação cessa quando a subunidade α hidroliza o GTP, devido sua atividade GTPásica intrínseca;
- 9) A PLC hidrolisa um lipídio de membrana, o PIP_2 , originando DAG e IP_3 . O primeiro difunde-se pela membrana, até se ligar a PKC. O segundo, IP_3 , difunde-se pelo citosol, ligando-se a um canal na membrana do retículo endoplasmático, que se abre e permite a saída de Ca^{2+} estocado em seu interior, aumentando o nível citoplasmático de Ca^{2+} ;
- 10) O Ca^{2+} presente no citoplasma liga-se a calmodulina, e o complexo Ca^{2+} /calmodulina ativa as AC1 e AC8, a CaMKII e, juntamente com o DAG, ativa a PKC. A CaMKII e a PKC fosforilam e ativam outras proteínas, dentre as quais as enzimas da via das MAPK;
- 11) A AC sintetiza cAMP a partir de ATP. O cAMP liga-se a subunidade regulatória da PKA, que então se separa da subunidade catalítica desta proteína. A subunidade catalítica da PKA, então desinibida, ativa no citosol a Rap1, e/ou migra para o núcleo, onde fosforila o fator de transcrição CREB, ativando-o;
- 12) A Rap1 fosforila no citoplasma a ERK1/2. A ERK1/2 fosforilada migra para o núcleo e fosforila a Rsk2, e/ou fosforila o fator de transcrição Elk-1. A Rsk2, então ativada, fosforila o fator de transcrição CREB.
- 13) CREB liga-se ao DNA numa seqüência de bases específica denominada CRE, que se situa nos promotores de um conjunto específico de genes, dentre eles um grupo de genes imediatos, ativando a transcrição destes genes. Já Elk-1 ativa a transcrição de um outro conjunto de genes, alguns deles pertencente ao conjunto que é ativado por CREB.
- 14) Os genes imediatos codificam mRNA para outros fatores de transcrição, que então se ligarão aos promotores de um outro conjunto de genes, os chamados genes tardios, ativando sua transcrição.
- 15) Os genes tardios codificam mRNA para proteínas estruturais, de adesão ou receptores (AMPA, NMDA, metabotrópicos), que serão requisitadas para a produção de novos sítios sinápticos que irão reforçar especificamente as sinapses que desencadearam todo este processo. Esta última etapa caracteriza a chamada fase tardia da LTP, que dura de dias a semanas.

- (a) – AC1 e AC8: isoformas 1 e 8 da adenilil ciclase; AMPA: ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-isoxazol propiônico (do inglês); ADP e ATP: adenosilil-difostato e adenosilil trifosfato, respectivamente (do inglês); CaMKII: proteína cinase dependente de cálcio/calmodulina isoforma II (do inglês); cAMP: adenosilil monofosfato cíclico (do inglês); CRE: elemento responsivo ao cAMP (do inglês); CREB: proteína ligante ao CRE (do inglês); DAG: diacilglicerol; ERK1/2: proteína cinase regulada por sinal extracelular, isoformas 1 e 2 (do inglês); GDP e GTP: guanossilil-difostato e guanossilil trifosfato, respectivamente (do inglês); IP₃: inositol trisfosfato (do inglês); MAPK: proteína cinase ativada por mitógenos (do inglês); mRNA: RNA mensageiro (do inglês); NMDA: N-metil-D-aspartado (do inglês); NOS: NO sintase; PIP₂: fosfatidil-inositol bisfosfato (do inglês); PKA: proteína cinase A (do inglês); PKC: proteína cinase C (do inglês); PLC: fosfolipase C (do inglês); PPSE: potencial pós-sináptico excitatório; Rap1: proteína associada a Ras, isoforma 1 (do inglês); Rsk2: proteína cinase S6-ribossomal, isoforma 2 (do inglês).

Devido ao fato de os receptores A₁ e A₃ ligarem-se à proteína G_i (proteína G inibitória) quando ativados pela adenosina, os níveis intracelulares do segundo mensageiro adenosilil monofosfato cíclico (cAMP) seriam reduzidos durante a ativação deste receptor. A consequência disto, de acordo com a sequência de eventos mostrada no Quadro 2, será uma menor ativação da PKA, e subsequentemente da ativação da transcrição de genes imediatos e tardios relacionados à plasticidade sináptica duradoura. Assim esperávamos que a ativação dos receptores A₁ e A₃ na região CA1 hipocampal após a sessão de evocação, causasse amnésia anterógrada nos ratos para a memória espacial relativa ao LAM. E o contrário também é verdadeiro para receptores A_{2a} e A_{2b}, onde, uma vez ativados, e acoplados à uma proteína G_s, ocorresse um aumento dos níveis intracelulares do segundo mensageiro adenosilil monofosfato cíclico (cAMP), não ocorreria amnésia anterógrada relacionada ao LAM.

CAPÍTULO III - OBJETIVOS

III. 1 Objetivo geral

Analisar, especificamente na área CA1 do hipocampo dorsal de ratos, o papel dos receptores adenosinérgicos A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ no processo de reconsolidação recente (testada 24 horas após a última sessão de treino) de memória de longa duração recente (testada 24 horas após a sessão de evocação) e remota (testada 5 dias após a sessão de evocação) de memória espacial adquirida na tarefa do labirinto aquático de Morris (LAM).

III. 2 Objetivos específicos

- 1) Investigar o efeito de diferentes doses de adenosina, infundida bilateralmente na área CA1 do hipocampo dorsal de ratos, imediatamente após a primeira sessão de teste sem reforço no LAM, realizada 24 horas após a última sessão de treino, sobre a reconsolidação:
 - a) de memória de longa duração recente, testada 24 horas após a primeira sessão de teste;
 - b) de memória de longa duração remota, testada 5 dias após a primeira sessão de teste;

- 2) Investigar qual ou quais receptores adenosinérgicos são necessários para as possíveis ações da adenosina sobre a reconsolidação de memória de longa duração recente para o LAM, através da co-infusão bilateral intra-CA1 dorsal de adenosina (dose ótima, objetivo anterior) com antagonistas específicos para os receptores A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃, imediatamente após a primeira sessão de teste sem reforço no LAM, realizada 24 horas após a última sessão de treino, verificando qual desses antagonistas consegue reverter algum possível efeito da adenosina.

- 3) Investigar se a adenosina endógena participa do processo de reconsolidação de memória de longa duração recente para o LAM,

através da infusão bilateral intra-CA1 dorsal de antagonistas específicos para os receptores A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃, imediatamente após a primeira sessão de teste sem reforço no LAM, realizada 24 horas após a última sessão de treino, verificando qual desses antagonistas tem algum efeito per se.

- 4) Confirmar por meio de qual receptor adenosinérgico a adenosina exerce algum efeito sobre a reconsolidação de memória de longa duração recente para o LAM, através da infusão bilateral intra-CA1 dorsal de agonistas específicos para os receptores A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃, imediatamente após a primeira sessão de teste sem reforço no LAM, realizada 24 horas após a última sessão de treino, verificando qual desses agonistas gera o mesmo efeito que adenosina.

CAPÍTULO IV - MATERIAIS E MÉTODOS

IV. 1 Animais experimentais

Para a realização dos estudos, o projeto foi aprovado pelo CEUA – UNICENTRO parecer nº 29/2017. Foram utilizados ratos Wistar machos adultos, sendo que estes pesavam de 225 a 350 gramas, provenientes dos Biotérios da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, da Universidade Estadual de Maringá e da Universidade Estadual de Londrina. Os animais foram mantidos em caixas apropriadas com capacidade para 5 animais, forradas com maravalha. Recebiam água e comida à vontade, e foram submetidos a ciclos de claro-escuro de 12 horas (luz a partir das 7:00 h e escuro a partir das 19:00 h), a uma temperatura ambiente mantida em torno de $23 \pm 2^\circ$ C. As caixas foram trocadas a cada 3 dias, e o máximo de precaução foi adotado com o intuito de minimizar o sofrimento dos animais e de reduzir também, o número de animais utilizados. Todos os experimentos estavam de acordo com as normas do CEUA/UNICENTRO, onde foi realizada toda a parte experimental e dos “*Principles of laboratory animal care*” (NIH publication N° 85-23, revised 1996).

IV.2 Procedimento cirúrgico

Para administração dos fármacos especificamente na região hipocampal CA1, os animais foram submetidos a cirurgia estereotáxica para a implantação de cânulas-guia, as quais possuíam 0,2 mm de diâmetro e 9,0 mm de comprimento, e eram posicionadas 1,0 mm acima da região alvo, neste caso a camada piramidal da região CA1 do hipocampo dorsal (**Figura 6**). As coordenadas utilizadas para a cirurgia estereotáxica foram adaptadas do Atlas anatômico de Paxinos e Watson, sendo elas as seguintes: Antero Posterior (AP) = - 4,2 mm; Médio Lateral (MD) = $\pm 3,0$ mm; Dorso Ventral (DV) = - 2,0 mm; Inclinação Latero-lateral (INCL LL) = 0° (PAXINOS GEORGE , WATSON CHARLES R.R, 1980).



Figura 6: Cirurgia estereotáxica. É feita estereotaxicamente a implantação de cânulas-guia em CA1 do hipocampo dorsal do animal, conforme coordenadas adaptadas do Atlas Anatômico de Paxinos e Watson (PAXINOS GEORGE, WATSON CHARLES R.R, 1980), para administração

Todo o procedimento foi realizado com os animais previamente anestesiados com 75 mg/kg de cetamina (König, São Paulo) mais 10 mg/kg de xilazina (Coopers, São Paulo), intra-peritoneal. As cânulas-guia descritas acima foram fixadas com acrílico junto ao osso parietal do crânio dos ratos. As cânulas utilizadas para a infusão dos fármacos possuem 0,05 mm de diâmetro e 10,0

mm de comprimento, de modo que sua extremidade se dirige para 1,0 mm além das cânulas-guia, portanto atingindo em relação ao bregma DV -3,0 mm, que é onde se situa a região CA1 hipocampal de acordo com as coordenadas do atlas de Paxinos & Watson, permitindo a infusão do fármaco exatamente nesta região, com o mínimo possível de danos mecânicos.

IV. 3 Tarefa do Labirinto Aquático de Morris (LAM)

Para a realização da tarefa do labirinto aquático de Morris (LAM), foi utilizado um tanque circular preto (180 cm de diâmetro e 55 cm de altura) com 35 cm de água mantida a 21-24°C. O tanque é virtualmente dividido em quatro quadrantes, sendo que no centro de um desses quadrantes se encontra uma plataforma 12 cm de diâmetro. Esta plataforma encontra-se e submersa 2 cm abaixo do nível da água.

IV.3.1. Versão espacial

Na sua versão espacial, dicas visuais, na forma de iluminação indireta assimétrica da sala do LAM, e com cartazes com cores e padrões geométricos diferentes fixados na parede, servem de pista para a formação de um mapa espacial. O treino consiste de uma sessão diária de 8 largadas, executada durante 5 dias. A plataforma de escape é mantida na mesma posição durante o treino. Nas sessões de treino, em cada largada, o rato é largado gentilmente de uma de quatro posições cardeais, em uma sequência pseudoaleatória. O rato tem até 60 segundos para encontrar a plataforma. Se não o fizer, é gentilmente guiado pelo experimentador até a plataforma. Uma vez sobre a plataforma, o rato permanece nela por 30 segundos, após o que se inicia a próxima largada. Após a última largada, o rato é seco e devolvido a sua caixa moradia. Para o teste, realizado 24 horas após a última sessão de treino, a plataforma é retirada do tanque, e o animal é largado da posição do tanque mais distante do local onde ficava a plataforma alvo nas sessões de treino. O tempo que o animal permanece nadando no quadrante alvo (quadrante onde a plataforma de escape esteve localizada durante o treino) e o tempo que leva para atingir uma área centrada no local da plataforma são utilizados como os principais indicadores de retenção

do traço mnemônico. Nos experimentos de reconsolidação, o mesmo grupo de animais passou por um segundo teste que foi realizado 24 horas um após e 5 dias após o primeiro teste, na ausência da plataforma de escape.

IV.3.2. Versão espacial: Controle Reforço

Para assegurar que os efeitos observados se devem de fato a reativação não-reforçada do traço mnemônico, na primeira sessão de teste, que precede as infusões, houve a presença da plataforma (reforço). Após o rato ter encontrado a plataforma, ele permaneceu nela por 30 segundos.

IV.3.3. Versão espacial: Controle Infusão

Para assegurar que os efeitos observados se devem à infusão dos fármacos apenas quando ocorrem imediatamente após a sessão de reativação não-reforçada, e não à infusão dos fármacos per se, não houve a primeira sessão de teste no dia respectivo, mas apenas a infusão dos fármacos.

IV.3.4. Versão espacial: Controle Temporal

Para assegurar que os efeitos observados após a infusão dos fármacos imediatamente após a primeira sessão de reativação são tempo específicos, a infusão dos fármacos foi realizada 3 horas (em vez de imediatamente) após a primeira sessão de reativação sem reforço.

