

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**Utilização da 4-Aminopiridina e de Toxinas de Aracnídeos na  
Investigação da Participação de Canais para o Íon Potássio  
nos Processos de Aprendizagem e Memória.**

**Christiano Del Cantoni Gati**

Tese de Doutorado

Brasília –DF

2014

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**Utilização da 4-Aminopiridina e de Toxinas de Aracnídeos na  
Investigação da Participação de Canais para o Íon Potássio  
nos Processos de Aprendizagem e Memória.**

**Christiano Del Cantoni Gati**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Elisabeth Ferroni Schwartz

Co-Orientadora: Profa. Dra. Márcia Renata Mortari

Brasília

2014

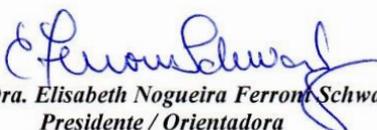
Tese de Doutorado

**Christiano Del Cantoni Gati**

Título:

**“Utilização da 4-Aminopiridina e de Toxinas de Aracnídeos na Investigação da Participação de Canais para o Íon Potássio nos Processos de Aprendizagem e Memória”.**

Comissão Examinadora:

  
*Prof. Dra. Elisabeth Nogueira Ferroni Schwartz*  
Presidente / Orientadora  
UnB/IB

  
*Prof. Dra. Marília Barros*  
Membro Titular Interno Vinculado ao Programa  
UnB/FS

  
*Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto Maior*  
Membro Titular Interno vinculado ao Programa  
UnB/IB

  
*Prof. Dra. Alexandra Olímpio Siqueira Cunha*  
Membro Titular Externo não Vinculado ao Programa  
USP

  
*Prof. Dr. Wamberto Antonio Varanda*  
Membro Titular Externo não vinculado ao Programa  
USP

*Prof. Dr. Cristiano Guimarães do Amaral Pinheiro*  
Membro Suplente  
Externo não Vinculado ao Programa  
Bolsista Pós-Doc CNPq

Brasília, 06 de março de 2014.

Para Lilian e Vítor

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS .....	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xi
AGRADECIMENTOS .....	xiii
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT .....	xvii
Capítulo 1.....	1
APRENDIZAGEM E MEMÓRIA .....	2
OS CANAIS PARA K <sup>+</sup> .....	7
CANAIS PARA K <sup>+</sup> E MEMÓRIA .....	8
TOXINAS, CANAIS PARA K <sup>+</sup> E MEMÓRIA .....	15
HIPÓTESE .....	17
JUSTIFICATIVA .....	17
OBJETIVOS .....	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	23
Capítulo 2.....	33
INTRODUÇÃO .....	34
MATERIAL E MÉTODOS .....	38
1. Animais.....	38
2. Implante das cânulas.....	38
3. Fármacos, soluções, doses e vias de administração .....	39
4. Testes comportamentais .....	41
5. Teste eletrofisiológico (registro de potencial de campo): indução de LTP .....	43
6. Análise histológica.....	45
7. Análise estatística.....	47
RESULTADOS .....	48
1. Campo aberto.....	48
2. Indução de LTP .....	50
DISCUSSÃO .....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	62

Capítulo 3.....	71
INTRODUÇÃO .....	72
MATERIAL E MÉTODOS .....	76
1. Animais.....	76
2. Implante das cânulas.....	76
3. Fármacos, soluções, doses e vias de administração .....	76
4. Testes comportamentais .....	77
5. Análise histológica.....	86
6. Análise estatística.....	86
RESULTADOS .....	89
1. Teste no LAM com injeção i.p. ....	89
2. Teste no LAM com injeção i.h. ....	93
3. Teste no LR com injeção i.h. ....	100
DISCUSSÃO .....	102
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	109
Capítulo 4.....	114
INTRODUÇÃO .....	115
MATERIAL E MÉTODOS .....	118
1. Obtenção das toxinas.....	118
2. Animais.....	119
3. Soluções dos testes eletrofisiológicos .....	119
4. Teste eletrofisiológico (registro de potencial de campo): indução de LTP.....	120
5. Análise estatística.....	120
RESULTADOS .....	121
1. Purificação da HgeTx1 .....	121
2. Indução de LTP na presença das toxinas.....	121
DISCUSSÃO .....	125
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	128
Conclusões.....	132
SUGESTÃO DO PAPEL DOS CANAIS $K_v$ NA FORMAÇÃO DA MEMÓRIA .....	134
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	135
ANEXO 1.....	136

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1.** Taxonomia parcial dos múltiplos sistemas de memória. Primeira divisão com base no tempo de retenção das informações. Algumas estruturas neurais envolvidas nas formas de memória também são apresentadas .....4
- Figura 1.2.** Taxonomia dos sistemas de memória de logo prazo. Essa classificação complementa a da Fig. 1.1. São apresentadas estruturas nervosas importantes para cada forma de memória. Modificado de Squire (2004). .....6
- Figura 2.1.** Estrutura química da 4-aminopiridina.....37
- Figura 2.2.** Campo aberto.....42
- Figura 2.3.** Esquema do procedimento adotado no campo aberto. Os ratos foram submetidos à cirurgia para implantação de cânulas-guia bilateralmente na região dorsal (CA1) da formação hipocampal. Após 3 dias, os animais foram submetidos a uma sessão diária, na qual o roedor era colocado no centro da arena e podia se movimentar livremente por 30 min. Antes dessa sessão, cada rato foi imobilizado por 30 a 90 s com auxílio de uma flanela (manuseio). Esses procedimentos ocorrem por três dias (habituação). No quarto dia ocorreu mais uma sessão de 30 min, porém cada roedor recebeu duas injeções: uma por via intraperitoneal (i.p., 30 min antes da sessão) e duas intrahipocampais bilaterais (i.h., imediatamente antes da sessão). Escopolamina (0,5 mg/kg) e salina (0,2 mL) foram administrados por via i.p e 4-AP (1mM/lado) e salina (0,2 µL/lado), por via i.h.....42
- Figura 2.4.** Esquema representativo de cortes coronais de cérebro dos ratos dos diferentes grupos de ratos que foram submetidos ao campo abeto. As pontas das cânulas-guia (círculos pretos) dos ratos usados nas análises estavam na região dorsal da formação hipocampal (distância do bregma de -3,84 mm) de acordo com as imagens do atlas de Paxinos e Watson (2007). .....46
- Figura 2.5.** Atividade motora espontânea dos ratos no campo aberto quantificada por meio do número total de cruzamentos em 30 min de sessão do quarto dia. Resultado (média ± EPM) para os grupos sal-sal (salina i.p. + salina i.h., n = 7), sal-4-AP (salina i.p. + 4-AP i.h., n = 6), escop-sal (escopolamina i.p. + salina i.h., n = 5) e escop-4-AP (escopolamina i.p. + 4-AP i.h., n = 5). As doses de escopolamina e 4-AP (dissolvidas em salina) utilizadas foram 0,5

mg/kg e 1 mM, respectivamente. As injeções i.p. (0,2 mL) e i.h. (0,2 µL/lado) foram realizadas 30 min antes e imediatamente antes da sessão, respectivamente. \*\*, p < 0,01 em relação tanto ao grupo sal-sal, quanto ao sal-4-AP.....49

**Figura 2.6.** Decurso temporal da atividade motora espontânea (cruzamentos) dos ratos no campo aberto na sessão do quarto dia. As observações de 30 min tiveram o número de cruzamentos quantificados em intervalos de 5 min a partir do início da sessão totalizando 6 blocos (1º ao 6º). Os resultados são apresentados como média ± EPM. Os grupos foram: sal-sal (salina i.p. + salina i.h., n = 7); sal-4-AP (salina i.p. + salina i.h., n = 6); escop-sal (escopolamina i.p. + salina i.h., n = 5); e escop-4-AP (escopolamina i.p. + 4-AP i.h., n = 5). As doses de escopolamina e 4-AP (dissolvidas em salina) utilizadas foram 0,5 mg/kg e 1 mM, respectivamente. As injeções i.p. (0,2 mL) e i.h. (0,2 µL/lado) foram realizadas 30 min antes e imediatamente antes da sessão, respectivamente. \* indica p < 0,05 em relação aos grupos sal-sal, sal-4-AP e escop-4-AP. #, ## e ### indicam p < 0,05, p < 0,01 e p < 0,001 em relação aos grupos sal-sal e sal-4-AP. ++ e +++ indicam p < 0,01 e p < 0,001, respectivamente, em relação 1º bloco de 5 min do grupo sal-sal. .. e ... indicam p < 0,01 e p < 0,001, respectivamente, em relação 1º bloco de 5 min do grupo sal-4-AP.....50

**Figura 2.7.** Influência de diferentes tratamentos na indução de LTP. As médias (± EPM) da inclinação da curva (*slope*) dos potenciais de campo excitatórios pós-sinápticos (PCEPS) são apresentadas como porcentagem da resposta basal (obtida durante 10 minutos anteriores à estimulação tetânica) ao longo do tempo. O momento dessa estimulação é indicado pela seta. Os círculos pretos abertos representam o grupo controle (sem fármacos, n = 6); os pretos sólidos, o grupo escop (recebeu 2,4 mM escopolamina, n = 6); os vermelhos abertos, o grupo 4-AP (recebeu 10 µM 4-AP, n = 6); e os vermelhos fechados, o grupo escop+4-AP (recebeu 2,4 mM escopolamina + 10 µM 4-AP, n = 6). Os traçados acima da figura são exemplos de curvas obtidas para cada um dos tratamentos e apresentam os valores sobrepostos dos potenciais de campos evocados antes (cinza) e 60 min após a estimulação tetânica (cada traçado é a média de 10 sweeps).....51

**Figura 3.1.** Representação esquemática (vista aérea) do labirinto aquático de Morris. A piscina é dividida em 4 quadrantes iguais. Apenas no centro de um deles existe uma plataforma submersa (1,5 cm da superfície) representada por um círculo preto. O quadrante que

contém a plataforma é denominado quadrante crítico. Cada quadrante possui em seu centro um contador (círculos pontilhados) numerado de 1 a 4. O labirinto fica em uma sala exclusiva que possui em suas paredes pistas visuais distintas para a orientação dos ratos. N, S, L e O são os pontos cardeais norte, sul, leste e oeste, respectivamente.....78

**Figura 3.2.** Esquema do procedimento no labirinto aquático de Morris quando da injeção intraperitoneal (i.p.). Tempo das sessões foram: treino – 90 s; teste de sondagem – 45 s; e teste de retenção – 90 s. Todas as sessões ocorriam entre 9 e 12 h da manhã. Salina era solução estéril de NaCl 0,9 % e o volume injetado foi de 0,2 mL. 4-aminopiridina (4-AP) era dissolvido em salina (0,2 mL) em duas quantidades: 0,1 ou 0,5 mg/kg. ....79

**Figura 3.3.** Esquema do procedimento no labirinto aquático de Morris quando da injeção intrahipocampal dorsal (i.h.). A, injeção no primeiro dia. B, injeção no segundo dia. Tempo das sessões foram: treino – 90 s; teste de sondagem – 45 s; e teste de retenção – 90 s. Todas as sessões ocorriam entre 9 e 12 hs da manhã. O controle foi tampão PBS, pH 7,4, autoclavado e o volume injetado foi de 0,2 µL/lado (região de CA1). 4-aminopiridina (4-AP) foi dissolvido em PBS para uma concentração final de 1mM e injetado 0,2 µL/lado. ....81

**Figura 3.4.** Representação esquemática do labirinto radial de 8 braços. Os braços foram numerados de 1 a 8. Os círculos abertos representam os potes circulares onde foi colocado o chocolate granulado (círculos fechados). O esquema apresenta uma combinação de três posições com chocolate usado para um rato durante a fase de treino (seis sessões diárias de 10 min por 3 dias). Apesar de a cada sessão o labirinto ser girado 45° em torno de seu eixo central, as posições nas quais o chocolate era colocado permaneciam as mesmas. O labirinto fica em uma sala exclusiva que possui em suas paredes pistas visuais distintas para a orientação dos ratos. N, S, L e O são os pontos cardeais norte, sul, leste e oeste, respectivamente. ....83