IV.3.5. Versão espacial: Controle Estrutura

Para assegurar que os efeitos observados após a infusão dos fármacos imediatamente após a primeira sessão de reativação sem reforço são estrutura específicos, a infusão dos fármacos foi feita 1 mm acima da região CA1 do hipocampo dorsal, atingindo assim outra estrutura, o córtex occipital médio-lateral.

IV. 4 Tratamento farmacológico

Imediatamente após o primeiro teste 24 horas pós-treino no LAM, os animais receberam infusões bilaterais de 1,0 µl de veículo com ou sem fármacos

dissolvidos, através de suas cânulas guias diretamente em regiões cerebrais pré-definidas. Para realização da infusão foi utilizada uma cânula de infusão (0,05 mm de diâmetro e 10,0 mm de comprimento), conectada a uma micro-seringa Hamilton por um tubo de polietileno, onde esse aparato foi carregado logo antes da infusão com o material a ser infundido. Após a introdução da cânula de infusão na luz da cânula-guia, a infusão foi iniciada lentamente, durante 30 segundos em um lado e depois no outro, sendo que ao término de cada infusão, a cânula foi deixada no local por 30 segundos adicionais para evitar refluxo. **(Figura 7 e 8)**



Figura 7: Aparato para infusão de fármacos através de cânulas-guia posicionadas durante a cirurgia estereotáxica



Figura 8: Introdução da cânula de infusão. Após a introdução da cânula de infusão na luz da cânula-guia, inicia-se infusão lentamente, durante 30 segundos e a cânula é deixada no local por 30 segundos adicionais para evitar refluxo

IV. 5 Controle histológico da localização das cânulas-guia e do local da infusão

A constatação do posicionamento da implantação das cânulas anatomicamente e também do local que foi atingido pela infusão foi realizada *post-mortem*, sendo o sacrifício dos animais executado por decaptação. Para isso, depois de todos os procedimentos comportamentais aos quais os animais foram submetidos, os mesmos receberam 1,0 µl de uma solução de azul de metileno 0,1% através das cânulas da mesma forma que foi realizada durante a infusão pós-teste descrita anteriormente nos animais. Quinze minutos depois disto, eles foram sacrificados e seus cérebros removidos e colocados em uma solução de formol 4% por um período de 4 a 7 dias. Após isto procedeu-se a análise histológica, sendo considerados para análise estatística somente aqueles animais onde a localização da mancha de azul de metileno encontrou-se dentro de um raio de 2 mm do local desejado. **(Figura 9)**

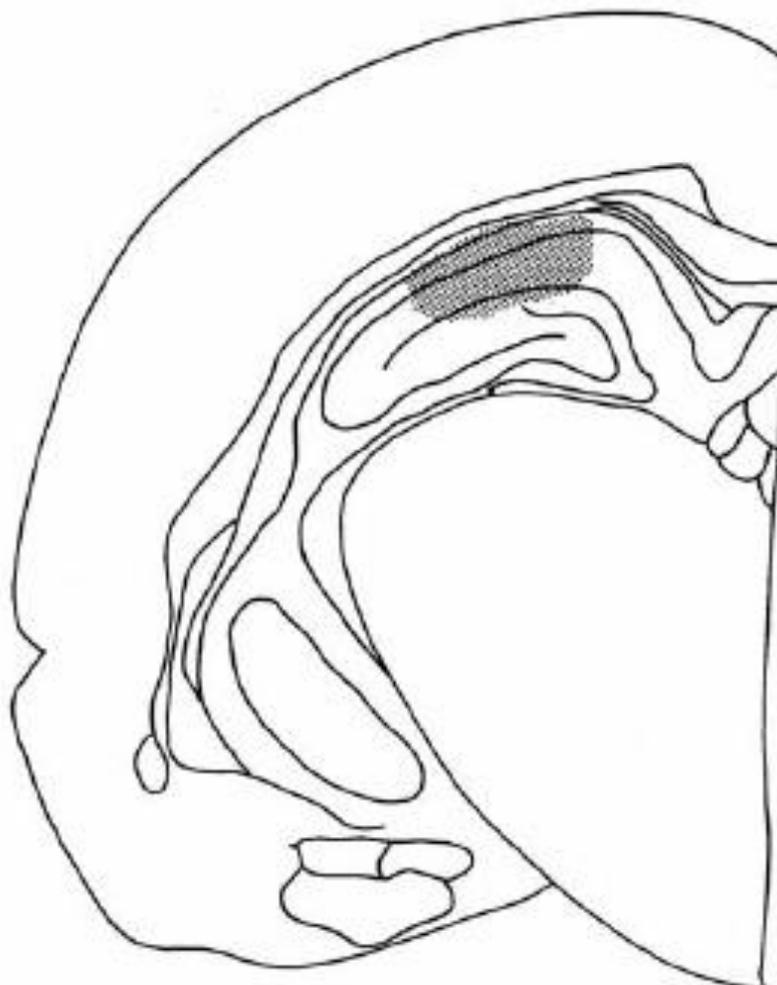


Figura 9: Representação esquemática de um corte histológico do hemisfério cerebral, sendo que a parte grifada, mostra a área alvo das infusões realizadas durante os experimentos (SILVA, 2005)

IV. 6 Fármacos utilizados

Nesse estudo foram utilizadas 9 drogas diferentes nas infusões intra-CA1 do hipocampo dos animais. A adenosina oriunda da Sigma (A9251) e o restante oriundos da Tocris Bioscience, conforme descrito no **Quadro 3**.

Quadro 3. Descrição das drogas que foram utilizadas assim como os receptores alvo de cada uma, que foram administrados intra-CA1 ao longo do experimento.

Função	Nome	Receptor alvo	Solubilizado em	Código Tocris
Agonistas	CPA	A1	DMSO	1702
	PSB 0777	A _{2A}	DMSO	4334
	BAY 60-6583	A _{2B}	DMSO	4472
	HEMADO	A3	DMSO	1579
Antagonistas	DPCPX	A1	DMSO	439
	SCH 442416	A _{2A}	DMSO	2463
	PSB 603	A _{2B}	DMSO	3198
	MRS 3777	A3	DMSO	2403

IV.7 N amostral.

Cada grupo experimental do LAM corresponde a 12 animais em média, para que, considerando-se o desvio padrão médio dos parâmetros medidos inerente a esta tarefa, seja possível a detecção de diferença estatística minimizando-se o erro tipo I com o mínimo de uso de animais.

A quantidade de ratos utilizados em cada grupo, a partir desta premissa, consta na descrição dos resultados mais adiante.

IV.8 Descarte de resíduos

Ao final dos experimentos, as carcaças dos animais eutanasiados foram encaminhadas a um freezer próprio para este fim, para depois terem sido encaminhados para o Departamento de Veterinária que dispõe de um incinerador para tais resíduos.

Materiais sujos de sangue (ponteiras plásticas e agulhas de infusão de fármacos) e outros resíduos biológicos (pelos, pele e sobras de tecidos) foram descartados em sacos de lixo para material biológico contaminado, que posteriormente foi destinado a incineração (Laboratório de Anatomia Veterinária, do Departamento de Veterinária da UNICENTRO).

IV.9 Análise Estatística dos Dados

Os dados foram verificados quanto ao seu perfil de distribuição normal através do teste de Shapiro-Wilk. Os dados comportamentais são apresentados como média \pm erro padrão da media (SEM).

Utilizamos como parâmetros de avaliação de aprendizado durante as sessões de teste no LAM o tempo de latência do animal, ou seja, o tempo em que ele levou para chegar ao local onde a plataforma se encontrava nos dias de treino, e o tempo em que o mesmo persistia procurando a plataforma dentro do quadrante alvo. A análise foi feita com base na comparação de grupos através do teste de ANOVA de uma via e teste pos hoc de Dunett de todos os grupos contra o grupo veículo. Ainda, a percentagem média de tempo gasto por cada grupo experimental no quadrante alvo na tarefa do LAM foi comparada à média teórica de 25% através do teste t simples, para determinar se houve retenção de memória de longo prazo em cada grupo. O software Grand Prism foi utilizado para estas análises estatísticas e para a elaboração dos gráficos.

CAPÍTULO V – RESULTADOS

V.1 Curva dose-resposta

Para analisar o efeito da administração intra-hipocampal da adenosina na reconsolidação recente de uma memória espacial, ratos Wistar foram treinados no LAM, como descrito no capítulo anterior, e então receberam infusões bilaterais intra-CA1 de veículo (salina) ou adenosina a diferentes doses imediatamente após a sessão de teste sem reforço realizada 24 horas após a última sessão de treino. Primeiramente, observamos que ao longo dos dias de treino os animais aprenderam a tarefa, como verificado pela diminuição do tempo médio de latência dos animais (Figura 10.A), e que os animais conseguiram consolidar uma memória de longo prazo recente para esta tarefa, como verificado pela latência (Figura 10.B) e pela permanência no quadrante-alvo (Figura 10.C) durante a primeira sessão de teste sem reforço realizada 24 horas após a última sessão de treino.

A adenosina, nas doses de 10 e 100 nmol/lado diminuiu a permanência no quadrante-alvo em sessões de teste sem reforço realizadas 24 horas e 5 dias após a primeira sessão de teste sem reforço (Figura 10.C). Ainda analisando as segunda e terceira sessões de teste, verifica-se também que quando comparamos a permanência no quadrante-alvo com o percentual default (sem aprendizado prévio) de permanência em cada quadrante (percentual teórico de 25% da duração da sessão de teste), os grupos que receberam a infusão 0 minuto pós-teste de adenosina 10 ou 100 nmol/lado não apresentaram diferença significativa em suas permanências, corroborando que a adenosina nestas doses causou prejuízo no desempenho da reconsolidação de longo prazo recente (segundo teste 24 horas pós-teste) e remota (terceiro teste 5 dias pós-teste).

A adenosina não causou qualquer desses efeitos nas doses de 0,1 ou 1,0 nmol/lado, evidenciando que o efeito da adenosina na reconsolidação recente de memória espacial de longa duração é dose dependente. Nos próximos experimentos, portanto, trabalhamos com a dose de 10 nmol/lado de adenosina,

a menor dose que apresentou efeito. Esta também foi a dose de trabalho dos agonistas.

Para garantir que os antagonistas cumprissem seu papel de bloqueio de seus receptores respectivos, trabalhamos com doses em excesso em relação à dose de trabalho da adenosina, limitados pela capacidade de concentração em seus veículos. Assim a dose de trabalho de todos os antagonistas foi de 50 nmol/lado.

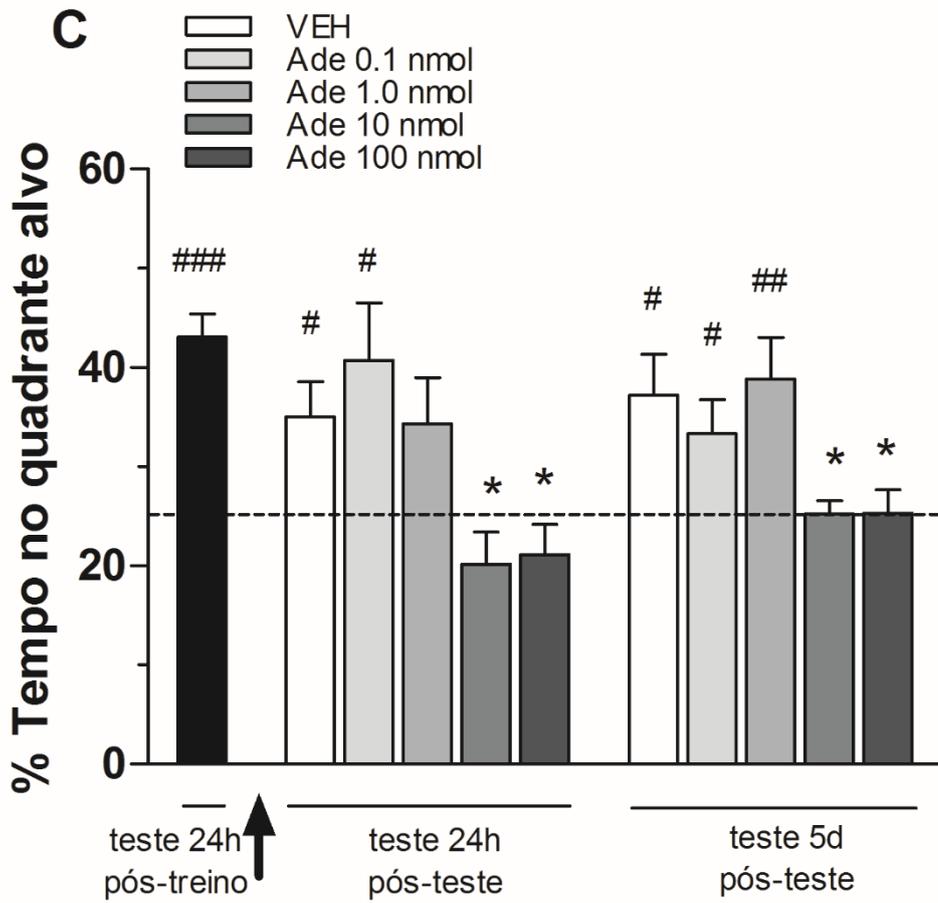
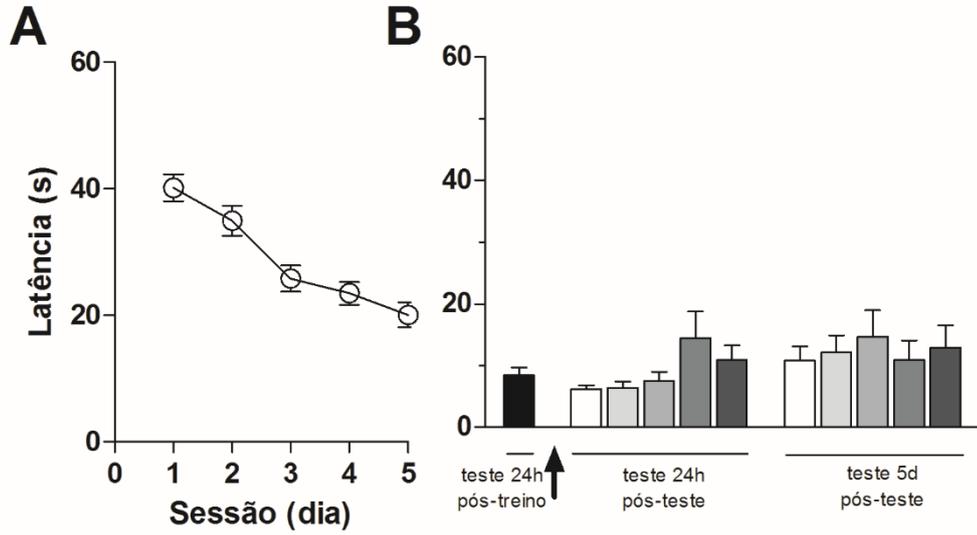
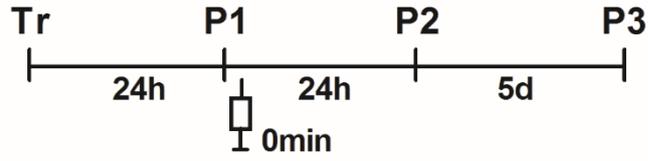


Figura 10: Infusão bilateral intra CA1 dorsal de adenosina imediatamente pós-teste sem reforço prejudica a reconsolidação recente de memória de longa duração relativa à tarefa do LAM, conforme verificado 24 horas e 5 dias após esta reativação. Ratos com cânulas de infusão implantadas bilateralmente mirando a região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados durante 5 d na versão espacial do LAM. 24 h depois da última sessão de treino, os ratos foram randomicamente designados para um de cinco grupos experimentais e submetidos a um teste de evocação de 60 s na ausência da plataforma de escape (P1, barra preta). Adenosina (Ade 0,1, 1,0, 10 e 100 nmol/lado, barras cinzas) ou veículo (VEH, barra branca) foi bilateralmente infundida (1,0 µl) na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos imediatamente após este teste de evocação 24 horas pós-treino. **(A)** Latência média de oito largadas por dia de treino de todos os ratos até a localização da plataforma de escape. **(B e C)** A retenção da memória foi verificada em um segundo teste de 60 s realizado 24 h após o primeiro teste, e em um terceiro teste de 60 s realizado 5 d após o primeiro teste. Os dados estão expressos como médias (\pm EM) da latência de nado até o local prévio da plataforma de escape **(B)** ou como a porcentagem de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo **(C)**. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ vs. percentual teórico de 25% em teste t de Student. * $p < 0,05$ vs. VEH em teste de Dunnett após ANOVA de uma via. ($n = 7 - 14$ por grupo).

V.2. Reversão receptor-específica do efeito amnésico da adenosina sobre a reconsolidação recente de memória espacial de longa duração recente e remota

Após a obtenção da curva dose-resposta, resolvemos então estudar a participação individual dos receptores A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 no efeito amnésico provocado pela adenosina conforme descrito anteriormente. Para isto, realizamos a co-infusão bilateral intra-CA1 de adenosina (10 nmol/lado) mais um dos antagonistas dos receptores A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3 (50 nmol/lado) imediatamente após a sessão de teste sem reforço realizada 24 horas após a última sessão de treino. A dose dos antagonistas infundida foi maior do que a de adenosina para assegurar sua inibição frente a adenosina. Novamente, observamos que ao longo dos dias de treino os animais aprenderam a tarefa, como verificado pela diminuição do tempo médio de latência dos animais (Figura 11.A), e que os animais conseguiram consolidar uma memória de longo prazo recente para esta tarefa, como verificado pela latência (Figura 11.B) e pela permanência no quadrante-alvo (Figura 11.C) durante a primeira sessão de teste sem reforço realizada 24 horas após a última sessão de treino.

O antagonista A_1 (DPCPX) e o antagonista A_3 (MRS 3777) reverteram o efeito amnésico da adenosina conforme verificado no segundo teste 24 horas pós-teste, em que os animais que receberam adenosina co-infundida com esses antagonistas desempenharam uma latência para o local prévio da plataforma (Figura 11.B) e uma porcentagem de tempo de nado gasto no quadrante-alvo

(Figura 11.C) tais quais o grupo veículo. No caso da porcentagem de tempo de nado gasto no quadrante-alvo, a dos grupos que receberam co-infusão de adenosina e antagonista A_1 ou A_3 foi significativamente maior do que a porcentagem default teórica de 25% por quadrante, diferentemente dos outros grupos que apresentaram prejuízo neste parâmetro, com desempenho similar ao grupo que recebeu apenas adenosina, e não diferindo significativamente da porcentagem default teórica de 25% por quadrante.

No terceiro teste realizado 5 dias após a primeira sessão de teste, os resultados encontrados foram muito parecidos com os do segundo teste quanto ao parâmetro da porcentagem de tempo de nado gasto no quadrante-alvo (Figura 11.C). Os antagonistas A_1 e A_3 quando co-infundidos com a adenosina resultaram em um desempenho dos ratos neste parâmetro não distinguível do desempenho do grupo veículo. Porém, apenas o grupo co-infundido com adenosina e antagonista A_3 apresentou uma porcentagem de tempo de nado gasto no quadrante-alvo significativamente maior do que a porcentagem default teórica de 25%. Assim não podemos concluir que o grupo co-infundido com adenosina e antagonista A_1 conseguiu um desempenho neste parâmetro compatível com estabilização desta memória para evocação remota.

Ainda no terceiro teste, também houveram diferenças significativas quanto a latência para o local prévio da plataforma (Figura 11.B), em que os grupos que receberam co-infusão de adenosina e antagonista A_1 ou antagonista A_{2B} (PSB 603) apresentaram latências significativamente maiores que o grupo veículo. Vale frisar aqui que este parâmetro, o da latência de escape para o local prévio da plataforma em uma sessão de teste, é um parâmetro secundário que visa aferir a precisão (o rato se dirigiu primeiramente para este local?) da evocação da memória armazenada, utilizado como parâmetro acessório ao parâmetro da porcentagem de tempo de nado gasto no quadrante-alvo, este sim o parâmetro principal que afere a exatidão (o rato está procurando pela plataforma exatamente no local em que ela se encontrava?) e a intensidade (quanto de seu tempo de nado o rato gasta procurando a plataforma no local correto?) da evocação da memória armazenada (D'HOOGE; DEYN, 2001; MORRIS, 1984). Assim, o conjunto desses resultados neste experimento nos permite concluir apenas que o efeito amnésico da adenosina verificado na reconsolidação recente de memória de longo prazo depende de sua ação sobre

os receptores A_1 e A_3 quando esta memória é evocada 24 horas após a reativação recente sem reforço que disparou o processo de reconsolidação, mas apenas de sua ação sobre receptores A_3 quando esta memória é evocada em um prazo remoto, 5 dias após a reativação recente sem reforço.

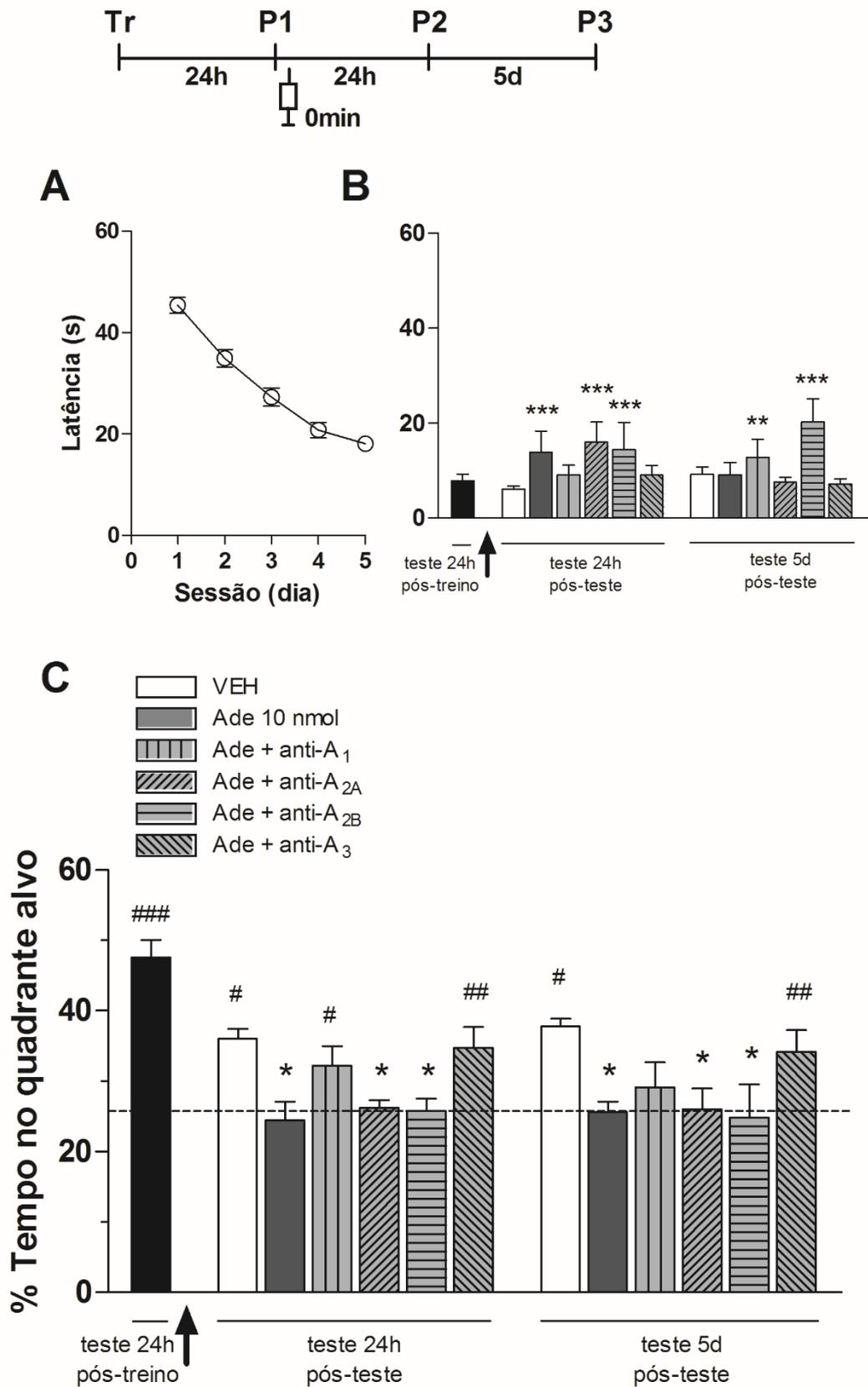


Figura 11: O efeito amnésico induzido pela infusão bilateral intra-CA1 dorsal de adenosina imediatamente pós-teste sem reforço é parcialmente revertido por co-infusão com antagonista A1 e totalmente revertido por co-infusão com antagonista A3. Ratos com

cânulas de infusão implantadas bilateralmente mirando a região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados durante 5 d na versão espacial do LAM. 24 h depois da última sessão de treino, os ratos foram randomicamente designados para um de seis grupos experimentais e submetidos a um teste de evocação de 60 s na ausência da plataforma de escape (P1, barra preta). Os ratos receberam infusão bilateral intra-CA1 (1,0 µl) de veículo (VEH, barra branca), adenosina (Ade; 10 nmol/lado, barra cinza) ou adenosina (10 nmol/lado) mais 50 nmol/lado de DPCPX (Ade + anti-A₁, barra cinza hachurada vertical), SCH 442416 (Ade + anti-A_{2A}, barra cinza hachurada em aclone), PSB 603 (Ade + anti-A_{2B}, barra cinza hachurada horizontal) ou MRS 3777 (Ade + anti-A₃, barra cinza hachurada em declive) imediatamente após este teste de evocação sem reforço 24 horas pós-treino. **(A)** Latência média de oito largadas por dia de treino de todos os ratos até a localização da plataforma de escape. **(B e C)** A retenção da memória foi verificada em um segundo teste de 60 s realizado 24 h após o primeiro teste, e em um terceiro teste de 60 s realizado 5 d após o primeiro teste. Os dados estão expressos como médias (± EM) da latência de nado até o local prévio da plataforma de escape **(B)** ou como a porcentagem de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo **(C)**. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ vs. porcentual teórico de 25% em teste *t* de Student. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs. VEH em teste de Dunnett após ANOVA de uma via. ($n = 11 - 18$ por grupo).