**Figura 3.5.** Esquema do procedimento no labirinto radial de oito braços. Os ratos eram submetidos à cirurgia para implantação de cânulas-guia bilateralmente na região dorsal (CA1) da formação hipocampal. Após 1 semana, os animais eram submetidos a restrição calórica para redução da massa corporal para 85 %. Os animais, sempre em jejum de 22 h, foram submetidos a 5 sessões diárias por 4 dias para familiarização e outras 6 diárias por 3 dias para treino. Na familiarização havia chocolate granulado em todos os braços, e no

treino, apenas em três (eram mantidas as mesmas posições a cada reexposição de um dado rato). As injeções intrahipocâmpais (i.h.) de PBS (0,2 µL/lado) ou de 4-AP (1mM em 0,2 µL de PBS/lado) e intraperitoneais (i.p.) de salina (0,2 mL) ou de escopolamina (0,5 mg/kg em 0,2 mL de salina) foram realizadas ao término da última sessão do primeiro dia de treino. As sessões se encerravam quando o animal consumia todo o chocolate até o limite de 10 min. O intervalo entre as sessões no mesmo dia foi de 3 min. Todas as sessões ocorreram entre 9 e 12 hs da manhã. ....85

**Figura 3.6.** Esquema representativo de cortes coronais de cérebro dos ratos dos diferentes grupos de ratos que foram submetidos ao LAM. As pontas das cânulas-guia (círculos pretos) dos ratos usados nas análises estavam na região dorsal da formação hipocâmpal (distância do bregma de -3,84 mm) de acordo com as imagens do atlas de Paxinos e Watson (2007). ....87

**Figura 3.7.** Esquema representativo de cortes coronais de cérebro dos ratos dos diferentes grupos de ratos que foram submetidos ao LR. As pontas das cânulas-guia (círculos pretos) dos ratos usados nas análises estavam na região dorsal da formação hipocâmpal (distância do bregma de -3,84 mm) de acordo com as imagens do atlas de Paxinos e Watson (2007). ....88

**Figura 3.8.** Média ( $\pm$  EPM) das latências de escape dos ratos que receberam injeção intraperitoneal (i.p.). As injeções de salina (salina-i.p.), 0,1 (4-AP0,1-i.p.) ou 0,5 mg/kg (4-AP0,5-i.p.) de 4-aminopiridina ocorreram 30 min antes da 1ª sessão de treino do dia. Foram quatro sessões diárias em 4 dias de treino. As diferenças entre o 2º, 3º e 4º dias de treino foram significativas em relação ao 1º (\*  $p < 0,001$ , teste de Tukey).  $n = 7$  para todos os tratamentos. ....90

**Figura 3.9.** Resposta nos testes de sondagem no LAM dos ratos que receberam injeção intraperitoneal (i.p.). A, média ( $\pm$  EPM) da permanência no quadrante crítico (PQC), não tendo diferenças entre os grupos, mais sim entre o dia dos testes (\*ANOVA de duas vias,  $F_{1,18} = 5,853$ ,  $p < 0,05$ ). B, média ( $\pm$  EPM) da taxa de procura (TP) do quadrante crítico, não tendo diferenças entre os grupos, mas sim entre o dia dos testes (\*ANOVA de duas vias,  $F_{1,18} = 7,682$ ,  $p < 0,05$ ). As injeções de salina (salina-i.p.), 0,1 (4-AP0,1-i.p.) ou 0,5 mg/kg (4-AP0,5-i.p.) de 4-aminopiridina ocorreram 30 min antes da 1ª sessão de treino dos 4 dias de

treino. Os testes de sondagem (45 s de duração) ocorreram ao final do 1º e 3º dias de treino e sem a presença da plataforma. LAM: labirinto aquático de Morris. EPM: erro padrão da média. n = 7 para todos os tratamentos.....91

**Figura 3.10.** Média ( $\pm$  EPM) da permanência no quadrante crítico (PQC) e taxa de procura (TP) do mesmo durante o teste de retenção no LAM por ratos que receberam injeção intraperitoneal (i.p.). Esse teste foi realizado 24 horas após a última sessão de treino e ocorreu sem a presença da plataforma. As injeções de salina (salina-i.p.), 0,1 (4-AP0,1-i.p.) ou 0,5 mg/kg (4-AP0,5-i.p.) de 4-aminopiridina ocorreram 30 min antes da 1ª sessão de treino dos 4 dias de treino. LAM: labirinto aquático de Morris. EPM: erro padrão da média. n = 7 para salina-i.p. e 4-AP0,1-i.p.. n = 6 para 4-AP0,5-i.p.....93

**Figura 3.11.** Média ( $\pm$  EPM) das latências de escape dos ratos que receberam injeção intrahipocampal bilateral (i.h.). Cada dia de treino teve 6 sessões de 90 s. A, as microinjeções (seta) de tampão fosfato salino pH 7,4 (PBS) ou 1 mM de 4-aminopiridina (AP) ocorreram imediatamente antes da 1ª sessão do 1º dia de treino (1dPBS-i.h. e 1d4-AP-i.h., n = 8). A ANOVA de duas vias de medidas repetidas indicou efeito significativo somente para o fator dia ( $^{***} F_{(3,42)} = 48,230, p < 0,001$ ). B, as microinjeções (seta) de PBS ou 1 mM de 4-AP ocorreram imediatamente antes da 1ª sessão do 2º dia de treino (2dPBS-i.h. e 2d4-AP-i.h., n = 6). A ANOVA de duas vias de medidas repetidas indicou efeito significativo para o fator dia ( $F_{(3,30)} = 38,105, p < 0,001$ ) e para a interação tratamento  $\times$  dia ( $F_{(3,30)} = 3,827, p < 0,05$ ). O teste de Tukey revelou que essa interação significativa ocorreu no 2º dia ( $* p < 0,05$ ), dia das microinjeções.....94

**Figura 3.12.** Resposta nos testes de sondagem no LAM dos ratos que receberam injeção intrahipocampal (i.h.). As microinjeções de tampão fosfato salino pH 7,4 (PBS) ou 4-aminopiridina (4-AP) ocorreram no 1º dia (1dPBS-i.h. e 1d4-AP-i.h., n = 8) ou no 2º dia de treino (2dPBS-i.h. e 2d4-AP-i.h., n = 6), ambas administradas imediatamente antes da 1ª sessão do dia. Os testes de sondagem ocorreram ao final do 1º e 3º dias de treino e sem a presença da plataforma. A, média ( $\pm$  EPM) da permanência no quadrante crítico (PQC) para ratos dos grupos 1dPBS-i.h. e 1d4-AP-i.h.. B, média ( $\pm$  EPM) da taxa de procura (TP) da plataforma para ratos dos grupos 1dPBS-i.h. e 1d4-AP-i.h. C e D são médias ( $\pm$  EPM) da PQC e TP, respectivamente, para ratos dos grupos 2dPBS-i.h. e 2d4-AP-i.h.. A ANOVA

duas vias revelou efeito significativo apenas para o fator dia do teste (\*  $F_{(1,24)} = 12,628$ ,  $p < 0,05$ ). LAM: labirinto aquático de Morris. EPM: erro padrão da média. ....97

**Figura 3.13.** Desempenho no teste de retenção no LAM de ratos que receberam injeção intrahipocampal (i.h.). O teste de retenção ocorreu 24 h após a última sessão de treino (24ª sessão). Esse teste teve 90 s de duração e foi realizado sem a plataforma. A, média ( $\pm$  EPM) da permanência no quadrante crítico (PQC) e taxa de procura (TP) da plataforma para os animais que receberam tampão fosfato salino (PBS) ou 1 mM de 4-aminopiridina (4-AP) imediatamente antes da primeira sessão do primeiro dia de treino (1dPBS-i.h. e 1d4-AP-i.h.). B, PQC e TP (média  $\pm$  EPM) para animais cujas microinjeções i.h. (PBS ou 4-AP) ocorreram no começo do segundo dia de treino (2dPBS-i.h. e 2d4-AP-i.h.). LAM: labirinto aquático de Morris. EPM: erro padrão da média. \* e \*\* significam  $p < 0,05$  e  $< 0,01$ , respectivamente. ....98

**Figura 3.14.** Desempenho dos ratos no labirinto radial de oito braços ao longo de três dias de treino (6 sessões por dia). Os animais foram injetados tanto intrahipocampalmente (i.h.) quanto intraperitonealmente (i.p.) logo após a última sessão do dia 1. Alimento (chocolate) foi colocado em uma combinação de três das oito posições (braços). Cada rato teve sua combinação que permaneceu a mesma ao longo das sessões. O grupo PBS (n = 6) foi o controle e recebeu salina (NaCl 0,9 %) i.p. e tampão fosfato salino (PBS) i.h.. O grupo 4-AP (n = 6) recebeu salina i.p. e 1mM de 4-aminopiridina (4-AP) i.h.. O grupo Escopo (n = 6) recebeu 0,5 mg/kg de escopolamina i.p. e PBS i.h.. A 4-AP e a escopolamina foram dissolvidas em PBS e salina, respectivamente. A, média ( $\pm$  EPM) do índice de erros de memória de referência (IEMR) que era anotado para cada sessão quando o rato entrava pela primeira vez em um braço que nunca teve chocolate. B, média ( $\pm$  EPM) do índice de erros de memória operacional (IEMO) que era anotado toda vez que o animal revisitava um braço na mesma sessão. \*\* e \*\*\* representam  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente, em relação ao primeiro dia do grupo 4-AP. ## representa  $p < 0,01$  em relação ao primeiro dia do grupo PBS. + e ++ representam  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente, em relação ao primeiro dia do grupo Escopo (++ também é em relação ao segundo dia). EPM: erro padrão da média. ....99

**Figura 4.1.** Purificação da HgeTx1. A, perfil cromatográfico da peçonha bruta (1,0 mg) de *Hadrurus gertschi* separada em coluna analítica C<sub>18</sub> por HPLC de fase reversa usando um gradiente linear de 100% de solução A (0,12 % de ácido trifluacético - TFA em água ultrapura) até 60 % da solução B (0,10 % de TFA em acetonitrila) em 60 min. B, recromatografia da fração 18 usando um gradiente linear de 100 % da solução A até 40 % da solução B em 60 min. A fração marcada com asterisco seguiu para análise de espectrometria de massa. ....122

**Figura 4.2.** Espectro de massa da principal fração da recromatografia da fração 18 da peçonha de *Hadrurus gertschi*. Massa molecular (M+H)<sup>+</sup> de 3949,27 m/z obtida por sistema MALDI TOF/TOF MS. O primeiro pico ((M+H)<sup>+</sup> de 1974,635 m/z) corresponde ao mesmo componente com dois prótons. ....123

**Figura 4.3.** Influência das toxinas ScTx1 e HgeTx1 na indução de LTP. As médias (± EPM) da inclinação da curva dos potenciais de campo excitatórios pós-sinápticos (PCEPS) são apresentadas como porcentagem da resposta basal (obtida durante 10 minutos anteriores à estimulação tetânica) ao longo do tempo. O momento dessa estimulação é indicado pela seta. Os círculos pretos abertos representam o grupo controle (sem toxina, n = 6); os vermelhos abertos, o grupo ScTx1 (recebeu 6,60 nM ScTx1, n = 6); e os vermelhos fechados, o grupo HgeTx1 (recebeu 0,32 nM HgeTx1, n = 6). Os traçados acima da figura são exemplos de curvas obtidas para cada um dos tratamentos e apresentam os valores sobrepostos dos potenciais de campos evocados antes (cinza) e 60 min após a estimulação tetânica (cada traçado é a média de 10 *sweeps*).....124

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.1.</b> Distribuição de diferentes subtipos de canais para K <sup>+</sup> na formação hipocampal (modificado de Gati et al., 2012) .....	9
<b>Tabela 1.2.</b> Manipulações de canais para K <sup>+</sup> e seus efeitos sobre testes comportamentais de aprendizado e memória. Modificado de Gati <i>et al.</i> (2012).....	19
<b>Tabela 3.1.</b> Média ( $\pm$ EPM) das latências de escape das quatro sessões diárias de cada dia de treino no LAM após injeções intraperitoneais (i.p.).....	90
<b>Tabela 3.2.</b> Média ( $\pm$ EPM) da permanência no quadrante crítico (PQC) e taxa de procura (TP) do mesmo durante os testes de sondagem no LAM por ratos que receberam injeção intraperitoneal (i.p.). .....	92
<b>Tabela 3.3.</b> Média ( $\pm$ EPM) das latências de escape das seis sessões diárias de cada dia de treino no LAM após injeções intrahipocampais (i.h.).....	95

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-AP: 4-aminopiridina

ANOVA: análise de variância

CA: campo aberto

Ca<sup>2+</sup>: íon cálcio

EPM: erro padrão da média

Grupo 1d4AP-i.h.: os ratos desse grupo receberam injeção i.h. de 4-AP (1mM; 0,2 µL/lado) 1 min antes da primeira sessão de treino do primeiro dia

Grupo 1dPBS-i.h.: os ratos desse grupo receberam injeção i.h. de PBS (0,2 µL/lado) 1 min antes da primeira sessão de treino do primeiro dia.