V.3 Participação da adenosina endógena na reconsolidação recente de memória espacial de longa duração recente e remota

Neste experimento investigamos se os receptores A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ participam constitutivamente do processo de reconsolidação recente de memória de longa duração recente e remota. Para isto, realizamos a infusão bilateral intra-CA1 dos antagonistas dos receptores A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ (50 nmol/lado) imediatamente após a sessão de teste sem reforço realizada 24 horas após a última sessão de treino. Novamente, observamos que ao longo dos dias de treino os animais aprenderam a tarefa, como verificado pela diminuição do tempo médio de latência dos animais (Figura 12.A), e que os animais conseguiram consolidar uma memória de longo prazo recente para esta tarefa, como verificado pela latência (Figura 12.B) e pela permanência no quadrante-alvo (Figura 12.C) durante a primeira sessão de teste sem reforço realizada 24 horas após a última sessão de treino.

Neste experimento não foram observadas diferenças significativas entre grupos na segunda sessão de teste realizada 24 horas após a sessão de reativação sem reforço quanto a porcentagem de tempo de nado gasto no quadrante-alvo (Figura 12.C). Porém, na terceira sessão de teste, realizada 5 dias após a sessão de reativação sem reforço, verificamos que o grupo que recebeu a infusão de antagonista A₃ (MRS 3777) demonstrou um desempenho significativamente melhor do que o grupo veículo, indicando que a adenosina endógena pode participar via receptores A₃ como um modulador cuja ação

contribuiu para uma diminuição da estabilidade de memória espacial de longa duração remota.

Interessantemente, o antagonista A_1 (DPCPX) causou um aumento significativo da latência para o local prévio da plataforma nos segundo e terceiro testes em relação aos respectivos grupos controle (VEH) (Figura 12.B). Apesar da diferença significativa, a magnitude desse aumento é pequena, não permitindo formar alguma conclusão sobre algum efeito da adenosina endógena sobre os receptores A_1 , visto que não houve um resultado respaldante semelhante no parâmetro de porcentagem de tempo nado no quadrante-alvo.

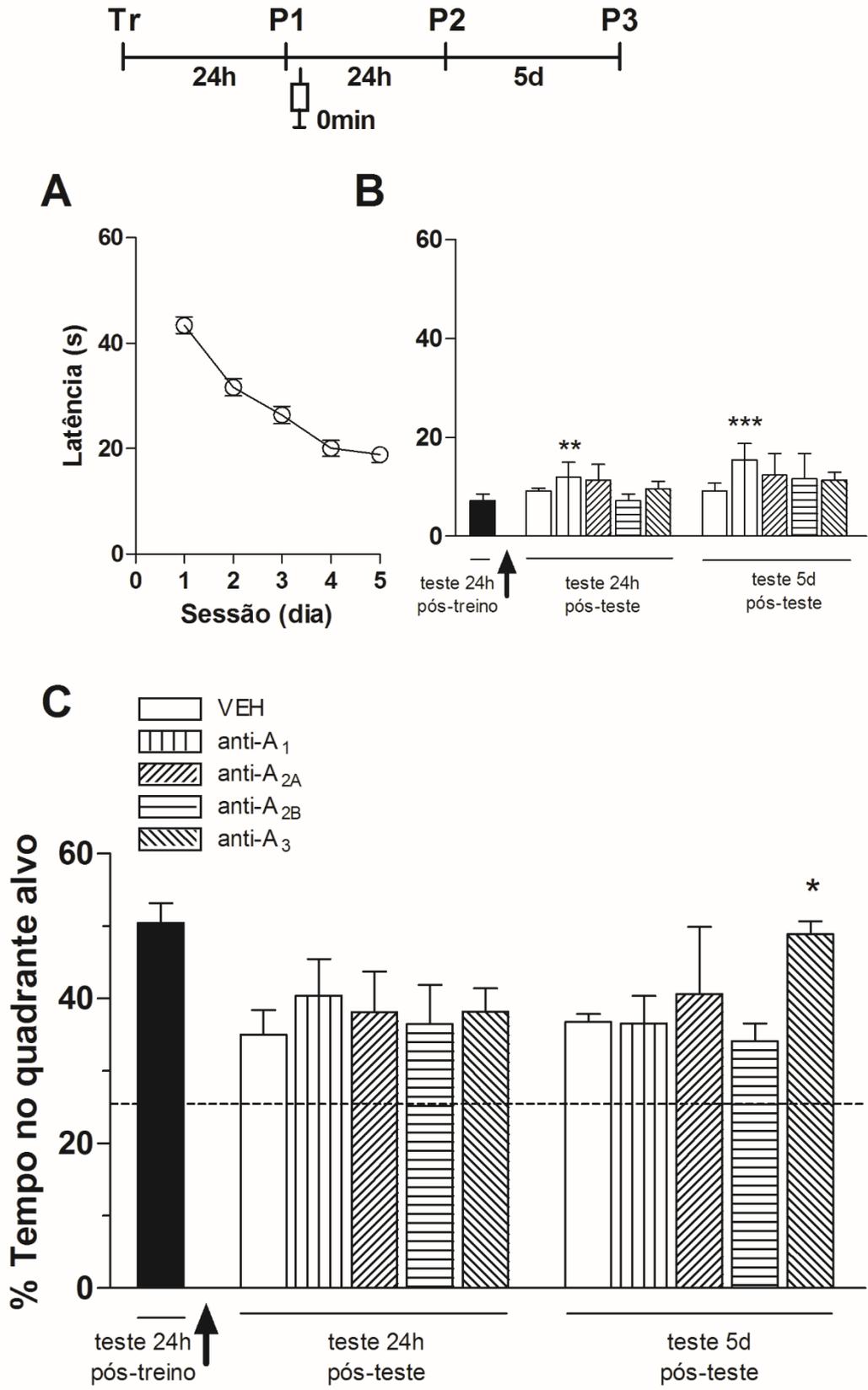


Figura 12: Infusão bilateral intra CA1 dorsal de antagonistas A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ imediatamente pós-teste sem reforço não afeta a reconsolidação recente de memória de longa duração relativa à tarefa do LAM, conforme verificado 24 horas e 5 dias após esta

reativação. Ratos com cânulas de infusão implantadas bilateralmente mirando a região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados durante 5 d na versão espacial do LAM. 24 h depois da última sessão de treino, os ratos foram randomicamente designados para um de cinco grupos experimentais e submetidos a um teste de evocação de 60 s na ausência da plataforma de escape (P1, barra preta). Os ratos receberam infusão bilateral intra-CA1 (1,0 µl) de veículo (VEH, barra branca), de DPCPX 50 nmol/lado (anti-A₁, barra hachurada vertical), SCH 442416 50 nmol/lado (anti-A_{2A}, barra hachurada em aclave), PSB 603 50 nmol/lado (anti-A_{2B}, barra hachurada horizontal) ou MRS 3777 50 nmol/lado (anti-A₃, barra hachurada em declive) imediatamente após este teste de evocação sem reforço 24 horas pós-treino. **(A)** Latência média de oito largadas por dia de treino de todos os ratos até a localização da plataforma de escape. **(B e C)** A retenção da memória foi verificada em um segundo teste de 60 s realizado 24 h após o primeiro teste, e em um terceiro teste de 60 s realizado 5 d após o primeiro teste. Os dados estão expressos como médias (\pm EM) da latência de nado até o local prévio da plataforma de escape **(B)** ou como a porcentagem de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo **(C)**. Todos os grupos apresentam porcentagem de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo significativamente maior que o percentual teórico de 25% em teste t de Student. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ vs. VEH em teste de Dunnett após ANOVA de uma via. (n = 11 – 18 por grupo).

V.4 Efeito da ativação individual dos receptores adenosinérgicos sobre a reconsolidação recente de memória espacial de longa duração recente e remota

Neste experimento investigamos se a ativação individual dos receptores A₁, A_{2A}, A_{2B} ou A₃ causa o mesmo efeito que a adenosina causou no processo de reconsolidação recente de memória de longa duração recente e remota. Para isto, realizamos a infusão bilateral intra-CA1 dos agonistas dos receptores A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ (10 nmol/lado) imediatamente após a sessão de teste sem reforço realizada 24 horas após a última sessão de treino. A dose dos agonistas infundida foi a mesma que a de adenosina. Novamente, observamos que ao longo dos dias de treino os animais aprenderam a tarefa, como verificado pela diminuição do tempo médio de latência dos animais (Figura 13.A), e que os animais conseguiram consolidar uma memória de longo prazo recente para esta tarefa, como verificado pela latência (Figura 13.B) e pela permanência no quadrante-alvo (Figura 13.C) durante a primeira sessão de teste sem reforço realizada 24 horas após a última sessão de treino.

Neste experimento não foram observadas diferenças significativas entre grupos na segunda sessão de teste realizada 24 horas após a sessão de reativação sem reforço quanto a porcentagem de tempo de nado gasto no quadrante-alvo (Figura 13.C). Porém, na terceira sessão de teste, realizada 5 dias após a sessão de reativação sem reforço, verificamos que o grupo que recebeu a infusão do agonista A₃ (HEMADO) desempenhou uma porcentagem

de tempo de nado gasto no quadrante-alvo significativamente menor do que o grupo veículo, e não significativamente diferente da porcentagem default teórica de 25%.

Assim, quanto ao principal parâmetro mensurador de evocação de memória para a tarefa do LAM, a porcentagem de tempo de nado gasto no quadrante-alvo, o único agonista que reproduziu o efeito amnésico da adenosina sobre a reconsolidação recente de memória espacial de longa duração foi o agonista específico para o receptor A_3 , e mesmo assim apenas quando essa memória foi remota, conforme verificado no terceiro teste realizado 5 dias após a primeira sessão de reativação sem reforço. Ficou em aberto explicar como que a adenosina causa esse mesmo efeito amnésico sobre reconsolidação recente de memória espacial de longa duração recente. Talvez necessite a ação da adenosina em mais de um receptor simultaneamente. Investigaremos esta hipótese no doutorado.

Os agonistas A_1 (CPA) e A_3 (HEMADO) causaram um aumento significativo da latência para o local prévio da plataforma no segundo teste em relação aos respectivos grupos controle (VEH) (Figura 13.B). Apesar da diferença significativa, a magnitude desse aumento é pequena, não permitindo formar alguma conclusão sobre algum efeito desses agonistas sobre seus receptores, visto que não houve um resultado respaldante semelhante no parâmetro de porcentagem de tempo nado no quadrante-alvo.

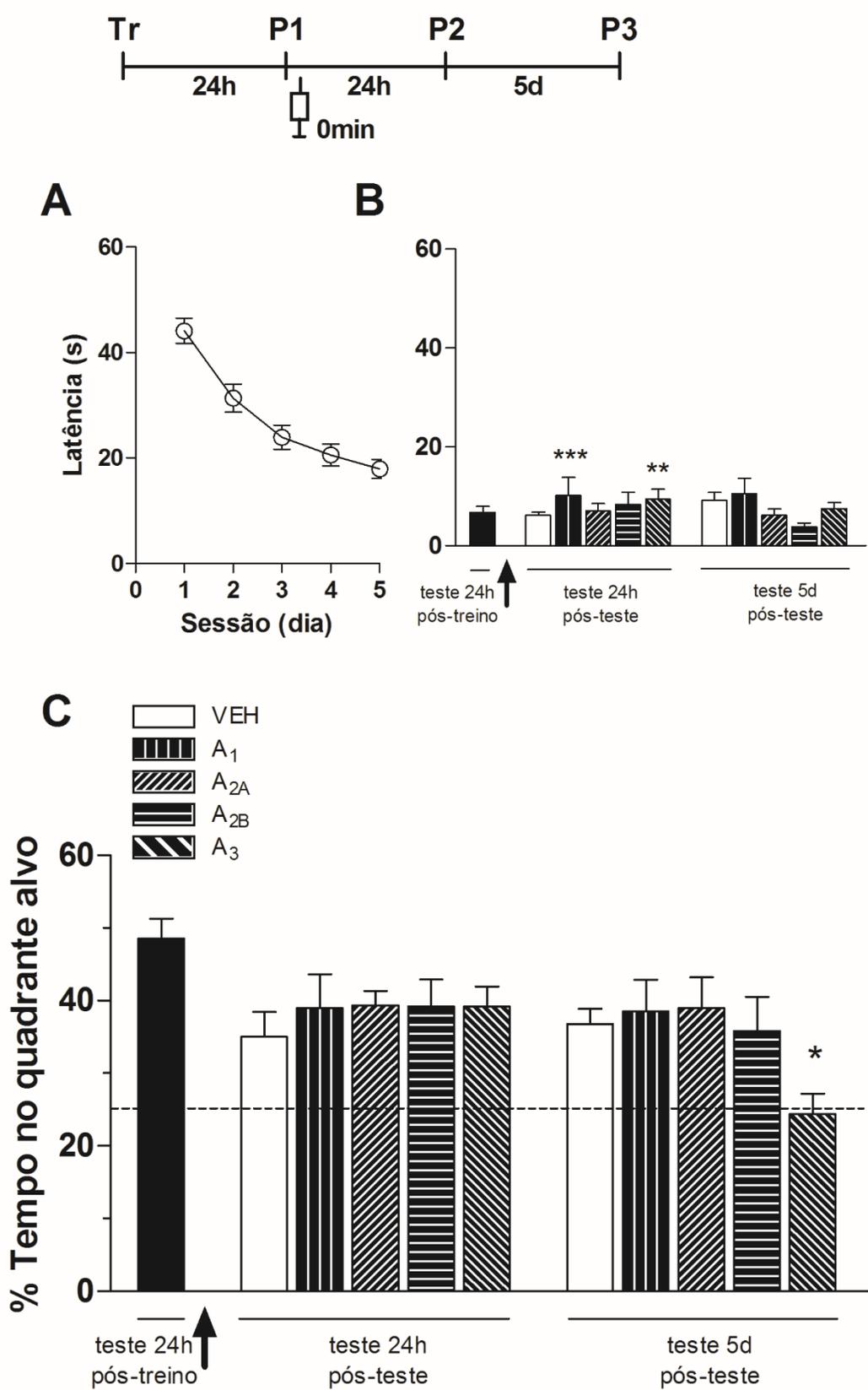


Figura 13: Infusão bilateral intra CA1 dorsal de agonistas A1, A2A, A2B e A3 imediatamente pós-teste sem reforço não afeta a reconsolidação recente de memória de longa duração relativa à tarefa do LAM, conforme verificado 24 horas e 5 dias após esta reativação, com

exceção do agonista A₃ que prejudicou a estabilidade da memória de longa duração remota verificada 5 dias pós-teste. Ratos com cânulas de infusão implantadas bilateralmente mirando a região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados durante 5 d na versão espacial do LAM. 24 h depois da última sessão de treino, os ratos foram randomicamente designados para um de cinco grupos experimentais e submetidos a um teste de evocação de 60 s na ausência da plataforma de escape (P1, barra preta). Os ratos receberam infusão bilateral intra-CA1 (1,0 µl) de veículo (VEH, barra branca), de CPA 10 nmol/lado (A₁, barra hachurada vertical), PSB 0777 10 nmol/lado (A_{2A}, barra hachurada em aclave), BAY 60-6583 10 nmol/lado (A_{2B}, barra hachurada horizontal) ou HEMADO 10 nmol/lado (A₃, barra hachurada em declive) imediatamente após este teste de evocação sem reforço 24 horas pós-treino. **(A)** Latência média de oito largadas por dia de treino de todos os ratos até a localização da plataforma de escape. **(B e C)** A retenção da memória foi verificada em um segundo teste de 60 s realizado 24 h após o primeiro teste, e em um terceiro teste de 60 s realizado 5 d após o primeiro teste. Os dados estão expressos como médias (± EM) da latência de nado até o local prévio da plataforma de escape **(B)** ou como a porcentagem de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo **(C)**. O grupo A₃ no teste 5d pós-teste é o único grupo que não apresenta porcentagem de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo significativamente maior que o percentual teórico de 25% em teste t de Student. * p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001 vs. VEH em teste de Dunnett após ANOVA de uma via. (n = 6 – 15 por grupo).

V.5 Realização dos controles experimentais

Para validação dos resultados acima descritos realizamos os seguintes controles: controle infusão, controle reforço, controle temporal e controle estrutura.

V.5.1 Controle infusão

Para realização do controle infusão, realizamos todos os dias de treinamento conforme descrito nos experimentos anteriores. No dia em que seria realizado o primeiro teste 24 horas após a última sessão de treino, os animais não passaram por esse teste e mesmo assim receberam a infusão intra-CA1 bilateral de veículo ou adenosina na dose de 10 nmol/lado. Os testes 48 horas e 6 dias após a última sessão de treino foram realizados normalmente, seguindo o protocolo proposto durante toda a parte experimental do projeto.

A infusão de adenosina 24 horas pós-treino, sem ter sido precedida de uma sessão de reativação sem reforço, não causou amnésia anterógrada para a memória espacial de longa duração recente e remota conforme verificado nos testes 48 horas e 6 dias pós-treino (Figura 15). Este resultado exclui a possibilidade de o efeito da adenosina verificado anteriormente tenha sido independente de sua infusão intra-CA1 ter sido imediatamente precedida da sessão de reativação sem reforço, ou devido a alguma ação tardia

desencadeada pela adenosina per se que seria verificável 24 horas após sua infusão.

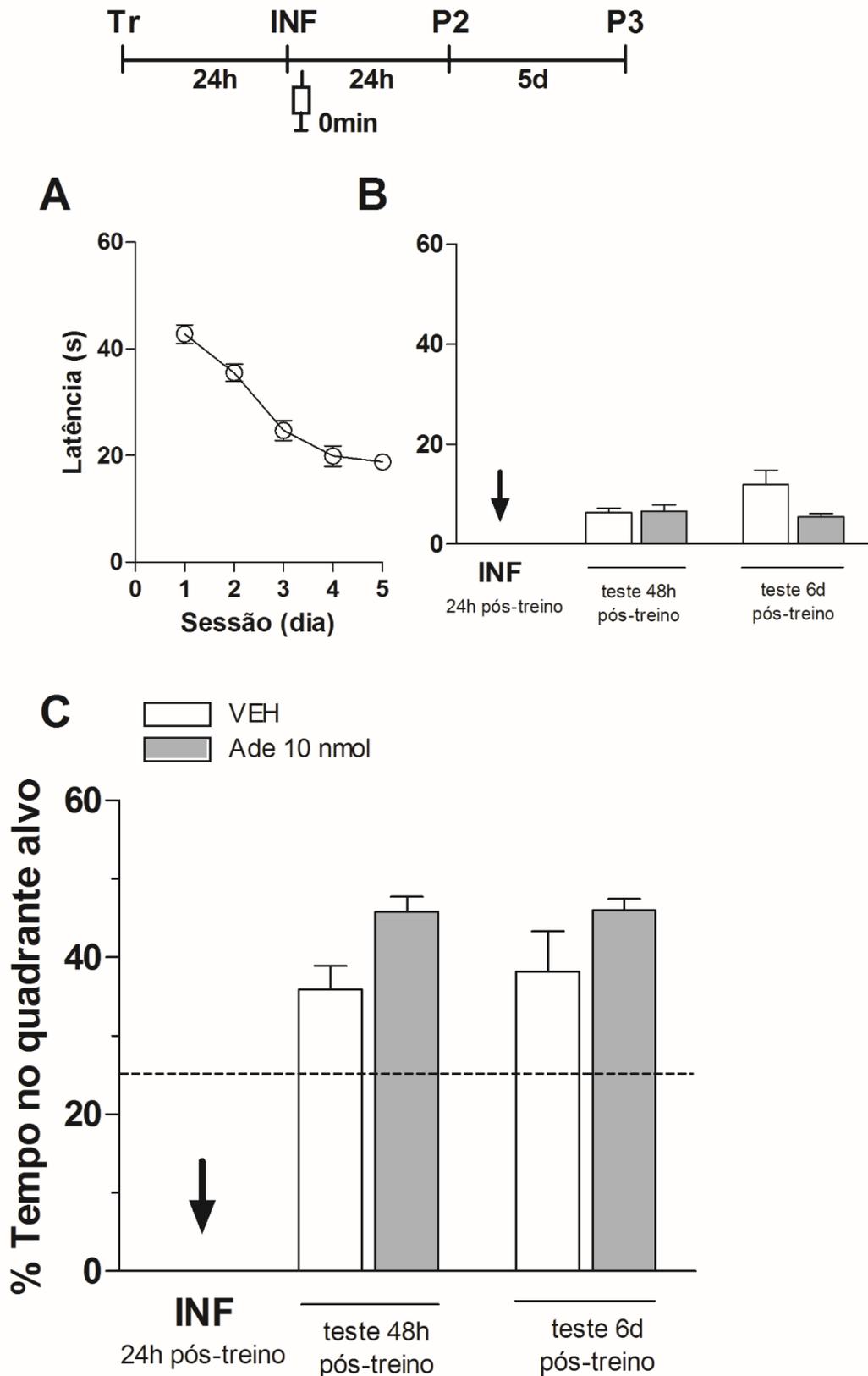


Figura 14: Infusão bilateral intra CA1 dorsal de adenosina 24 horas após a última sessão de treino não prejudica a evocação de memória de longa duração relativa à tarefa do LAM, conforme verificado 48 horas e 6 dias após a última sessão de treino. Ratos com cânulas de infusão implantadas bilateralmente mirando a região CA1 do hipocampo dorsal foram

*treinados durante 5 d na versão espacial do LAM. 24 h depois da última sessão de treino, os ratos foram randomicamente designados para um de dois grupos experimentais. Adenosina (Ade 10 nmol/lado, barra cinza) ou veículo (VEH, barra branca) foi bilateralmente infundida (1,0 µl) na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos 24 horas pós-treino (INF). (A) Latência média de oito largadas por dia de treino de todos os ratos até a localização da plataforma de escape). (B e C) A retenção da memória foi verificada em um teste de 60 s realizado 48 h pós-treino, e em um segundo teste de 60 s realizado 6 d pós-treino. Os dados estão expressos como médias (\pm EM) da latência de nado até o local prévio da plataforma de escape (B) ou como a porcentagem de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo (C). Não houve diferença estatística entre os grupos, e todos os grupos apresentam porcentagem de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo significativamente maior que o percentual teórico de 25% em teste *t* de Student.. ($n = 10 - 11$ por grupo).*

V.5.2 Controle reforço

Para realização do controle reforço, realizamos todos os dias de treinamento conforme descrito nos experimentos anteriores. No primeiro teste realizado 24 horas após a última sessão de treino, os animais foram submetidos a um teste de 60 segundos na presença da plataforma de escape, de forma que esse teste foi como mais uma sessão de treino com reforço. Os animais receberam imediatamente após essa sessão de teste com reforço a infusão intra-CA1 bilateral de veículo ou adenosina na dose de 10 nmol/lado. Os testes 24 horas e 5 dias após essa sessão de teste (também denominada reativação) foram realizados normalmente, seguindo o protocolo proposto durante toda a parte experimental do projeto.

A infusão de adenosina imediatamente pós-teste com reforço não causou amnésia anterógrada para a memória espacial de longa duração recente e remota conforme verificado nos testes 24 horas e 5 dias após o primeiro teste (**Figura 15**). Este resultado condiciona o efeito da adenosina verificado anteriormente à ausência do reforço (plataforma de escape) durante a sessão de reativação, necessária para que haja o disparo do processo de labilização que possibilita o processo de reconsolidação que ocorre a seguir. Assim este resultado nos permite afirmar que o efeito da adenosina verificado nesta dissertação foi de fato sobre a reconsolidação recente de memória espacial de longa duração recente e remota.