Grupo 2d4AP-i.h.: os ratos desse grupo receberam injeção i.h. de 4-AP (1mM; 0,2 µL/lado) 1 min antes da primeira sessão de treino do segundo dia.

Grupo 2dPBS-i.h.: os ratos desse grupo receberam injeção i.h. de PBS (0,2 µL/lado) 1 min antes da primeira sessão de treino do segundo dia.

Grupo 4-AP: injeção i.h. de 4-AP (1mM – item 3) e i.p. de salina.

Grupo 4-AP0,1-i.p.: os ratos desse grupo receberam intraperitonealmente 0,1 mg/kg de 4-AP (em 0,2 mL de salina) 30 min antes da primeira sessão de treino do dia.

Grupo 4-AP0,5-i.p.: os ratos desse grupo receberam intraperitonealmente 0,5 mg/kg de 4-AP (em 0,2 mL de salina) 30 min antes da primeira sessão de treino do dia

Grupo controle-i.p.: os ratos desse grupo receberam injeção i.p. de salina (0,2 mL) 30 min antes da primeira sessão de treino do dia;

Grupo escop-4-AP: os ratos desse grupo receberam injeção i.p. de escopolamina, seguida da injeção i.h. de 4-AP (30 min de intervalo).

Grupo escopo: os ratos desse grupo receberam injeção i.h. de PBS e i.p. de escopolamina (0,5 mg/kg – item 3);

Grupo escop-sal: os ratos desse grupo receberam injeção i.p. de escopolamina, seguida da injeção i.h. de salina (30 min de intervalo)

Grupo PBS: os ratos desse grupo receberam injeção i.h. de PBS e i.p. de salina (item 3);

Grupo sal-4-AP: os ratos desse grupo receberam injeção i.p. de salina, seguida da injeção i.h. de 4-AP (30 min de intervalo)

Grupo sal-sal: os ratos desse grupo receberam injeção i.p. de salina, seguida da injeção i.h. de salina (30 min de intervalo)

HgeTx1: toxina obtida da peçonha do escorpião *Hadrurus gertschi*

HIV: vírus da imunodeficiência humana

HPLC: *high performance liquide chromatography* (em português, cromatografia líquida de alta eficiência)

i.c.v.: intracérebroventricular

i.h.: intrahipocampal bilateral

i.p.: intraperitoneal

i.v.: intravenoso

I<sub>A</sub>: correntes transientes de K<sup>+</sup>

IEMO: índice de erros de memória operacional

IEMR: índice de erros de memória de referência

I<sub>K</sub>: correntes retificadoras tardias de K<sup>+</sup>

K<sup>+</sup>: íon potássio

K<sub>2P</sub>: canais para íon potássio que possuem dois-poros in tandem

K<sub>Ca</sub>: canais para íon potássio cálcio-ativados

K<sub>ir</sub>: canais para íon potássio retificadores de influxo (*inward-rectifiers*)

Kv: canais para íon potássio voltagem-dependentes

LAM: labirinto aquático de Morris

LCRA: líquido cefalorraquidiano artificial

LR: labirinto radial de oito braços

LTP: long-term potentiation (em português, potenciação de longo prazo)

MALDI-TOF: *Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight*

PBS: tampão fosfato salino

PCEPS: potencial de campo excitatório pós-sináptico

PQC: permanência no quadrante crítico

s.c.: subcutâneo

ScTx1: toxina obtida da peçonha da aranha *Stromatopelma calceata*

TEA: tetraetilamônio

TP: Taxa de procura do quadrante crítico

## AGRADECIMENTOS

Esta tese só foi possível devido ao esforço e cooperação, muitas vezes incondicional, de várias pessoas e ao apoio de diferentes instituições. Tentarei nomeá-los todos e prestar meus agradecimentos.

Antes de tudo, agradeço à família. À minha mãe Carminha e meu irmão Leo pelo amor, generosidade e exemplo de trabalho duro e honesto. Aos meus sogros, que também considero meus pais, Rodolfo e Loreny pelo carinho e por estarem sempre me ensinando o que é ser um cientista. E por fim, às duas pessoas mais importantes de minha vida: minha esposa Lilian e meu filho Vítor. Vocês dois acreditaram em mim, quando eu já tinha desistido. Vocês dois me motivam a ser melhor e a fazer melhor. Eu me esforço todos os dias para merecer o amor de vocês. Vocês todos são minha fortaleza.

À Profa. Elisabeth Schwartz não só pela orientação, mas por assumir e apoiar um aluno com um projeto que, em grande parte, era diferente de suas linhas de pesquisa. Só uma pesquisadora destemida e generosa assumiria tal desafio.

À Profa. Márcia Mortari também pela orientação e coragem, mas em especial pela amizade. Ela foi umas das que me incentivou a me engajar no doutoramento depois de ter passado muito tempo do mestrado.

Ao Prof. Carlos Bloch Jr. por oferecer a infraestrutura do Laboratório de Espectrometria de Massas (Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia) e também ao Eder Barbosa por me auxiliar com a espectrometria de massa e sequenciamentos *de novo*.

À Profa. Maria Braga que me recebeu em seu laboratório nos EUA para os experimentos de *field potential in vitro*. Sua capacidade de liderança, generosidade e bom humor são fora de escala e exemplos que levarei para toda a vida.

Aos profs. Carlos Schwartz, Antônio Sebben e Osmino Pires Júnior pelas boas conversas e por me lembrarem da beleza da descoberta científica e do companheirismo na Academia.

Aos alunos Ana Gabriela, Joseilma, Gabriel, Guilherme, Rafael e Victor por terem dividido comigo a execução dos testes comportamentais no labirinto aquático de Morris e

labirinto radial de oito braços. Sem esse trabalho coletivo esses experimentos não seriam possíveis.

Aos amigos e colegas Andréa, Carol, Cecília, Claudia, Fagner, Flávia, Harry, Jacqueline, Jimmy, Juliana, Karla, Luciana, Natiela, Pedro, Pollyanna, Priscila, Rafael, Solange e Talitha pelo convívio. Vale aqui um agradecimento especial ao Leandro pela ajuda no trabalho, pelas conversas sobre o que realmente importa na vida acadêmica e por sua amizade sincera.

À Profa. Carolina Lucci, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal por sua competência na gestão do Programa e por ter prontamente atendido a todas as minhas solicitações. Também por essas razões agradeço as secretárias Daniele e Ana Paula.

Ao Jivago, veterinário responsável pelo biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UnB, e à Adriana, bioterista, pelo zelo na administração biotério e manutenção dos animais utilizados nos experimentos desta tese.

Nos EUA, algumas pessoas me ajudaram e merecem meu reconhecimento e agradecimento. Kátia, Franco, Camila, Márcio, Steven e Robert por criarem um ambiente agradável de convívio. Eric por me ensinar as técnicas de *field potential in vitro*. Gostaria de mencionar um obrigado especial à Taiza, pois seu trabalho tornou possível minha ida para os EUA e contribuiu decisivamente para minha excelente condição de trabalho no laboratório.

Muitas pessoas na Universidade Católica de Brasília trabalharam muito para que eu pudesse obter minha licença, me permitindo dedicação exclusiva ao doutoramento. Entre elas gostaria de agradecer às Professoras Adriana Hanai Tavares, Cláudia Mendonça Garcia, Fabiana Nunes de Carvalho e Lourdes El-moor Loureiro.

Eu também gostaria de agradecer às Instituições que apoiaram meu trabalho, fornecendo infraestrutura, verbas de pesquisa e/ou bolsa de estudos. São elas: Universidade de Brasília (UnB), Instituto de Ciências Biológicas – IB/UnB, Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal - IB/UnB, Laboratório de Toxinologia – IB/UnB, Laboratório de Espectrometria de Massas (Embrapa – Recursos Genéticos e Biotecnologia), *Uniformed Services University of the Health Sciences* (Bethesda, EUA), Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) pelo financiamento de pesquisa, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento de pesquisa e minha bolsa de doutorado (processo

142949/2010-8) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) por minha bolsa de doutorado sanduíche no exterior (processo BEX: 17584/12-4).

## RESUMO

Os canais para  $K^+$  são agrupados em quatro famílias sendo uma delas a de canais voltagem-dependentes ( $K_v$ ). Os canais  $K_v$  estão presentes na formação hipocampal, estrutura chave na consolidação da memória declarativa e espacial. Apesar de trabalhos mostrem a participação de canais para  $K^+$  nos processos de aprendizagem e memória, não está claro qual o papel dos canais  $K_v$ . Em função de evidências da literatura, acreditamos que canais  $K_v$  subtipo 1.1 ( $K_v1.1$ ) contribuem positivamente para a formação de memória espacial enquanto os  $K_v$  subtipo 2.1 ( $K_v2.1$ ) têm efeito oposto no mesmo fenômeno. O objetivo deste trabalho é testar essa hipótese. Para ratificar a influência dos canais  $K_v$  na memória espacial, além de padronizar testes comportamentais e eletrofisiológicos relacionados a processos da memória, foi utilizada a 4-aminopiridina (4-AP), um bloqueador seletivo para canais  $K_v$ , e a escopolamina, um antagonista de receptor muscarínico com comprovado efeito amnésico. Também foram selecionadas duas toxinas para os testes: HgeTx1 e ScTx1. A HgeTx1 é um peptídeo do escorpião *Hadrurus gertschi* e um bloqueador de canais  $K_v1.1$ . A ScTx1 é um peptídeo da aranha *Stromatopelma calceata* e um bloqueador de canais  $K_v2.1$ . Enquanto a ScTx1 foi adquirida comercialmente, a HgeTx1 foi obtida a partir da peçonha de escorpiões por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, sigla em inglês) e caracterizada quimicamente por meio de espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF. A administração das substâncias foi intrahipocampal bilateral na região de CA1 (i.h.) ou intraperitoneal (i.p.). Ratos Wistar machos sob o efeito de diferentes substâncias supracitadas (exceto as toxinas) foram submetidos a três testes comportamentais de aprendizagem e memória espacial: o campo aberto (CA), o labirinto radial de oito braços (LR) e o labirinto aquático de Morris (LAM). Todas as substâncias (incluindo as toxinas) também foram utilizadas em preparações de fatias da formação hipocampal de cérebros (*slice*) de ratos para verificar seus efeitos sobre a indução de *long-term potentiation* (LTP) nas sinapses Schaefer-CA1, um dos possíveis mecanismos celulares/moleculares da memória. Os testes comportamentais confirmaram o envolvimento dos canais  $K_v$  na memória dependente da formação hipocampal. Os testes no CA mostraram que a escopolamina i.p. ( $n = 5$ ) provocou prejuízo da habituação espacial, efeito revertido parcialmente pela 4-AP i.h. ( $n = 5$ ). Nos testes no LR, o bloqueio dos canais  $K_v$  pela 4-AP i.h. ( $n = 6$ ) facilitou tanto a memória operacional quanto a memória de referência, enquanto o desempenho dos animais foi prejudicado pela escopolamina i.p. ( $n = 6$ ). Os testes com o LAM mostraram resultados semelhantes, pois a 4-AP i.h. melhorou o desempenho dos ratos. Os testes eletrofisiológicos *in vitro* complementaram os comportamentais. A escopolamina inibiu a indução de LTP ( $n = 6$ ), enquanto a 4-AP o intensificou ( $n = 6$ ), achados que reforçam os do CA e LR. Foi também interessante observar que a 4-AP reverteu o efeito supressor da escopolamina ( $n = 6$ ), resultado semelhante ao obtido no CA. Por fim, a HgeTx1 diminuiu a magnitude do LTP ( $n = 6$ ) e a ScTx1 o aumentou ( $n = 6$ ), satisfazendo previsões deste trabalho. Os resultados obtidos até o momento não só fortalecem a importância dos canais  $K_v$  na aprendizagem e memória espacial, mas também corroboram nossa hipótese sugerindo que os canais  $K_v1.1$  e  $K_v2.1$  possuem efeitos distintos e complementares na formação da memória.