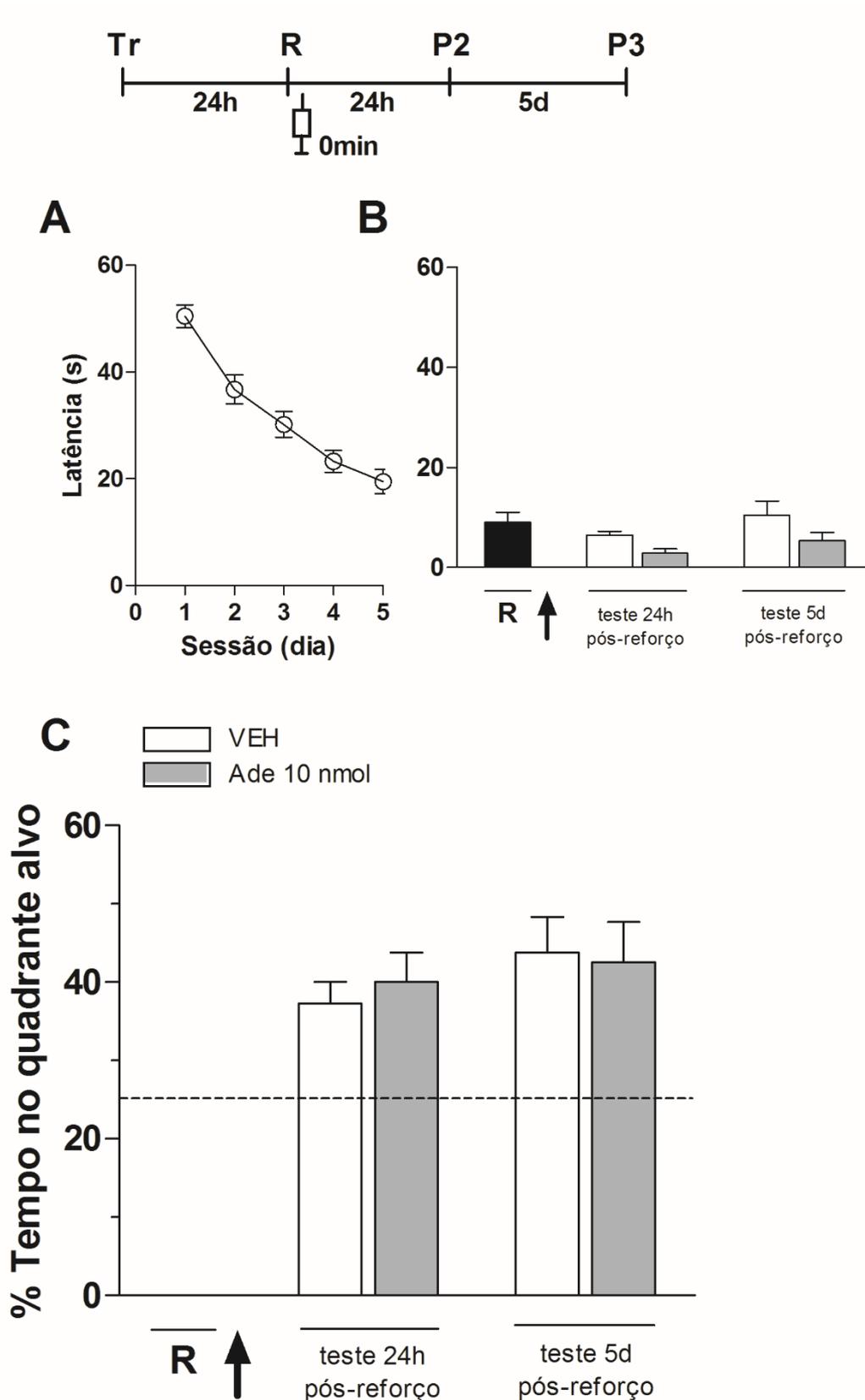


Figura 15: Infusão bilateral intra CA1 dorsal de adenosina imediatamente pós-teste com reforço não prejudica a reconsolidação recente de memória de longa duração relativa à tarefa do LAM, conforme verificado 24 horas e 5 dias após esta reativação. Ratos com cânulas de infusão implantadas bilateralmente mirando a região CA1 do hipocampo dorsal foram

treinados durante 5 d na versão espacial do LAM. 24 h depois da última sessão de treino, os ratos foram randomicamente designados para um de dois grupos experimentais e submetidos a um teste de evocação de 60 s com a presença da plataforma de escape (R, barra preta). Adenosina (Ade 10 nmol/lado, barra cinza) ou veículo (VEH, barra branca) foi bilateralmente infundida (1,0 µl) na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos imediatamente após este teste de evocação 24 horas pós-treino. (A) Latência média de oito largadas por dia de treino de todos os ratos até a localização da plataforma de escape. (B e C) A retenção da memória foi verificada em um segundo teste de 60 s realizado 24 h após o primeiro teste, e em um terceiro teste de 60 s realizado 5 d após o primeiro teste, ambos com a plataforma de escape ausente. Os dados estão expressos como médias (\pm EM) da latência de nado até o local prévio da plataforma de escape (B) ou como a porcentagem de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo quando a plataforma de escape esteve ausente (C). Não houve diferença estatística entre os grupos, e todos os grupos apresentam porcentagem de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo significativamente maior que o percentual teórico de 25% em teste t de Student.. (n = 6 por grupo).

V.5.3 Controle temporal

Para realização do controle temporal, realizamos todos os dias de treinamento conforme descrito nos experimentos anteriores. No primeiro teste realizado 24 horas após a última sessão de treino, os animais foram submetidos a um teste de 60 segundos na ausência da plataforma de escape. Os animais receberam 3 horas após essa sessão de teste sem reforço a infusão intra-CA1 bilateral de veículo ou adenosina na dose de 10 nmol/lado. Os testes 24 horas e 5 dias após essa sessão de teste foram realizados normalmente, seguindo o protocolo proposto durante toda a parte experimental do projeto.

A infusão de adenosina 3 horas pós-teste sem reforço não causou amnésia anterógrada para a memória espacial de longa duração recente e remota conforme verificado nos testes 24 horas e 5 dias após o primeiro teste (Figura 16). Este resultado mostra que o efeito da adenosina verificado anteriormente sobre a reconsolidação recente de memória espacial de longa duração recente e remota é tempo dependente.

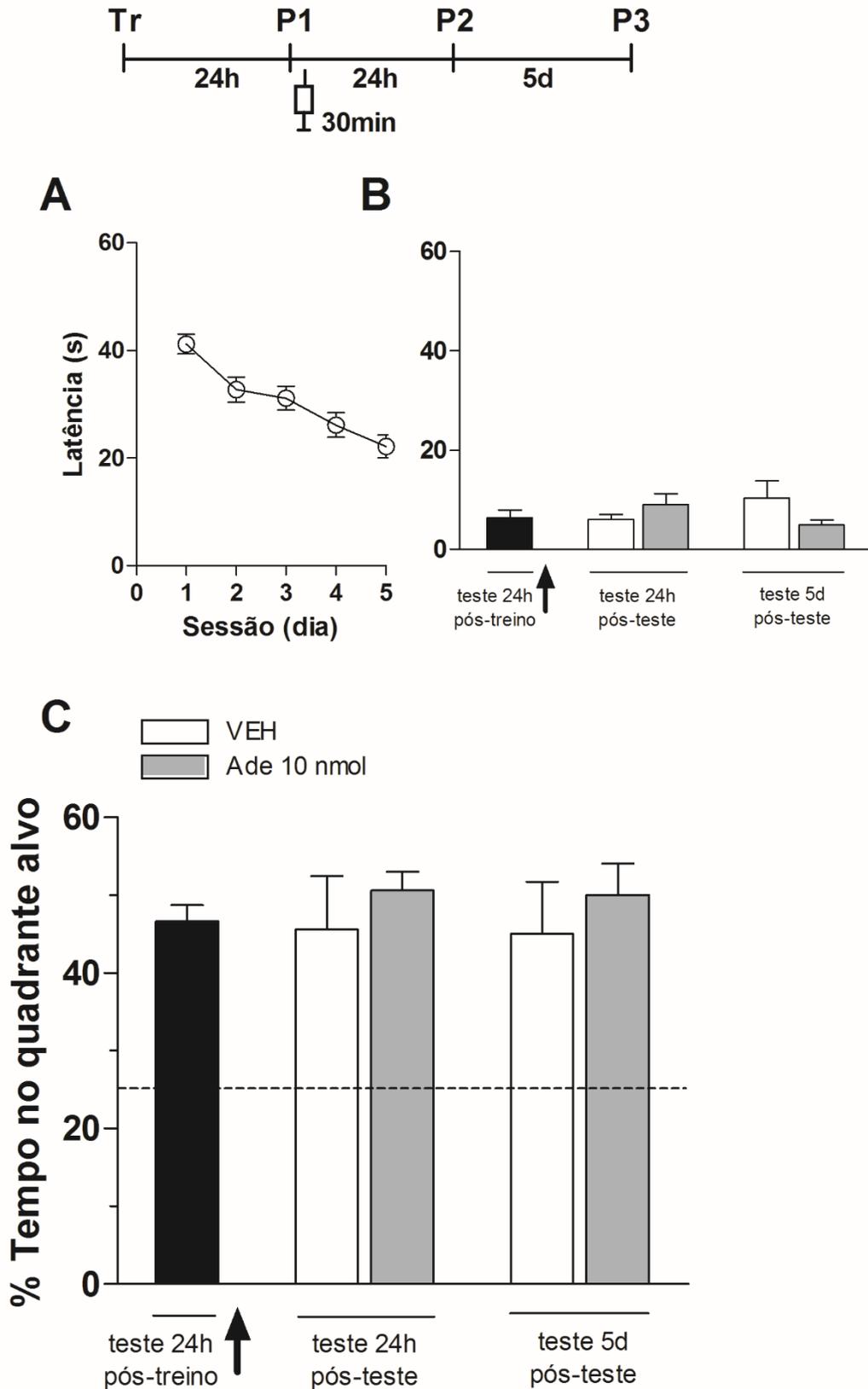


Figura 16: Infusão bilateral intra CA1 dorsal de adenosina 3 horas pós-teste sem reforço não prejudica a reconsolidação recente de memória de longa duração relativa à tarefa do LAM, conforme verificado 24 horas e 5 dias após esta reativação. Ratos com cânulas de infusão implantadas bilateralmente mirando a região CA1 do hipocampo dorsal foram treinados

durante 5 d na versão espacial do LAM. 24 h depois da última sessão de treino, os ratos foram randomicamente designados para um de dois grupos experimentais e submetidos a um teste de evocação de 60 s na ausência da plataforma de escape (P1, barra preta). Adenosina (Ade 10 nmol/lado, barra cinza) ou veículo (VEH, barra branca) foi bilateralmente infundida (1,0 µl) na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos 3 h após este teste de evocação 24 horas pós-treino. (A) Latência média de oito largadas por dia de treino de todos os ratos até a localização da plataforma de escape. (B e C) A retenção da memória foi verificada em um segundo teste de 60 s realizado 24 h após o primeiro teste, e em um terceiro teste de 60 s realizado 5 d após o primeiro teste. Os dados estão expressos como médias (\pm EM) da latência de nado até o local prévio da plataforma de escape (B) ou como a porcentagem de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo (C). Não houve diferença estatística entre os grupos, e todos os grupos apresentam porcentagem de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo significativamente maior que o percentual teórico de 25% em teste t de Student. (n = 6 – 8 por grupo).

V.5.4 Controle estrutura

Para realização do controle estrutura, realizamos todos os dias de treinamento conforme descrito nos experimentos anteriores. No primeiro teste realizado 24 horas após a última sessão de treino, os animais foram submetidos a um teste de 60 segundos na ausência da plataforma de escape. Os animais receberam imediatamente após essa sessão de teste sem reforço a infusão bilateral intra-córtex occipital médio-lateral, situado exatamente 1 mm acima da região CA1 do hipocampo dorsal, de veículo ou adenosina na dose de 10 nmol/lado. Os testes 24 horas e 5 dias após essa sessão de teste foram realizados normalmente, seguindo o protocolo proposto durante toda a parte experimental do projeto.

A infusão de adenosina imediatamente pós-teste sem reforço em uma região 1 mm acima da região CA1 dorsal não causou amnésia anterógrada para a memória espacial de longa duração recente e remota conforme verificado nos testes 24 horas e 5 dias após o primeiro teste (Figura 17). Este resultado mostra que o efeito da adenosina verificado anteriormente sobre a reconsolidação recente de memória espacial de longa duração recente e remota é CA1 dorsal dependente.