## ABSTRACT

$K^+$  channels are the most diverse among ion channels. They are grouped into four families, one of which is the voltage-dependent ( $K_v$ ) channels. These are widely distributed in the mammalian brain, especially in the hippocampus, a key structure in the consolidation of declarative and spatial memories. Although studies show the involvement of  $K^+$  channels in learning and memory, the role of  $K_v$  channels in these processes still unclear. Based on previous studies, we believe that  $K_v$  subtype 1 ( $K_v1$ ) channels contribute positively to the spatial memory formation, while  $K_v$  subtype 2 ( $K_v2$ ) have the opposite effect on the same phenomenon. The aim of this work was to test this hypothesis. We used 4-aminopyridine (4-AP), a selective blocker for  $K_v$  channels, and scopolamine, a muscarinic receptor antagonist with proved amnesic effect to confirm the influence of  $K_v$  channels on spatial memory. Additionally, the same drugs were used to standardizing behavioral and electrophysiological tests related to memory processes. Two toxins were selected for the tests: HgeTx1 and ScTx1. The former is a peptide from the *Hadrurus gertschi* scorpion, being a  $K_v1.1$  channel blocker. ScTx1 is a peptide from the *Stromatopelma calceata* spider, being a  $K_v2.1$  channel blocker. While ScTx1 was commercially obtained, HgeTx1 was obtained directly from the scorpion venom by high performance liquid chromatography (HPLC) and chemically characterized by means of MALD-TOF mass spectrometry. Compounds were administered bilateral into CA1 region of the hippocampus (i.h.) or intraperitoneally (i.p.). Male Wistar rats, under the effect of the different substances mentioned above (except toxins), were submitted to three behavioral spatial learning and memory tests: the open field (OF), the eight-arm radial maze (RM) and the Morris water maze (WM). All substances (including toxins) were also used in hippocampal slices of the rat brain to test their effects on the induction of long-term potentiation (LTP) on CA1 pyramidal neurons, a cell/molecular memory model. The behavioral tests confirmed the involvement of  $K_v$  channels in hippocampal-dependent memory formation. The OF tests showed that i.p. scopolamine ( $n = 5$ ) induced a deficit in spatial habituation. This effect was partially reversed by i.h. 4-AP ( $n = 5$ ). In RM tests,  $K_v$  channel blockade by i.h. 4-AP ( $n = 6$ ) facilitated working and reference memory, whereas the animal's performance was impaired by i.p. scopolamine ( $n = 6$ ). The WM tests showed similar results, since 4-AP improved the rat performance. *In vitro* electrophysiological tests complemented the behavioral. Scopolamine inhibited LTP induction ( $n = 6$ ), while 4-AP potentiated it ( $n = 6$ ), results consistent with the results of from the OF and RM. Interestingly, 4-AP reversed the suppressive effect of scopolamine on LTP ( $n = 6$ ), similar to the result seen in the OF. Finally, Hgetx1 decreased LTP magnitude ( $n = 6$ ) and ScTx1 increased it ( $n = 6$ ), confirming the predictions of the present work. Thus, our results underscore the importance of  $K_v$  channels on spatial learning and memory and corroborate our hypothesis that  $K_v1$  and  $K_v2$  channels have distinct and complementary effects on memory.

# Capítulo 1

## Apresentação do problema e da hipótese do trabalho

Neste capítulo, o objetivo é fazer uma introdução geral da tese. Será explicado o tema do trabalho com a proposição de um problema de estudo, seguido de sua delimitação. Ocorrerá também a definição de uma hipótese que será testada por experimentos relatados nos demais capítulos.

*“A resposta certa, não importa nada: essencial é que as perguntas estejam certas.”*

*Mário Quintana*

Beveridge (1981) destacou que o emprego do método científico para a compreensão de um fenômeno deve começar com o reconhecimento do problema, na sua delimitação e na redução da questão a seus componentes específicos. Nesse momento, é importante esclarecer os conceitos. A isso, segue-se a coleta de dados relevantes obtidos por meio da literatura científica e observações sistemáticas dos aspectos do fenômeno. Nesse sentido, os dados precisam ser padronizados e tabulados. Em sequência, ocorre a formulação de uma hipótese por indução. Por tanto, o objetivo do primeiro capítulo é cumprir essas etapas quanto ao fenômeno da participação dos canais iônicos voltagem-dependentes para o íon potássio ( $K^+$ ) presentes em neurônios nos processos cognitivos de aprendizagem e memória.

## **APRENDIZAGEM E MEMÓRIA**

Vários conceitos já foram atribuídos à aprendizagem e à memória. Para Tulving (1987), esses dois fenômenos estariam intimamente ligados. Segundo ele, a aprendizagem seria a capacidade de um ser vivo adquirir informações, enquanto a memória, além dessa habilidade, também envolveria a retenção e o uso do conhecimento adquirido. Para Tomaz (1993), memória seria a “capacidade do indivíduo se situar no presente levando em consideração o passado e o futuro”. Portanto, ele destaca o aspecto adaptativo do fenômeno da memória quando diz que ela é um fator determinante do comportamento, pois permite ao indivíduo selecionar as reações mais apropriadas às demandas do ambiente com base nas experiências vividas e nas consequências de seus atos, aumentando sua chance de sobrevivência. Porém, esses conceitos de aprendizagem e memória não são tão simples de serem aplicados em testes experimentais para animais de laboratório, seja *in vivo* ou *in vitro* (fatias do cérebro, por exemplo). Carlson (2002) talvez tenha elaborado um conceito que resolva essa questão. Segundo ele, aprendizagem seria a mudança de comportamento de um organismo (ou sistema) vivo em função de suas experiências. Essas vivências ou treinamento seriam capazes de alterar o Sistema Nervoso (ou parte dele) produzindo, portanto, a mudança comportamental. Essas alterações no tecido nervoso seriam a memória.

Considerando que a memória engloba a aprendizagem, existiriam vários tipos de memória ou essa seria um fenômeno único? Talvez a resposta esteja no meio do caminho entre essas duas alternativas. Possivelmente ela apresenta múltiplos sistemas inter-relacionados que

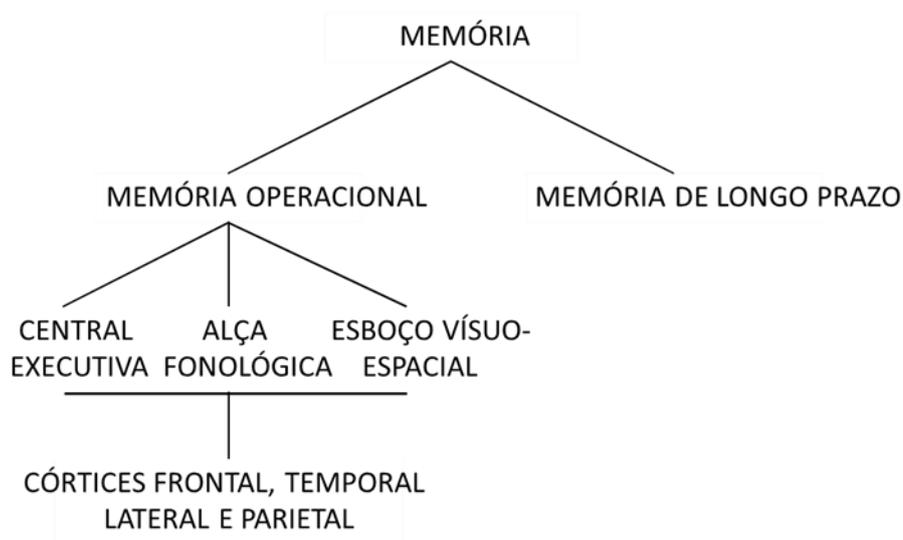
trabalham em uníssono e são capazes de responder às experiências produzindo mudanças de comportamento (Tulving, 1987; Squire, 2004). Porém, cada sistema é responsável por processar paralelamente aspectos distintos da interação do indivíduo com o ambiente, usando para isso diferentes processos e princípios psicobiológicos (Tulving, 1987; Squire, 2004). Essa proposição é baseada em experimentos com indivíduos que apresentam alterações locais na atividade cerebral ocorridas patologicamente (humanos) ou induzidas em laboratório (animais de pesquisa). Em muitos casos, essa condição leva a um prejuízo parcial nas atividades desses sujeitos em múltiplas tarefas de aprendizagem e memória, ou seja, o desempenho é comprometido em alguns testes, mas se mantém normal em outros (Tulving, 1987; Squire, 2004). Interessantemente, múltiplos sistemas de memória implicam também em múltiplas estratégias de aprendizagem. Como os sistemas trabalham paralelamente frente a uma tarefa, diferentes estratégias em curso podem ser conflituosas o que explicaria casos de desempenhos contraditórios entre humanos e animais de laboratório, ou entre sujeitos normais e amnésicos/lesionados (Squire, 2004).

Partindo-se da hipótese dos múltiplos sistemas de memória, como eles poderiam ser classificados? Baseando-se na diferença de decurso temporal entre mudanças na atividade elétrica e alterações bioquímicas no encéfalo, Hebb (1949 *apud* Baddeley, 2001) propôs uma primeira divisão dos sistemas em memória de curto prazo e memória de longo prazo, que é válida para os mamíferos. Os subsistemas da memória de curto prazo seriam responsáveis pela evocação da informação imediatamente após sua apresentação, enquanto os de longo prazo mediarão a recuperação da informação em um período após ela ter sido vivenciada pelo indivíduo, mesmo que este tempo seja de poucos segundos (Tulving, 1987).

Estudos de casos clínicos enfraqueceram a hipótese de uma memória de curto prazo única (Baddeley, 2001; Baddeley, 2003), que foi substituída pela memória operacional, um modelo de três componentes (Baddeley e Hitch, 1974 *apud* Baddeley, 2003). Os sistemas de memória operacional permitem ao indivíduo a manutenção temporária de uma quantidade limitada de informação, facilitando várias habilidades cognitivas como a aprendizagem, o raciocínio e a compreensão (Baddeley e Hitch, 1974 *apud* Shrager *et al.*, 2008). Diferente da memória de longo prazo, as estruturas do lobo temporal medial cerebral não são críticas para a memória

operacional, que parece depender de diferentes regiões do neocórtex, em particular dos córtices frontal, temporal lateral e parietal (Shrager *et al.*, 2008).

Como já foi mencionado, a memória operacional é composta por três sistemas: a central executiva, a alça fonológica e o esboço visuo-espacial (Baddeley e Hitch, 1974) *apud* (Baddeley, 2003). A central executiva é um sistema de controle geral do comportamento e é subsidiado pelas outras duas (Baddeley, 2003). A alça fonológica é um sistema de armazenamento de informação no qual traços da memória são mantidos em evidência por alguns segundos por meio de sua reverberação verbal interna (Baddeley, 2003). O esboço visuo-espacial é também um subsistema de armazenamento que retém a informação visual (como cor, forma e localização) de poucos objetos por algum tempo, mesmo depois deles terem sido retirados (Baddeley, 2003). A Figura 1.1 apresenta uma primeira taxonomia da memória e algumas estruturas nervosas envolvidas nela.



**Figura 1.1.** Taxonomia parcial dos múltiplos sistemas de memória. Primeira divisão com base no tempo de retenção das informações. Algumas estruturas neurais envolvidas nas formas de memória também são apresentadas.

Os sistemas de memória de longo prazo podem ter várias classificações, porém uma das primeiras propostas foi a de Tulving (1987), que estava pensando em humanos quando a idealizou. Ele os dividiu em memória episódica, memória semântica e memória procedural.

A memória episódica permite ao indivíduo lembrar acontecimentos pessoais do passado (Tulving, 1987). Ela consistiria de um subconjunto de sistemas que possibilita ao sujeito

visualizar mentalmente e verbalizar eventos vivenciados por ele. Por sua vez, os subsistemas poderiam ser divididos nos responsáveis pela evocação e nos mediadores do reconhecimento.

Os sistemas da memória semântica possibilitam a elaboração de conceitos do mundo que cerca o organismo (Tulving, 1987). Eles dão lugar à construção de representações mentais de objetos e fatos. Diferente da memória episódica, a semântica é impessoal, genérica e, portanto, pode ser amplamente compartilhada com diferentes indivíduos.

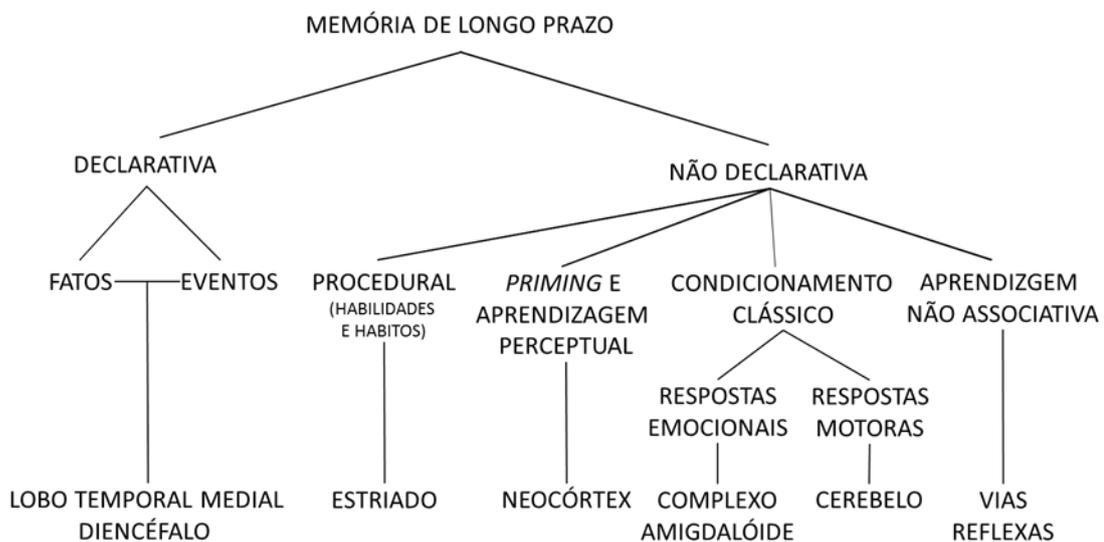
A memória procedural seria responsável pela retenção dos aprendizados que estabelecem uma relação entre um estímulo e uma resposta (Tulving, 1987). Essa memória seria a mais básica em relação às duas apresentadas anteriormente. Nela, a expressão da informação aprendida, além de ser automática, pois não requer atenção dirigida do sujeito, seria apenas comportamental, não tendo o componente simbólico, como nas memórias episódica e semântica. Cohen e Squire (1980) também consideraram nessa divisão da memória o aprendizado de habilidades perceptuais–motoras e padrão-analisadoras.

Os múltiplos sistemas de memória podem receber outra classificação. As memórias episódica e semântica requerem um esforço consciente para lembrança de eventos passados e a origem do conhecimento em tais eventos (só para a episódica), por isso, elas também coletivamente chamadas de memória explícita. Como essa necessidade não existe para a evocação da informação na memória procedural, ela pode ser denominada de implícita. A memória episódica e a semântica podem ainda ser classificadas como declarativas, uma vez que a expressão do conhecimento aprendido pode se dar por meio da palavra (Tulving, 1987).

A memória declarativa foi proposta por Cohen e Squire (1980) e significa mais do que poder expressar verbalmente um conhecimento. Ela está relacionada com a retenção e evocação consciente de fatos, de eventos ou de informação codificada em regras ou procedimentos (Cohen e Squire, 1980; Squire, 2004). Os sistemas dessa divisão da memória organizam o conhecimento de forma reticular, estabelecendo relações entre vários elementos e experiências, permitindo a formação de memórias reflexíveis que fornecem ao indivíduo um modelo de mundo e um repertório de possíveis respostas a diferentes demandas do ambiente (Squire, 2004). Nessa perspectiva, o componente da expressão verbal da memória declarativa perde importância, o que autoriza o uso do conceito para outros animais além do homem (Squire, 2004). Surge também o termo memória não-declarativa para abarcar todos os outros

sistemas de memórias. Essa, diferente da declarativa, codifica as informações do ambiente de forma fixa e sua expressão se dá pela ação comportamental estereotipada em resposta à situação do aprendizado original, não havendo evocação consciente (Squire, 2004). Outra diferença importante entre memória declarativa e não declarativa é que na primeira a codificação da informação pode ocorrer a partir de uma única experiência do indivíduo, enquanto na última a aquisição ocorre lentamente ao longo de vários eventos separados (Squire, 2004).

A Fig. 1.2 apresenta uma taxonomia para a memória de longo prazo (Squire, 2004). É importante lembrar que consideramos a memória um conjunto de múltiplos sistemas que, por sua vez, são definidos não apenas funcionalmente, mas também estruturalmente. Portanto, a Fig. 1.2 também apresenta as estruturas que seriam críticas em cada um dos subsistemas de memória de longo prazo.



**Figura 1.2.** Taxonomia dos sistemas de memória de longo prazo. Essa classificação complementa a da Fig. 1.1. São apresentadas estruturas nervosas importantes para cada forma de memória. Modificado de Squire (2004).

Paralelo a essa classificação, existe a memória espacial. Essa se refere à capacidade de um animal adquirir e armazenar informações do espaço ao seu redor, permitindo a ele aprender a melhor rota para um local mais seguro ou com maior chance de proporcionar alimento. A memória espacial possui tanto um componente de memória operacional, quanto de longo prazo

e é dependente da atividade da formação hipocampal (Kessels *et al.*, 2001; Paul *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2010).

Por fim, é importante apresentar um fenômeno constantemente abordado nos estudos sobre memória: a amnésia. Essa significa a incapacidade de um indivíduo de evocar memórias. Ela pode ser considerada como um prejuízo seletivo da memória episódica (Tulving, 1987), resultado, em geral, de um dano cerebral. A amnésia pode ser dividida em duas categorias: anterógrada e retrógrada. Na primeira, o sujeito não consegue formar memória de eventos que ocorreram após a lesão, enquanto na última ele não consegue lembrar-se de episódios que aconteceram antes da lesão (Carlson, 2002). Estudos com pacientes e animais de laboratório sugerem que o lobo temporal medial e o diencéfalo médio seriam as estruturas cerebrais implicadas na amnésia anterógrada (ver Aggleton e Pearce, 2001 para uma revisão).

## **OS CANAIS PARA K<sup>+</sup>**

A atividade dos canais para K<sup>+</sup> tem se mostrado relevante para os fenômenos de aprendizagem e memória (Kim e Hoffman, 2008; Gati *et al.*, 2012). Esses canais possuem a maior diversidade entre os canais iônicos. Nos mamíferos, enquanto já foram descritos nove genes que codificam canais para Na<sup>+</sup> e dez para o Ca<sup>2+</sup>, são pelo menos 78 para o K<sup>+</sup> (Judge *et al.*, 2007). Além desse grande número de genes, os processos de *splicing* alternativo, modificações pós-traducionais e formação de canais heteroméricos pela associação de diferentes  $\alpha$ -subunidades também contribuem para a diversidade dos canais para K<sup>+</sup> (Coetzee *et al.*, 1999). Esses canais para o íon potássio são agrupados em quatro famílias: os canais voltagem-dependentes (K<sub>v</sub>), os cálcio-ativados (K<sub>Ca</sub>), os retificadores de influxo ou *inward-rectifiers* (K<sub>ir</sub>) e os que possuem dois-poros *in tandem* (K<sub>2P</sub>). Adicionalmente, essas famílias possuem muitas subfamílias, cada uma contendo vários membros: os canais K<sub>v</sub> possuem 12 subfamílias (K<sub>v</sub>1-K<sub>v</sub>12); os K<sub>Ca</sub>, 5 subfamílias (K<sub>Ca</sub>1-K<sub>Ca</sub>5); os K<sub>ir</sub>, 7 subfamílias (K<sub>ir</sub>1-K<sub>ir</sub>7); e os K<sub>2P</sub>, 15 subfamílias (K<sub>2P</sub>1-K<sub>2P</sub>7, K<sub>2P</sub>9-K<sub>2P</sub>10, K<sub>2P</sub>12-K<sub>2P</sub>13 e K<sub>2P</sub>15-K<sub>2P</sub>18) (Goldstein *et al.*, 2005; Gutman *et al.*, 2005; Kubo *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2005).

Cada uma das quatro famílias de canais para K<sup>+</sup> são estruturalmente relacionadas. Os canais K<sub>v</sub>, K<sub>Ca</sub> e K<sub>ir</sub> são proteínas transmembrana formadas por quatro  $\alpha$ -subunidades, enquanto os K<sub>2P</sub> por apenas duas. As  $\alpha$ -subunidades de todos os canais K<sub>v</sub> e dos K<sub>Ca</sub>2 e K<sub>Ca</sub>3

possuem seis segmentos transmembrana (6TM), enquanto nas dos canais  $K_{Ca1}$ ,  $K_{Ca4}$  e  $K_{Ca5}$  são 7TM. Todos os canais  $K_{ir}$  têm  $\alpha$ -subunidades com 2TM e as dos  $K_{2P}$  contêm 4TM. As  $\alpha$ -subunidades dos canais  $K_{2P}$  formam dois poros e nos demais apenas um. Quando se associam para formarem um canal, as  $\alpha$ -subunidades podem ser idênticas, gerando canais homotetraméricos e homodiméricos, ou podem ser diferentes resultando em canais heterotetraméricos e heterodiméricos (Judge *et al.*, 2007).

A atividade dos canais para potássio influencia muitas funções celulares, como a excitabilidade de células neuronais e musculares, secreção eletrolítica e regulação do volume e proliferação celular (Goldstein *et al.*, 2005; Gutman *et al.*, 2005; Kubo *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2005). Neste contexto, peptídeos que bloqueiam canais para  $K^+$  têm auxiliado na elucidação da função fisiológica desses canais nos diferentes tecidos. Da mesma forma, o tratamento de doenças relacionadas à disfunção de canais iônicos, como as doenças neurodegenerativas, epilepsia, tumores cerebrais, dor, entre outras, também tem sido realizado por meio da utilização de bloqueadores de canais iônicos (Judge *et al.*, 2007).

Porém, os bloqueadores clássicos de canais para potássio (Mathie *et al.*, 1998) não são específicos, nem agem sobre todos os tipos de canais para  $K^+$ . Por exemplo, o tetraetilamônio (TEA) bloqueia diferentes subtipos de canais  $K_v$  (exceto  $K_{v4.2}$ ,  $K_{v4.3}$ ,  $K_{v5.1}$ ,  $K_{v7.1}$  e todos das subfamílias  $K_{v6}$ ,  $K_{v8-K_{v12}}$ ),  $K_{Ca}$  (exceto os da subfamília  $K_{Ca2}$ ,  $K_{Ca3}$ ) e os subtipos  $K_{ir3.4}$  e  $K_{ir7.1}$ , porém não tem efeito sobre canais  $K_{2P}$  (Goldstein *et al.*, 2005; Gutman *et al.*, 2005; Kubo *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2005). A 4-aminopiridina (4-AP), outro bloqueador farmacológico tradicional, também atua em diferentes subtipos de canais  $K_v$  (exceto  $K_{v3.4}$ ,  $K_{v5.1}$  e todos das subfamílias  $K_{v6-K_{v12}}$ ), nos subtipos  $K_{ir3.4}$ ,  $K_{ir7.1}$ , mas não nos canais  $K_{Ca}$  e nem nos  $K_{2P}$  (Goldstein *et al.*, 2005; Gutman *et al.*, 2005; Kubo *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2005).

## **CANAIS PARA $K^+$ E MEMÓRIA**

Os canais para  $K^+$  possuem uma vasta distribuição pelo encéfalo de mamíferos. Esses canais são encontrados em estruturas do telencéfalo, diencéfalo, tronco encefálico e cerebelo (Goldstein *et al.*, 2005; Gutman *et al.*, 2005; Kubo *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2005; Vacher *et al.*, 2008). Particularmente, a formação hipocampal expressa muitos tipos de canais para  $K^+$ . Como pode ser observado na Tabela 1.1, nessa estrutura já foram identificados 41 subtipos de canais

para  $K^+$  pertencentes às quatro famílias ( $K_v$ ,  $K_{Ca}$ ,  $K_{ir}$  e  $K_{2P}$ ). Entre esses, os canais que parecem ser mais expressos na formação hipocampal são os  $K_v7.2$ ,  $K_v7.3$ ,  $K_{Ca1.1}$ ,  $K_{ir3.2}$  e  $K_{ir3.3}$ , seguidos pelos  $K_v1.1$ ,  $K_v1.6$ ,  $K_v3.1$ ,  $K_v4.2$ ,  $K_v10.1$ ,  $K_{Ca2.1}$ ,  $K_{Ca2.2}$ , e  $K_{ir3.1}$  (Tabela 1.1).

A formação hipocampal é um substrato neural importante para a aprendizagem e memória. Essa estrutura do lobo temporal medial tem uma participação chave na consolidação da memória declarativa. Ela recebe informações de eventos e lugares do neocórtex, é capaz de armazená-las por um período de tempo (até semanas) e as transfere gradativamente para regiões específicas do córtex cerebral contribuindo para a formação da memória de longo prazo (Kandel *et al.*, 2000).