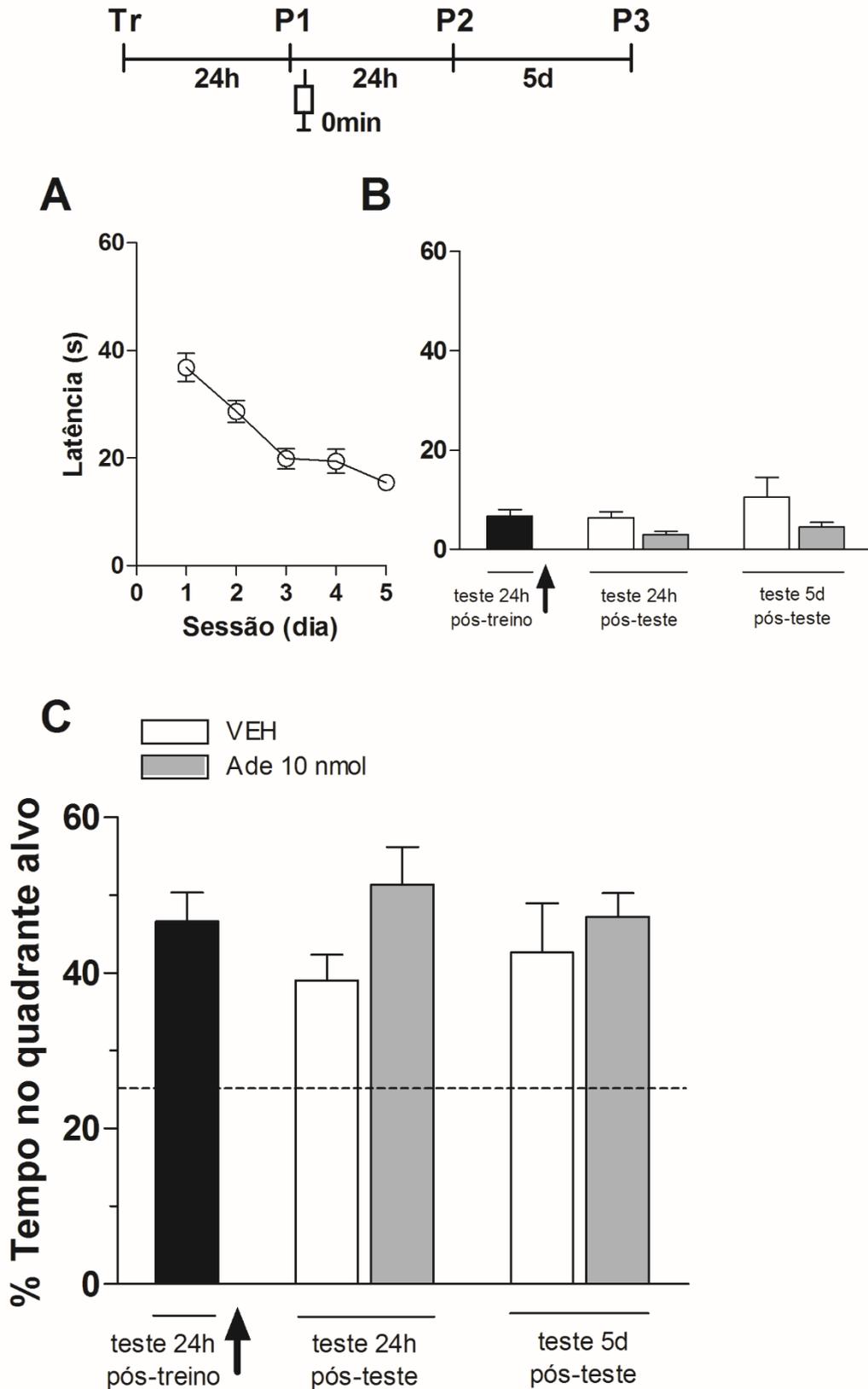


Figura 17: Infusão bilateral intra córtex occipital médio-lateral de adenosina imediatamente pós-teste sem reforço não prejudica a reconsolidação recente de memória de longa duração relativa à tarefa do LAM, conforme verificado 24 horas e 5 dias após esta reativação. Ratos com cânulas de infusão implantadas bilateralmente mirando 1 mm acima da

região CA1 do hipocampo dorsal, ou seja, a região cortical occipital médio-lateral, foram treinados durante 5 d na versão espacial do LAM. 24 h depois da última sessão de treino, os ratos foram randomicamente designados para um de dois grupos experimentais e submetidos a um teste de evocação de 60 s na ausência da plataforma de escape (P1, barra preta). Adenosina (Ade 10 nmol/lado, barra cinza) ou veículo (VEH, barra branca) foi bilateralmente infundida (1,0 µl) na região cortical occipital médio-lateral de ratos imediatamente após este teste de evocação 24 horas pós-treino. **(A)** Latência média de oito largadas por dia de treino de todos os ratos até a localização da plataforma de escape. **(B e C)** A retenção da memória foi verificada em um segundo teste de 60 s realizado 24 h após o primeiro teste, e em um terceiro teste de 60 s realizado 5 d após o primeiro teste. Os dados estão expressos como médias (\pm EM) da latência de nado até o local prévio da plataforma de escape **(B)** ou como a porcentagem de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo **(C)**. Não houve diferença estatística entre os grupos, e todos os grupos apresentam porcentagem de tempo de nado gasto dentro do quadrante-alvo significativamente maior que o percentual teórico de 25% em teste *t* de Student. ($n = 6 - 7$ por grupo).

CAPÍTULO VI - DISCUSSÃO

Os resultados apresentados nesta dissertação mostram que a adenosina, quando infundida diretamente na região CA1 do hipocampo dorsal de ratos, prejudicou de maneira dose-dependente a retenção da memória espacial de longa duração recente e remota relativa à tarefa do LAM, um efeito que foi parcialmente mimetizado pela ativação específica de receptores A_3 , em que houve prejuízo da retenção da memória espacial de longa duração remota, mas não da recente. Tal mimetização foi possível através da administração do agonista específico dos receptores A_3 , HEMADO, tendo sua especificidade confirmada por AUCHAMPACH et al., 2010, e também sua afinidade pelo receptor confirmada por sua constante de dissociação (K_i) de 1.1 nM. Este efeito amnésico foi observado apenas quando a adenosina foi administrada imediatamente pós-treino, mas não 3 horas após a sessão de teste sem reforço realizada 24 horas após a última sessão de treino, sugerindo que o efeito amnésico da adenosina se deve a uma ação tempo-dependente do processo de reconsolidação, e que não se trata de uma consequência de efeitos tardios sobre a evocação ou sobre as atividades locomotora e exploratória, visto que não houve alteração da velocidade de nado em todos os grupos experimentais.

As drogas utilizadas no nosso trabalho, tanto os agonistas, como os antagonistas, já haviam sido descritas na literatura (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998) como também utilizadas em trabalhos anteriores (CORODIMAS; TOMITA, 2001; LATINI; PEDATA, 2001), justificando o uso das mesmas em nossos grupos de teste.

Para escolha das doses a serem infundidas durante as etapas do experimento, utilizamos a curva dose como um referencial. Os agonistas possuem uma afinidade maior pelos receptores adenosinérgicos, baseado na constante de dissociação (K_i) dos mesmos quando comparados à adenosina, fato confirmado pela nossa revisão de literatura (BARALDI et al., 2005; BORRMANN et al., 2009; DE LERA RUIZ; LIM; ZHENG, 2014; KOZMA et al., 2013; MORO et al., 2006; "Tocris a biotchne brand", [s.d.]). Dessa forma, poderíamos utilizar uma dose menor do que a adenosina para reproduzirmos tal efeito, porém utilizamos a mesma dose (10 nmol), por conservadorismo.

Já no caso dos antagonistas, utilizamos uma dose em excesso, máximo de excesso possível, para garantir que de fato houvesse o bloqueio dos receptores.

Também verificamos que a adenosina endógena pode participar fisiologicamente da modulação da estabilidade da memória espacial ao longo do tempo de retenção, visto que o bloqueio específico dos receptores A₃ imediatamente após a sessão de teste realizada 24 horas após a última sessão de treino aumentou a retenção dessa memória espacial de longa duração em relação ao grupo veículo conforme verificado 5 dias depois. Este resultado sugere que diferentes memórias podem ter sua persistência ao longo do tempo modulada pelos níveis endógenos de adenosina durante os momentos em que essas memórias são evocadas. Isto pode ter um significado muito importante em vincular a regulação do metabolismo energético neuronal, em que os níveis intra e extracelulares de adenosina são uma variável chave (CAMICI; GARCIA-GIL; TOZZI, 2018), com a capacidade da rede formada por esses neurônios em sustentar a manutenção de um traço mnemônico no longo prazo.

Ainda, vários trabalhos descrevem as ações da adenosina como inibitórias e neuroprotetoras, pelo fato de suas concentrações extracelulares se elevarem em condições de estresse (JACOBSON; GAO, 2006; RAHMAN, 2009; SEBASTIÃO; RIBEIRO, 2009), visando proteger qualquer dano celular, causado nessas situações. Este papel da adenosina, junto com sua ação fisiológica sobre a reconsolidação recente de memória espacial de longa duração remota, também permite conectar cenários em que há estresse celular com o desempenho mnemônico subsequente.

Interessantemente, há relativamente poucos trabalhos na literatura descrevendo a participação do sistema adenosinérgico em processos mnemônicos como a consolidação e menos ainda a reconsolidação, comparativamente a outros sistemas neuroquímicos. Há trabalhos que encontraram que somente a administração de antagonistas adenosinérgicos não acarretam em alterações de aprendizado, porém alguns desses trabalhos investigaram apenas o efeito da adenosina nos receptores A₁ e A₂ (KOPF et al., 1999; MIORANZZA et al., 2011), que mesmo tendo utilizado camundongos e tarefas mnemônicas diferentes (esquiva inibitória e reconhecimento de objetos),

condizem com nossos resultados quanto ao antagonismo nesses receptores apenas.

A ativação isolada dos receptores adenosinérgicos não reproduziu o efeito da adenosina sobre a reconsolidação recente de memória espacial de longa duração recente. Assim, nossos resultados não nos permitem por ora explicar de que forma a adenosina causou tal efeito. Provavelmente, ou a adenosina age através de algum outro alvo distinto de seus receptores, ou esta ação exige a ativação simultânea de dois ou mais receptores adenosinérgicos. Esta segunda hipótese será testada na continuação deste trabalho no doutorado.

Já o fato de o agonista A_3 ter causado um efeito verificável apenas na reconsolidação recente de memória espacial de longa duração remota, mas não na recente, mais uma vez nos mostra uma diferença no nível de mecanismos bioquímicos entre esses dois tipos de memórias de longa duração, recente vs. remota. A primeira vez em que uma diferença em nível bioquímico foi encontrada entre esses dois tipos de memória de longa duração foi referente a ativação da CaMKII, que precisa ser ativada imediatamente após um teste não reforçado na tarefa do LAM para que haja uma reconsolidação que gere uma memória estável no prazo remoto (5 dias pós-teste sem reforço), conforme demonstrado por DA SILVA, et al., 2013. Estes resultados, junto com o fato de a adenosina ser um fator chave da regulação metabólica neuronal, e com o fato de nesses mecanismos regulatórios os níveis intracelulares de cálcio também serem um fator chave (LLORENTE-FOLCH et al., 2015), sugere uma interessante linha de investigação, visando descobrir algum vínculo regulatório entre a razão extra/intracelular de adenosina e as vias de transdução de sinais cálcio-dependentes, e a participação desse vínculo em processos mnemônicos como o da reconsolidação de memórias de longa duração, e em como diferem em determinar a persistência do traço mnemônico ao ser reconsolidado.

Além do fato dos nossos dados apresentarem somente alteração significativa em relação à memória espacial de longa duração remota quando ativamos apenas o receptor A_3 , foi inusitado estes resultados estarem relacionados aos receptores A_3 , pois os mesmos são descritos de forma ínfima na literatura, confirmado pela nossa revisão de literatura, onde encontramos uma série de artigos em que se descreve a função de receptores adenosinérgicos através de administrações farmacológicas somente nos receptores A_1 e família

A₂. (BORTOLOTTO et al., 2015; DALL'IGNA et al., 2007; HARVEY et al., 2012; HUANG et al., 2005; KOPF et al., 1999; LIU et al., 2018; MIORANZZA et al., 2011; SACHDEVA; GUPTA, 2013), sendo os receptores A₃ descritos na minoria das vezes (CORODIMAS; TOMITA, 2001; RUBAJ; ZGODZIŃSKI; SIEKLUCKA-DZIUBA, 2003; ZHOU et al., 1992).

Dessa forma, conseguimos esclarecer que a adenosina modula a reconsolidação recente de memória espacial de longa duração remota, via receptores adenosinérgicos A₃. Uma das possibilidades para que tal efeito ocorra é o mecanismo de transdução de sinal desencadeado via receptor A₃. Este receptor é acoplado a uma proteína G inibitória (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998), que uma vez ativada, inibe a adenilil-ciclase membranar, desta forma diminuindo a concentração intracelular do segundo mensageiro AMP_c, o que por sua vez leva a uma menor ativação da PKA, e subsequentemente a uma menor ativação da transcrição de genes imediatos e tardios relacionados à plasticidade sináptica duradoura (ALBERINI; KANDEL, 2014; LAMPRECHT, 1999) . Tudo isso converge para uma diminuição na taxa de tradução de novas proteínas, o que acarreta num conseqüente prejuízo na retenção da memória de longa duração (IZQUIERDO et al., 1998)(ROESLER, 2017; ROSENBERG et al., 2014) . Porém já é conhecido que os receptores adenosinérgicos apresentam capacidade de ligação à diferentes proteínas G e que conseqüentemente podem desencadear a ativação de diferentes cascatas de transdução de sinal (CUNHA, 2005), então efeito que verificamos aqui decorrente da ativação de receptores A₃ pode estar ocorrendo por outra via que não a via de proteína G_i. Portanto, não podemos afirmar exatamente por qual via de transdução intracelular de sinal o receptor A₃ é capaz de modular a reconsolidação recente de memória espacial de longa duração remota.

Assim, visamos esclarecer esses questionamentos através do meu projeto de doutorado, sendo eles: (i) se a adenosina exerceria esses mesmos efeitos, via os mesmos receptores, se a reconsolidação fosse remota (primeiro teste sem reforço realizado 5 dias após a última sessão de treino) em vez de recente; (ii) verificar quais possíveis alvos pelos quais a adenosina age sob a reconsolidação recente da memória espacial de longa duração; (iii) explicar como esses receptores desencadeiam esses efeitos, através de quais componentes enzimáticos de quais cascatas intracelulares de transdução de

sinal, e se isso resulta ultimamente em diminuição da taxa de síntese proteica, ou aumento da taxa de degradação proteica, ou ambos; (iv) por fim, identificar quais proteínas, dentre as que sabidamente são essenciais para a plasticidade neuronal subjacente a LTP (ABRAHAM; WILLIAMS, 2008), podem ter tido sua taxa de renovação alterada devido a ação desencadeada pela adenosina no momento da reativação sem reforço da memória espacial.