**Tabela 1.1.** Distribuição de diferentes subtipos de canais para  $K^+$  na formação hipocampal (modificado de Gati *et al.*, 2012)

Canais	Formação hipocampal			Técnica empregada	Ref.
	CA1	CA3	DG		
$K_v1.1$	++	+++	+++	Hibridização <i>in situ</i> , imunohistoquímica, imunocitoquímica e coimunoprecipitação em cérebro de rato, camundongo ou gerbil.	Monaghan <i>et al.</i> , 2001; Wang <i>et al.</i> , 1994; Park <i>et al.</i> , 2001
$K_v1.2$	+	+	++		
$K_v1.3$	-	-	-	Imunohistoquímica em cérebro de gerbil.	Park <i>et al.</i> , 2001
$K_v1.4$	++	++	++	Hibridização <i>in situ</i> , imunohistoquímica e imunocitoquímica em cérebro de rato, camundongo ou gerbil.	Lujan <i>et al.</i> , 2003; Wang <i>et al.</i> , 1994; Park <i>et al.</i> , 2001
$K_v1.5$	+	+	-	Imunohistoquímica ou <i>single-cell</i> RT-PCR em cérebro de gerbil ou rato.	Zhong <i>et al.</i> , 2005; Park <i>et al.</i> , 2001

Tabela 1.1. Continuação

Canais	Formação hipocampal			Técnica empregada	Ref.
	CA1	CA3	DG		
K <sub>v</sub> 1.6	++	+++	+++	Imunohistoquímica em cérebro de gerbil.	Park <i>et al.</i> , 2001
K <sub>v</sub> 2.1	++	++		<i>Single-cell</i> RT-PCR em cérebro de rato.	Zhong <i>et al.</i> , 2005
K <sub>v</sub> 3.1	++	+++	+++	Northern blot e hibridização <i>in situ</i> em cérebro de rato.	Weiser <i>et al.</i> , 1994
K <sub>v</sub> 3.2	+++	++	-		
K <sub>v</sub> 3.3	+	+	++		
K <sub>v</sub> 3.4	-	-	++		
K <sub>v</sub> 4.1	+	+	++	Hibridização <i>in situ</i> em cérebro de rato.	Serodio e Rudy, 1998
K <sub>v</sub> 4.2	+++	++	+++	Hibridização <i>in situ</i> ou imunohistoquímica em cérebro de rato ou camundongo.	Serodio e Rudy, 1998; Varga <i>et al.</i> , 2000; Tsaur <i>et al.</i> , 1997
K <sub>v</sub> 4.3	+	++	+++	Hibridização <i>in situ</i> em cérebro de rato.	Serodio e Rudy, 1998; Tsaur <i>et al.</i> , 1997
K <sub>v</sub> 7.2 (Kcnq2)	+++	+++	+++	Hibridização <i>in situ</i> e imunohistoquímica em cérebro de rato.	Saganich <i>et al.</i> , 2001
K <sub>v</sub> 7.3 (Kcnq3)	+++	+++	+++		
K <sub>v</sub> 10.1 (Eag1)	++	+++	++	Hibridização <i>in situ</i> , RT-PCR ou imunohistoquímica em cérebro de rato.	Saganich <i>et al.</i> , 2001; Martin <i>et al.</i> , 2008

Tabela 1.1. Continuação.

Canais	Formação			Técnica empregada	Ref.
	hipocampal				
	CA1	CA3	DG		
<b>K<sub>v</sub>10.2</b> <b>(Eag2)</b>	-	-	-		
<b>K<sub>v</sub>11.1</b> <b>(Erg1)</b>	++	-	-		
<b>K<sub>v</sub>11.2</b> <b>(Erg2)</b>	-	-	-	Hibridização <i>in situ</i> e imunohistoquímica em cérebro de rato	Saganich <i>et al.</i> , 2001
<b>K<sub>v</sub>11.3</b> <b>(Erg3)</b>	+++	-	-		
<b>K<sub>v</sub>12.1</b> <b>(Elk3)</b>	+	-	+		
<b>K<sub>v</sub>12.2</b> <b>(Elk2)</b>	++	-	++		
<b>K<sub>Ca</sub>1.1</b> <b>(BK/Slo)</b>	+++	+++	+++	Hibridização <i>in situ</i> , <i>western blot</i> , imunohistoquímica, imunofluorescência, imunocitoquímica ou <i>binding</i> radioativo em cérebro de camundongo ou rato.	Knaus <i>et al.</i> , 1996; Sausbier <i>et al.</i> , 2006; Sailer <i>et al.</i> , 2006
<b>K<sub>Ca</sub>2.1</b> <b>(SK1)</b>	++	+++	++	Hibridização <i>in situ</i> , <i>immunoblot</i> , imunohistoquímica ou <i>binding</i> radioativo em cérebro de rato.	Stocker e Pedarzani, 2000; Sailer <i>et al.</i> , 2002
<b>K<sub>Ca</sub>2.2</b> <b>(SK2)</b>	+++	+++	+	Hibridização <i>in situ</i> , <i>immunoblot</i> , imunohistoquímica ou <i>binding</i> radioativo em cérebro de rato.	Stocker e Pedarzani, 2000; Sailer <i>et al.</i> , 2002; Mpari <i>et al.</i> , 2008
<b>K<sub>Ca</sub>2.3</b> <b>(SK3)</b>	+	++	+		
<b>K<sub>2p</sub>1.1</b> <b>(TWIK-1)</b>	-	++	++	Hibridização <i>in situ</i> em cérebro de rato e camundongo.	Talley <i>et al.</i> , 2001
<b>K<sub>2p</sub>2.1</b> <b>(TREK-1)</b>	++	+	+++	Hibridização <i>in situ</i> , <i>western blot</i> , imunohistoquímica, imunofluorescência ou imunocitoquímica em cérebro de rato ou camundongo.	Hervieu <i>et al.</i> , 2001; Talley <i>et al.</i> , 2001

Tabela 1.1. Continuação.

Canais	Formação hipocampal			Técnica empregada	Ref.
	CA1	CA3	DG		
<b>K<sub>2P</sub>3.1</b> <b>(TASK-1)</b>	++	++	++	Hibridização <i>in situ</i> em cérebro rato e camundongo.	Talley <i>et al.</i> , 2001
<b>K<sub>2P</sub>4.1</b> <b>(TRAAK)</b>	++	+++	+		
<b>K<sub>2P</sub>9.1</b> <b>(TASK-3)</b>	++	++	+++		
<b>K<sub>2P</sub>10.1</b> <b>(TREK-2)</b>	-	++	+		
<b>K<sub>ir</sub>2.1</b> <b>(IRK1)</b>	+	+	+++	Hibridização <i>in situ</i> ou imunohistoquímica em cérebro de camundongo ou rato.	Horio <i>et al.</i> , 1996; Karschin <i>et al.</i> , 1996; Miyashita e Kubo, 1997
<b>K<sub>ir</sub>2.2</b> <b>(IRK2)</b>	++	+	++	Hibridização <i>in situ</i> em cérebro de camundongo ou rato.	Horio <i>et al.</i> , 1996; Karschin <i>et al.</i> , 1996
<b>K<sub>ir</sub>2.3</b> <b>(IRK3)</b>	++	+	+++		
<b>K<sub>ir</sub>3.1</b> <b>(GIRK1)</b>	+++	++	+++	Hibridização <i>in situ</i> ou imunohistoquímica em cérebro de rato.	Karschin <i>et al.</i> , 1996; Miyashita e Kubo, 1997
<b>K<sub>ir</sub>3.2</b> <b>(GIRK2)</b>	+++	+++	+++	Hibridização <i>in situ</i> ou imunohistoquímica em cérebro de rato.	Karschin <i>et al.</i> , 1996; Murer <i>et al.</i> , 1997
<b>K<sub>ir</sub>3.3</b> <b>(GIRK3)</b>	+++	+++	+++	Hibridização <i>in situ</i> em cérebro de rato.	Karschin <i>et al.</i> , 1996

Tabela 1.1. Continuação.

Canais	Formação			Técnica empregada	Ref.
	hipocampal	CA1	CA3		
<b>K<sub>v</sub>3.4 (GIRK4)</b>	+	++	+	Western blot, imunohistoquímica ou hibridização <i>in situ</i> em cérebro de rato ou camundongo.	Karschin <i>et al.</i> , 1996; Murer <i>et al.</i> , 1997; Wickman <i>et al.</i> , 2000; Iizuka <i>et al.</i> , 1997
<b>K<sub>v</sub>6.2</b>	++	++	++	Hibridização <i>in situ</i> , imunohistoquímica ou imunofluorescência em cérebro de rato ou camundongo.	Zhou <i>et al.</i> , 2002; Karschin <i>et al.</i> , 1997; Betourne <i>et al.</i> , 2009

Os símbolos indicam a intensidade do sinal: - (não detectado); + (fraco); ++ (moderado); +++ (forte). CA1, CA3 e GD (giro denteado) são regiões da formação hipocampal. Ref. significa referências e RT-PCR, reação em cadeia de polimerase em tempo real.

Devido à sua diversidade, sua pronunciada presença na formação hipocampal e sua função de controle da excitabilidade neuronal, teriam os canais para K<sup>+</sup> um papel relevante em processos cognitivos? Provavelmente a resposta é sim, pois algumas condições clínicas sugerem que os canais para K<sup>+</sup> contribuem fortemente para os processos de aprendizado e memória. Pacientes com encefalite límbica, que possuíam concentração plasmática elevada (com reflexo no líquido cefalorraquidiano) de anticorpos contra canais para potássio voltagem-dependente (anti-K<sub>v</sub>), apresentavam severo prejuízo da memória. Essa função neuropsicológica apresentou uma melhora após a redução espontânea ou provocada (tratamento imunossupressor ou substituição de plasma) dos níveis plasmáticos de anti-K<sub>v</sub> (Buckley *et al.*, 2001; Vincent *et al.*, 2004; Harrower *et al.*, 2006; Kartsounis e de Silva, 2011). Indivíduos infectados com o vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 (HIV-1), com demência associada (HAD), apresentam déficits cognitivos que podem ser resultados da disfunção de canais para K<sup>+</sup> (Keblesh *et al.*, 2008; Keblesh *et al.*, 2009). Um perfil da expressão gênica no córtex de pessoas com HAD revelou uma superexpressão de genes que codificam

para canais para  $K^+$ , cuja atividade produz o prolongamento da hiperpolarização no potencial de ação (Gelman *et al.*, 2004).

Essa participação dos canais para  $K^+$  na memória, em condição clínica provocada pelo HIV-1, é reforçada por resultados com animais de laboratório. A injeção de macrófagos infectados com HIV-1 no cérebro de camundongos imunodeficientes, um modelo de encefalite provocado pelo HIV-1 (HIVE), prejudicou tanto a potenciação de longo prazo na formação hipocampal, quanto o aprendizado espacial (Zink *et al.*, 2002; Anderson *et al.*, 2003). Interessantemente, estes dois danos foram prevenidos quando os camundongos HIVE receberam administração sistêmica de 4-AP, um bloqueador de canais para  $K^+$  supracitado (Keblesh *et al.*, 2009).

Vários trabalhos experimentais também vêm mostrando a participação de canais para potássio nos processos de aprendizagem e memória. A Tabela 1.2 apresenta um resumo de pesquisas que produziram algum tipo de manipulação nos canais para  $K^+$  e avaliaram o seu efeito sobre o desempenho de roedores por meio de testes de aprendizagem e memória. Nesses trabalhos os testes de esquiva passiva (Izquierdo e Medina, 1997; Vianna *et al.*, 2000), de reconhecimento de objetos (Vnek e Rothblat, 1996; Clark *et al.*, 2000) e do labirinto aquático de Morris (Morris *et al.*, 1982; Morris, 1984; Dash *et al.*, 2002) envolvem um aprendizado dependente da formação hipocampal e do estabelecimento de memória de curto e longo prazos. Já o teste do labirinto em Y avalia melhor a memória espacial operacional e de curto prazo (Hughes, 2004), que também abrange a formação hipocampal e o córtex pré-frontal (Lalonde, 2002). A esquiva inibitória de cinco tentativas também avalia memória operacional/curto prazo (Jacobsen *et al.*, 2009). O condicionamento aversivo ao contexto é dependente da formação hipocampal (Matus-Amat *et al.*, 2004) e do complexo amigdalóide (Phillips e LeDoux, 1992), enquanto o condicionamento aversivo ao som envolve preferencialmente o complexo amigdalóide (Phillips e LeDoux, 1992). O condicionamento som-piscar, outro aprendizado associativo, está ligado à atividade da formação hipocampal (Weiss *et al.*, 1999).

Além desses trabalhos que utilizaram técnicas que interferem diretamente na atividade ou expressão de canais para  $K^+$ , outros constataram indiretamente a participação dessas proteínas em situações de aprendizado e memória. Kourrich *et al.* (2005), trabalhando com

ratos em tarefas de discriminação de odores, mostraram que os níveis alterados da expressão do mRNA para canais  $K_v1.1$  na formação hipocampal se correlacionam positivamente com o aprendizado associativo. Zhong *et al.* (2005) sugerem que o déficit de memória provocado pela escopolamina em ratos, constatado com o uso do labirinto aquático de Morris, pode ser resultado da exacerbação das correntes de potássio em neurônios piramidais hipocampais, uma consequência do aumento da expressão de canais  $K_v2.1$ .

Com base nas informações do parágrafo anterior e nos dados da Tabela 1.2, qual papel podemos propor para os canais para  $K^+$  nos processos de aprendizado e memória? A complexidade desses processos e a diversidade desses canais no cérebro dificultam essa tarefa. Porém, sugerimos que, enquanto os canais  $K_v1.1$  contribuiriam positivamente para a formação de memória espacial e não espacial de longo prazo, os  $K_v2.1$ ,  $K_{Ca2.2}$  e  $K_{2P10.1}$  teriam efeito oposto, pelo menos na memória espacial. A respeito da memória não espacial de longo prazo, os canais  $K_{ir}$  teriam papel negativo geral. Entretanto, os canais  $K_{ir3.4}$  e  $K_{ir6.2}$  teriam uma pequena contribuição positiva na memória espacial de longo prazo. A atividade dos canais  $K_{Ca2.3}$  seria importante para a formação de memória não espacial operacional/curto prazo. Por fim, os canais  $K_v1.1$ ,  $K_{Ca1.1}$  e  $K_{ir6.2}$ , seriam relevantes (positivamente) no aprendizado associativo, enquanto os  $K_{Ca2.2}$  atuariam negativamente nesse processo. Porém, os canais  $K_{Ca2}$  não participariam do processo de aprendizado associativo dependente preferencialmente do complexo amigdalóide.

## **TOXINAS, CANAIS PARA $K^+$ E MEMÓRIA**

Além de existir uma grande diversidade de famílias e subfamílias de canais para  $K^+$ , há também vários subtipos dentro de cada subfamília (Goldstein *et al.*, 2005; Gutman *et al.*, 2005; Kubo *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2005). Só na formação hipocampal, existem pelo menos 23 subtipos de canais  $K_v$  e 4 subtipos de  $K_{Ca}$  (Tabela 1.1). Os dois bloqueadores clássicos TEA e 4-AP, já comentados anteriormente, apesar de atuarem nessas subfamílias, não são específicos para nenhum dos subtipos (Gutman *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2005). Isso pode ser um obstáculo à investigação do papel desses canais nos processos de aprendizado e memória. Uma alternativa é a utilização de toxinas obtidas de venenos ou peçonhas como ferramentas farmacológicas. Elas possuem grande potência e alta seletividade e, por isso,

podem ser mais úteis em experimentos do que os fármacos padrão (Harvey *et al.*, 1998).

A apamina, um peptídeo da peçonha de abelhas que bloqueia canais  $K_{Ca}$  (Grunnet *et al.*, 2001), vem sendo bastante utilizada para compreender a participação desses canais no processo de formação da memória. Essa toxina não só previne a amnésia provocada por drogas que abrem canais para  $K^+$  (Ghelardini *et al.*, 1998) e diminui o comprometimento da memória causado por lesões na formação hipocampal em camundongos (Ikonen e Riekkinen, 1999), como também melhora a memória de referência em ratos (Mpari *et al.*, 2008).

Outra fonte de toxinas que agem especificamente em canais para potássio é a peçonha de escorpiões. Enquanto o TEA e a 4-AP atuam em concentrações de milimolares, as toxinas de escorpião possuem afinidade da ordem de pico e nanomolar para a ligação e bloqueio de canais  $K_v$  (Lipkind e Fozzard, 1997). Existem pelo menos 120 peptídeos de escorpião descritos que agem sobre esses canais (Rodriguez de la Vega e Possani, 2004) e eles são agrupados em quatro famílias:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -, e  $\kappa$ -KTx's (Tytgat *et al.*, 1999; Srinivasan *et al.*, 2002). Portanto, se por um lado há uma grande diversidade de canais para  $K^+$ , por outro, existem, nas peçonhas dos escorpiões, uma grande variedade de ferramentas moleculares para investigá-los. Os peptídeos da família  $\alpha$ -KTx, que possui 20 subfamílias (Rodriguez de la Vega e Possani, 2004; Abdel-Mottaleb *et al.*, 2006), têm permitido a compreensão da estrutura dos canais para potássio e seus papéis fisiológico e fisiopatológico (Giangiacomo *et al.*, 2004). Wanke e Restano-Cassulini (2007) relatam o emprego de peptídeos da família  $\gamma$ -KTx em estudos sobre a função dos canais para potássio relacionados ao gene *ether-à-go-go* (ERG) pertencentes à família  $K_v11$ .

As toxinas de escorpião também podem ser empregadas na elucidação da participação dos canais para  $K^+$  nos processos de aprendizado e memória. Ghelardini *et al.* (1998) observaram que a amnésia provocada por drogas que abrem canais para  $K^+$  em camundongos submetidos ao teste de esQUIVA passiva foi suprimida pela charybdotoxina (Tab. 1.2). Essa toxina foi purificada da peçonha do escorpião *Leiurus quinquestriatus* (Smith *et al.*, 1986) e bloqueia canais  $K_v1.2$  e  $K_v1.3$  (Grissmer *et al.*, 1994), além dos  $K_{Ca2}$  (Hermann e Erxleben, 1987). Kourrich *et al.* (2001) utilizaram a kaliotoxina, uma  $\alpha$ -KTx extraída da peçonha do escorpião *Androctonus mauretanicus mauretanicus* que atua como inibidor dos canais para potássio  $K_v1.1$  e  $K_v1.3$ , e mostraram que esses canais parecem facilitar o aprendizado

associativo olfatório em ratos. As conclusões desse trabalho corroboram nossa proposta do papel de canais para  $K^+$  apresentada anteriormente.

## **HIPÓTESE**

Em função das evidências aqui apresentadas, em especial a extensa presença dos canais  $K_v$  na formação hipocampal e o limitado conhecimento de sua contribuição para a memória e aprendizado, este trabalho testou a seguinte hipótese: os canais  $K_v1$  contribuem positivamente para a formação de memória espacial, enquanto os  $K_v2$  tem efeito oposto no mesmo fenômeno. Nesta investigação, foram utilizadas a 4-AP e toxinas de aracnídeos como ferramentas farmacológicas em modelos comportamentais e moleculares/celulares de memória espacial.

## **JUSTIFICATIVA**

Os canais para  $K^+$  estão envolvidos em eventos básicos da fisiologia dos neurônios como excitabilidade, repolarização e liberação de neurotransmissores. Porém sua influência, especialmente dos canais  $K_v$ , em processos cognitivos ainda permanece uma incógnita. Este trabalho contribui para uma melhor compreensão da formação da memória espacial e a participação dos canais  $K_v$  da formação hipocampal nesse processo.

Além disso, várias evidências sugerem o envolvimento dos canais  $K_v$  em diferentes neuropatologias que apresentam déficit de aprendizagem e memória como esclerose múltipla, Doenças de Parkinson e Alzheimer, esquizofrenia, demência associada ao HIV e epilepsia (para uma revisão ver Gati *et al.*, 2012). Portanto, a caracterização do efeito de toxinas que atuam em canais  $K_v$  nos mecanismos da memória podem levar ao desenvolvimento de novos medicamentos que resultariam em melhores tratamentos de doenças e disfunções do sistema nervoso.

## **OBJETIVOS**

1. Obter peptídeos bloqueadores de canais para potássio  $K_v1$  e  $K_v2$ .
2. Testar a influência da 4-AP e das toxinas obtidas em modelo de mecanismo molecular/celular de memória por meio de testes eletrofisiológicos em fatias da formação hipocampal de cérebro de ratos.
3. Testar a influência da administração de 4-AP e das toxinas obtidas na formação hipocampal sobre aprendizagem e memória espacial por meio de testes comportamentais em ratos.

**Tabela 1.2.** Manipulações de canais para K<sup>+</sup> e seus efeitos sobre testes comportamentais de aprendizado e memória. Modificado de Gati *et al.* (2012).

Canal	Técnica	Efeito	Teste	Resultado	Referência
K <sub>v</sub> , K <sub>Ca</sub> , e K <sub>ir</sub>	Injeção i.c.v. de minoxidil, pinacidil, TEA, glibenclamina, gliquidona, cromakalim, apamina e charybdotoxina em camundongo	Charybdotoxina e TEA bloqueiam canais K <sub>v</sub> e K <sub>Ca</sub> .	Esquiva inibitória	Minoxidil, pinacidil e cromakalim: (-)	Ghelardini <i>et al.</i> , 1998
		Apamina bloqueia K <sub>Ca2.2</sub> e K <sub>Ca2.3</sub> . Gliquidona e glibenclamina bloqueiam canais K <sub>ir</sub> . Minoxidil, pinacidil e cromakalim abrem canais K <sub>ir</sub> .		TEA, glibenclamina, gliquidona, apamina e charybdotoxina: (+) – tratamento preveniu efeito amnésico de minoxidil e pinacidil.	
K <sub>v1.1</sub>	Injeção i.c.v. de oligodeoxiribonucleotídeo antissenso para mRNA de K <sub>v1.1</sub> em camundongos e ratos.	Inibição da expressão do canal.	Esquiva inibitória (camundongo)	(-)	Meiri <i>et al.</i> , 1997
			Labirinto aquático de Morris (rato)	(-)	

**Tabela 1.2.** Continuação.

<b>Canal</b>	<b>Técnica</b>	<b>Efeito</b>	<b>Teste</b>	<b>Resultado</b>	<b>Referência</b>
<b>K<sub>Ca</sub>2 (SK)</b>	Infusão sistêmica de 1-ethyl-2-benzimidazolinona (EBIO) s.c., Cyclohexyl-[2-(3,5-dimethyl-pyrazol-1-yl)-6-methyl-pyrimidin-4-yl]-amine (CyPPA) i.p., ou apamina i.p. em camundongos	EBIO ativa canais K <sub>Ca</sub> 2 (SK).  CyPPA ativa canais K <sub>Ca</sub> 2.2(SK2) e K <sub>Ca</sub> 2.3 (SK3) mais que SK1 (K <sub>Ca</sub> 2.1).	Reconhecimento de objetos.	EBIO: (-) CyPPA: (-) Apamina: não testada	Vick <i>et al.</i> , 2010
			Condicionamento aversivo ao contexto	EBIO: (0) Apamina: (+) CyPPA: não testada	
	Condicionamento aversivo ao som	EBIO: (0) Apamin: (0) CyPPA: não testada			
<b>K<sub>Ca</sub>1.1 (BK)</b>	Injeção intra-hipocampal (CA1) de paxillina em ratos.	Paxillina bloqueia o canal.	Condicionamento som- piscar	(-)	Matthews e Disterhoft, 2009
<b>K<sub>Ca</sub>2.2 (SK2)</b>	Camundongos transgênicos.	Superexpressão de mRNA e proteínas do canal K <sub>Ca</sub> 2.2 (SK2).	Labirinto aquático de Morris	(-)	Hammond <i>et al.</i> , 2006
			Condicionamento aversivo ao contexto	(-)	

Tabela 1.2. Continuação.