CAPÍTULO VII – CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos nesse trabalho podemos concluir que:

- 1) A adenosina quando infundida bilateralmente na área CA1 do hipocampo dorsal de ratos, nas doses de 10 nmol e 100 nmol/lado, imediatamente após a primeira sessão de teste sem reforço no LAM, realizada 24 horas após a última sessão de treino, bloqueou a reconsolidação recente de memória de longa duração recente e remota, conforme verificado em testes realizados 24 horas e 5 dias após o primeiro teste.
- 2) O efeito da adenosina, na dose de 10 nmol/lado sobre a reconsolidação recente de memória espacial de longa duração recente e remota foi revertido quando houve co-infusão da adenosina ou com o antagonista A₁, ou com o antagonista A₃, ambos na dose de 50 nmol/lado.
- 3) A adenosina endógena participa apenas via receptores A₃ do processo de reconsolidação recente de memória de longa duração remota para o LAM, pois a infusão bilateral intra-CA1 dorsal de antagonista específico para o receptor A₃, na dose de 50 nmol/lado, imediatamente após a primeira sessão de teste sem reforço no LAM, realizada 24 horas após a última sessão de treino, causou um aumento do desempenho dos ratos em evocar essa memória conforme verificado no teste realizado 5 dias após o primeiro teste.
- 4) O efeito que a adenosina exerce sobre a reconsolidação recente de memória espacial de longa duração remota ocorre por meio da ativação apenas do receptor A₃, pois esse efeito foi reproduzido através da infusão bilateral intra-CA1 dorsal de agonista específico para o receptores A₃, na doses de 10 nmol/lado, imediatamente após a primeira sessão de teste sem reforço no LAM, realizada 24 horas após a última sessão de treino, que causou um desempenho amnésico conforme verificado no teste realizado 5 dias após o primeiro teste.

CAPÍTULO VIII– REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, W. C.; WILLIAMS, J. M. LTP maintenance and its protein synthesis-dependence. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 89, n. 3, p. 260–268, 2008.
- ALBERINI, C. M. Mechanisms of memory stabilization: Are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? **Trends in Neurosciences**, v. 28, n. 1, p. 51–56, 2005.
- ALBERINI, C. M.; KANDEL, E. R. The Regulation of Transcription in Memory Consolidation. 2014.
- AUCHAMPACH, J. A. et al. Synthesis and pharmacological characterization of [125I]MRS5127, a high affinity, selective agonist radioligand for the A3 adenosine receptor. **Biochemical Pharmacology**, v. 79, n. 7, p. 967–973, 2010.
- BARALDI, P. G. et al. Derivatives as Potent and Selective Human A 3 Adenosine Receptor Antagonists. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 15, p. 4697–4701, 2005.
- BLISS, T. V. P. G. L. C. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, v. 361, p. 1–9, 1993.
- BLISS T, L. T. Hill, Neurophysiology, of. **J.Physiol.**, p. 331–356, 1973.
- BOISON, D. et al. Adenosine hypothesis of schizophrenia - Opportunities for pharmacotherapy. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 3, p. 1527–1543, 2012.
- BORRMANN, T. et al. 1-Alkyl-8-(piperazine-1-sulfonyl)phenylxanthines: Development and characterization of adenosine A2B receptor antagonists and a new radioligand with subnanomolar affinity and subtype specificity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 13, p. 3994–4006, 2009.
- BORTOLOTTO, J. W. et al. Modulation of adenosine signaling prevents scopolamine-induced cognitive impairment in zebrafish. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 118, n. December, p. 113–119, 2015.
- BURNSTOCK, G. et al. Purinergic signalling: From normal behaviour to pathological brain function. **Progress in Neurobiology**, v. 95, n. 2, p. 229–274, 2011.
- CAMICI, M.; GARCIA-GIL, M.; TOZZI, M. G. The inside story of adenosine.

International Journal of Molecular Sciences, v. 19, n. 3, p. 1–14, 2018.

CHRISTOPHER A. SALVATORE, MARLENE A. JACOBSON, HEIDI E. TAYLOR, J. L.; JOHNSON, A. R. G. Molecular cloning and characterization of the human A3 adenosine receptor. **Pharmacology**, v. 90, p. 10365–10369, 1993.

CORODIMAS, K. P.; TOMITA, H. Adenosine A1receptor activation selectively impairs the acquisition of contextual fear conditioning in rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 115, n. 6, p. 1283–1290, 2001.

CRYSTAL, J. D. Animal models of source memory. **Journal of the Experimental Analysis of Behavior**, v. 105, n. 1, p. 56–67, 2016.

CUNHA, R. A. Neuroprotection by adenosine in the brain: From A1receptor activation to A2Areceptor blockade. **Purinergic Signalling**, v. 1, n. 2, p. 111–134, 2005.

D'HOOGHE, R.; DEYN, P. P. DE. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. **Brain Research Reviews**, v. 36, p. 60–90, 2001.

DALL'IGNA, O. P. et al. Caffeine and adenosine A2a receptor antagonists prevent β -amyloid (25-35)-induced cognitive deficits in mice. **Experimental Neurology**, v. 203, n. 1, p. 241–245, 2007.

DE HOZ, L.; MARTIN, S. J.; MORRIS, R. G. M. Forgetting, reminding, and remembering: The retrieval of lost spatial memory. **PLoS Biology**, v. 2, n. 8, 2004.

DE LERA RUIZ, M.; LIM, Y.-H.; ZHENG, J. Adenosine A_{2A} Receptor as a Drug Discovery Target. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 9, p. 3623–3650, 2014.

DUDAI, Y. Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 12, p. 211–216, 2002.

DUDAI, Y.; EISENBERG, M. Rites of passage of the engram: Reconsolidation and the lingering consolidation hypothesis. **Neuron**, v. 44, n. 1, p. 93–100, 2004.

FREDHOLM, B. B. et al. Structure and function of adenosine receptors and their genes. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 362, n. 4–5, p. 364–374, 2000.

HARVEY, A. L. et al. A novel dihydro-

pyrazolo(3,4-d)(1,2,4)triazolo(1,5-a)pyrimidin-4-one (AJ23) is an antagonist at adenosine A1 receptors and enhances consolidation of step-down avoidance. **Behavioural Brain Research**, v. 234, n. 2, p. 184–191, 2012.

HERWEG, N. A.; KAHANA, M. J. Spatial Representations in the Human Brain. **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 12, n. July, p. 1–16, 2018.

HOOGE, R. D.; DEYN, P. P. DE. **Trial watch: Antisense agent reduces LDL-cholesterol levels in high-risk patients.** [s.l.: s.n.]. v. 9

HUANG, Z. L. et al. Adenosine A2A, but not A1, receptors mediate the arousal effect of caffeine. **Nature Neuroscience**, v. 8, n. 7, p. 858–859, 2005.

IZQUIERDO, I. et al. Mechanisms for memory types differ [8]. **Nature**, v. 393, n. 6686, p. 635–636, 1998.

IZQUIERDO, I. et al. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. **Trends in Neurosciences**, v. 29, n. 9, p. 496–505, 2006.

JACOBSON, K. A.; GAO, Z.-G. Adenosine receptors as therapeutic targets. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 5, n. 3, p. 247–64, 2006.

KANDEL, E. R. et al. **Princípios de Neurociências**. 5. ed. [s.l.] AMGH editora, 2014a.

KANDEL, E. R. et al. **Princípios de Neurociências - Kandel - 5ª Ed. (PORTUGUÊS) (PDF)(COMPLETO).pdf**, 2014b.

KOPF, S. R. et al. Adenosine and memory storage: Effect of A1 and α 2 receptor antagonists. **Psychopharmacology**, v. 146, n. 2, p. 214–219, 1999.

KOZMA, E. et al. Characterization by flow cytometry of fluorescent, selective agonist probes of the A3 adenosine receptor. **Biochemical Pharmacology**, v. 85, n. 8, p. 1171–1181, 2013.

LAMPRECHT, R. CREB a message to remember - Springer. v. 55, p. 554–563, 1999.

LAMPRECHT, R.; LEDOUX, J. Structural plasticity and memory. **Neuroscience**, v. 5, p. 45–54, 2004.

LATINI, S.; PEDATA, F. Adenosine in the central nervous system: Release mechanisms and extracellular concentrations. **Journal of Neurochemistry**, v. 79, n. 3, p. 463–484, 2001.

LIU, G. et al. Adenosine binds predominantly to adenosine receptor A1 subtype in astrocytes and mediates an immunosuppressive effect. **Brain Research**, v.

1700, p. 47–55, 2018.

LIVINGSTON, M.; HEANEY, L. G.; ENNIS, M. Adenosine, inflammation and asthma - A review. **Inflammation Research**, v. 53, n. 5, p. 171–178, 2004.

LLORENTE-FOLCH, I. et al. The regulation of neuronal mitochondrial metabolism by calcium. **Journal of Physiology**, v. 593, n. 16, p. 3447–3462, 2015.

LYNCH, M. A. Long-Term Potentiation and Memory. **Physiology Reviews**, v. 84, p. 87–136, 2004.

MARTIN, S. J.; CLARK, R. E. The rodent hippocampus and spatial memory: From synapses to systems. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 4, p. 401–431, 2007.

MCGAUGH, J. L. Memory - A century of consolidation. **Science**, v. 287, n. 5451, p. 248–251, 2000.

MIORANZZA, S. et al. Blockade of adenosine A1 receptors prevents methylphenidate-induced impairment of object recognition task in adult mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 35, n. 1, p. 169–176, 2011.

MORO, S. et al. Progress in the pursuit of therapeutic adenosine receptor antagonists. **Medicinal Research Reviews**, v. 26, n. 2, p. 131–159, 2006.

MORRIS, R. Development of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 11, p. 47–60, 1984.

MORRIS, R. G. M. et al. Memory Reconsolidation: Sensitivity of Spatial Memory to Inhibition of Protein Synthesis in Dorsal Hippocampus during Encoding and Retrieval. **Neuron**, v. 50, n. 3, p. 479–489, 2006.

MOSER, M.-B.; ROWLAND, D. C.; MOSER, E. I. Place Cells, Grid Cells, and Memory. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 2, p. a021808, 2015.

OSAN, R.; TORT, A. B. L.; AMARAL, O. B. A mismatch-based model for memory reconsolidation and extinction in attractor networks. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, 2011.

PAXINOS GEORGE , WATSON CHARLES R.R, P. C. E. AChE- Stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 3, p. 129–149, 1980.

POULSEN, S. A.; QUINN, R. J. Adenosine receptors: New opportunities for

future drugs. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 6, p. 619–641, 1998.

QUEVEDO, J. et al. Protein synthesis, PKA, and MAP kinase are differentially involved in short- and long-term memory in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 154, n. 2, p. 339–343, 2004.

RAHMAN, A. The Role of Adenosine in Alzheimers Disease. **Current Neuropharmacology**, v. 7, n. 3, p. 207–216, 2009.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for Purines and Pyrimidines. **Pharmacological Reviews**, v. 50, p. 415–475, 1998.

ROESLER, R. Molecular mechanisms controlling protein synthesis in memory reconsolidation. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 142, p. 30–40, 2017.

ROSENBERG, T. et al. The roles of protein expression in synaptic plasticity and memory consolidation. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 7, n. November, p. 1–14, 2014.

RUBAJ, A.; ZGODZIŃSKI, W.; SIEKLUCKA-DZIUBA, M. The influence of adenosine A3 receptor agonist: IB-MECA, on scopolamine- and MK-801-induced memory impairment. **Behavioural Brain Research**, v. 141, n. 1, p. 11–17, 2003.

SACHDEVA, S.; GUPTA, M. Adenosine and its receptors as therapeutic targets: An overview. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 3, p. 245–253, 2013.

SCHIMANSKI, L. A.; NGUYEN, P. V. Multidisciplinary approaches for investigating the mechanisms of hippocampus-dependent memory: A focus on inbred mouse strains. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 5, p. 463–483, 2004.

SEBASTIÃO, A. M.; RIBEIRO, J. Adenosine receptors and the central nervous system. In: **Handbook of experimental pharmacology**. [s.l: s.n.]. p. 471–534.

SILVA, W. C. DA et al. Inhibition of mRNA Synthesis in the Hippocampus Impairs Consolidation and Reconsolidation of Spatial Memory. **Hippocampus**, v. 18, p. 29–39, 2008.

SQUIRE, L. R.; ZOLA, S. M. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 24, p. 13515–13522, 1996.

Tocris a biotchne brand. Disponível em: <https://www.tocris.com/products/n6-cyclopentyladenosine_1702>. Acesso em: 10 dez. 2018.

WHITLOCK, J. R. et al. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. **Science**, v. 313, n. 5790, p. 1093–1097, 2006.

ZHOU, Q. Y. et al. Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A3 adenosine receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 16, p. 7432–7436, 1992.