Canal	Técnica	Efeito	Teste	Resultado	Referência
<b>K<sub>Ca</sub>2.2 (SK2)</b>	Camundongos transgênicos.	Superexpressão de mRNA e proteínas do canal K <sub>Ca</sub> 2.2 (SK2).	Condicionamento aversivo ao contexto	(-)	Stackman <i>et al.</i> , 2008
<b>K<sub>Ca</sub>2.3 (SK3)</b>	Camundongos com deficiência condicional de canais K <sub>Ca</sub> 2.3 (SK3) induzida por doxiciclina.	Inibição da expressão do canal.	Esquiva inibitória	(0)	Jacobsen <i>et al.</i> , 2009
			Labirinto aquático de Morris	(0)	
			Reconhecimento de objetos	(0)	
			Labirinto em Y	(-)	
			Esquiva inibitória de cinco tentativas	(-)	
<b>K<sub>2P</sub>10.1 (TREK-2)</b>	Infusão de siRNA no córtex entorrinal de rato.	Inibição da expressão de canais K <sub>2P</sub> 10.1 (TREK-2) no córtex entorrinal.	Labirinto aquático de Morris	(+) – o tratamento com siRNA aboliu a inibição do aprendizado induzido por baclofen.	Deng <i>et al.</i> , 2009
<b>K<sub>ir</sub>3.4 (GIRK4)</b>	Camundongos <i>knock-out</i> para K <sub>ir</sub> 3.4 (GIRK4).	Inibição da expressão do canal.	Esquiva inibitória	(0)	Wickman <i>et al.</i> , 2000
			Labirinto aquático de Morris	(0/-)	

**Tabela 1.2.** Continuação.

Canal	Técnica	Efeito	Teste	Resultado	Referência
K <sub>ir</sub> 6.2	Injeção intra-hipocampal (CA3) de diazoxida, tolbutamida ou ambos em camundongos.	Diazoxida abre o canal.	Condicionamento aversivo ao contexto	Diazoxida: (-) Tolbutamida: (0) Ambos: (0)	Betourne <i>et al.</i> , 2009
			Tolbutamide bloqueia o canal.	Condicionamento aversivo ao som	
	Camundongos <i>knock-out</i> para K <sub>ir</sub> 6.2	Inibição da expressão do canal.	Condicionamento aversivo ao contexto	(-)	
			Condicionamento aversivo ao som	(-)	
			Labirinto aquático de Morris.	(0/-)	

i.c.v. - intracerebroventricular; s.c. - subcutâneo; i.p. – intraperitoneal; (-) prejudicou o desempenho; (+) melhorou; (0) neutro; (0/-) pequeno prejuízo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-MOTTALEB, Y., CORONAS, F. V., DE ROODT, A. R., POSSANI, L. D. & TYTGAT, J. 2006. A novel toxin from the venom of the scorpion *Tityus trivittatus*, is the first member of a new alpha-KTX subfamily. *FEBS Lett*, 580, 592-6.
- AGGLETON, J. P. & PEARCE, J. M. 2001. Neural systems underlying episodic memory: insights from animal research. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 356, 1467-82.
- ANDERSON, E. R., BOYLE, J., ZINK, W. E., PERSIDSKY, Y., GENDELMAN, H. E. & XIONG, H. 2003. Hippocampal synaptic dysfunction in a murine model of human immunodeficiency virus type 1 encephalitis. *Neuroscience*, 118, 359-69.
- BADDELEY, A. 2001. The concept of episodic memory. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 356, 1345-50.
- BADDELEY, A. 2003. Working memory: looking back and looking forward. *Nat Rev Neurosci*, 4, 829-39.
- BADDELEY, A. D. & HITCH, G. J. 1974. Working memory. *In*: BOWER, G. A. (ed.) *Recent Advances in Learning and Motivation*. New York: Academic Press.
- BETOURNE, A., BERTHOLET, A. M., LABROUE, E., HALLEY, H., SUN, H. S., LORSIGNOL, A., FENG, Z. P., FRENCH, R. J., PENICAUD, L., LASSALLE, J. M. & FRANCES, B. 2009. Involvement of hippocampal CA3 K(ATP) channels in contextual memory. *Neuropharmacology*, 56, 615-25.
- BEVERIDGE, W. I. B. 1981. Métodos científicos. *Sementes da Descoberta Científica*. 1 ed. São Paulo: EDUSP.
- BUCKLEY, C., OGER, J., CLOVER, L., TUZUN, E., CARPENTER, K., JACKSON, M. & VINCENT, A. 2001. Potassium channel antibodies in two patients with reversible limbic encephalitis. *Ann Neurol*, 50, 73-8.
- CARLSON, N. R. 2002. A aprendizagem e a memória: mecanismos básicos. *Fisiologia do Comportamento*. 7 ed. Barueri: Manole.
- CLARK, R. E., ZOLA, S. M. & SQUIRE, L. R. 2000. Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. *J Neurosci*, 20, 8853-60.

- COETZEE, W. A., AMARILLO, Y., CHIU, J., CHOW, A., LAU, D., MCCORMACK, T., MORENO, H., NADAL, M. S., OZAITA, A., POUNTNEY, D., SAGANICH, M., VEGA-SAENZ DE MIERA, E. & RUDY, B. 1999. Molecular diversity of K<sup>+</sup> channels. *Ann N Y Acad Sci*, 868, 233-85.
- COHEN, N. J. & SQUIRE, L. R. 1980. Preserved learning and retention of pattern-analyzing skill in amnesia: dissociation of knowing how and knowing that. *Science*, 210, 207-10.
- DASH, P. K., MACH, S. A., BLUM, S. & MOORE, A. N. 2002. Intrahippocampal wortmannin infusion enhances long-term spatial and contextual memories. *Learn Mem*, 9, 167-77.
- DENG, P. Y., XIAO, Z., YANG, C., ROJANATHAMMANEE, L., GRISANTI, L., WATT, J., GEIGER, J. D., LIU, R., PORTER, J. E. & LEI, S. 2009. GABA(B) receptor activation inhibits neuronal excitability and spatial learning in the entorhinal cortex by activating TREK-2 K<sup>+</sup> channels. *Neuron*, 63, 230-43.
- GATI, C. D., MORTARI, M. R. & SCHWARTZ, E. F. 2012. Towards therapeutic applications of arthropod venom k(+)-channel blockers in CNS neurologic diseases involving memory acquisition and storage. *J Toxicol*, 2012, 1-21.
- GELMAN, B. B., SOUKUP, V. M., SCHUENKE, K. W., KEHERLY, M. J., HOLZER, C., 3RD, RICHEY, F. J. & LAHART, C. J. 2004. Acquired neuronal channelopathies in HIV-associated dementia. *J Neuroimmunol*, 157, 111-9.
- GHELARDINI, C., GALEOTTI, N. & BARTOLINI, A. 1998. Influence of potassium channel modulators on cognitive processes in mice. *Br J Pharmacol*, 123, 1079-84.
- GIANGIACOMO, K. M., CERALDE, Y. & MULLMANN, T. J. 2004. Molecular basis of alpha-KTx specificity. *Toxicon*, 43, 877-86.
- GOLDSTEIN, S. A., BAYLISS, D. A., KIM, D., LESAGE, F., PLANT, L. D. & RAJAN, S. 2005. International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and molecular relationships of two-P potassium channels. *Pharmacol Rev*, 57, 527-40.
- GRISMER, S., NGUYEN, A. N., AIYAR, J., HANSON, D. C., MATHER, R. J., GUTMAN, G. A., KARMILOWICZ, M. J., AUPERIN, D. D. & CHANDY, K. G. 1994. Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K<sup>+</sup> channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Mol Pharmacol*, 45, 1227-34.

- GRUNNET, M., JENSEN, B. S., OLESEN, S. P. & KLAERKE, D. A. 2001. Apamin interacts with all subtypes of cloned small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *Pflugers Arch*, 441, 544-50.
- GUTMAN, G. A., CHANDY, K. G., GRISSMER, S., LAZDUNSKI, M., MCKINNON, D., PARDO, L. A., ROBERTSON, G. A., RUDY, B., SANGUINETTI, M. C., STUHMER, W. & WANG, X. 2005. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev*, 57, 473-508.
- HAMMOND, R. S., BOND, C. T., STRASSMAIER, T., NGO-ANH, T. J., ADELMAN, J. P., MAYLIE, J. & STACKMAN, R. W. 2006. Small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel type 2 (SK2) modulates hippocampal learning, memory, and synaptic plasticity. *J Neurosci*, 26, 1844-53.
- HARROWER, T., FOLTYNIE, T., KARTSOUNIS, L., DE SILVA, R. N. & HODGES, J. R. 2006. A case of voltage-gated potassium channel antibody-related limbic encephalitis. *Nat Clin Pract Neurol*, 2, 339-43.
- HARVEY, A. L., BRADLEY, K. N., COCHRAN, S. A., ROWAN, E. G., PRATT, J. A., QUILLFELDT, J. A. & JERUSALINSKY, D. A. 1998. What can toxins tell us for drug discovery? *Toxicon*, 36, 1635-40.
- HEBB, D. O. 1949. *Organization of Behavior*. New York: Wiley.
- HERMANN, A. & ERXLEBEN, C. 1987. Charybdotoxin selectively blocks small Ca-activated K channels in *Aplysia* neurons. *J Gen Physiol*, 90, 27-47.
- HERVIEU, G. J., CLUDERAY, J. E., GRAY, C. W., GREEN, P. J., RANSON, J. L., RANDALL, A. D. & MEADOWS, H. J. 2001. Distribution and expression of TREK-1, a two-pore-domain potassium channel, in the adult rat CNS. *Neuroscience*, 103, 899-919.
- HORIO, Y., MORISHIGE, K., TAKAHASHI, N. & KURACHI, Y. 1996. Differential distribution of classical inwardly rectifying potassium channel mRNAs in the brain: comparison of IRK2 with IRK1 and IRK3. *FEBS Lett*, 379, 239-43.
- HUGHES, R. N. 2004. The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. *Neurosci Biobehav Rev*, 28, 497-505.

- IIZUKA, M., TSUNENARI, I., MOMOTA, Y., AKIBA, I. & KONO, T. 1997. Localization of a G-protein-coupled inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel, CIR, in the rat brain. *Neuroscience*, 77, 1-13.
- IKONEN, S. & RIEKKINEN, P., JR. 1999. Effects of apamin on memory processing of hippocampal-lesioned mice. *Eur J Pharmacol*, 382, 151-6.
- IZQUIERDO, I. & MEDINA, J. H. 1997. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem*, 68, 285-316.
- JACOBSEN, J. P., REDROBE, J. P., HANSEN, H. H., PETERSEN, S., BOND, C. T., ADELMAN, J. P., MIKKELSEN, J. D. & MIRZA, N. R. 2009. Selective cognitive deficits and reduced hippocampal brain-derived neurotrophic factor mRNA expression in small-conductance calcium-activated K<sup>+</sup> channel deficient mice. *Neuroscience*, 163, 73-81.
- JUDGE, S. I., SMITH, P. J., STEWART, P. E. & BEVER, C. T., JR. 2007. Potassium channel blockers and openers as CNS neurologic therapeutic agents. *Recent Pat CNS Drug Discov*, 2, 200-28.
- KANDEL, E. R., KUPFERMANN, I. & IVERSEN, S. 2000. Learning and Memory. In: KANDEL, E. R., SCHWARTZ, J. H. & JESSELL, T. M. (eds.) *Principles of Neural Science*. 4 ed. New York: McGraw-Hill.
- KARSCHIN, C., DISSMANN, E., STUHMER, W. & KARSCHIN, A. 1996. IRK(1-3) and GIRK(1-4) inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel mRNAs are differentially expressed in the adult rat brain. *J Neurosci*, 16, 3559-70.
- KARSCHIN, C., ECKE, C., ASHCROFT, F. M. & KARSCHIN, A. 1997. Overlapping distribution of K(ATP) channel-forming Kir6.2 subunit and the sulfonylurea receptor SUR1 in rodent brain. *FEBS Lett*, 401, 59-64.
- KARTSOUNIS, L. D. & DE SILVA, R. 2011. Unusual amnesia in a patient with VGKC-Ab limbic encephalitis: a case study. *Cortex*, 47, 451-9.
- KEBLESH, J., HU, D. & XIONG, H. 2009a. Voltage-gated potassium channels in human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1)-associated neurocognitive disorders. *J Neuroimmune Pharmacol*, 4, 60-70.

- KEBLESH, J. P., DOU, H., GENDELMAN, H. E. & XIONG, H. 2009b. 4-Aminopyridine improves spatial memory in a murine model of HIV-1 encephalitis. *J Neuroimmune Pharmacol*, 4, 317-27.
- KEBLESH, J. P., REINER, B. C., LIU, J. & XIONG, H. 2008. Pathogenesis of Human Immunodeficiency Virus Type-1 (HIV-1)-Associated Dementia: Role of Voltage-Gated Potassium Channels. *Retrovirology*, 2, 1-10.
- KESSELS, R. P., DE HAAN, E. H., KAPPELLE, L. J. & POSTMA, A. 2001. Varieties of human spatial memory: a meta-analysis on the effects of hippocampal lesions. *Brain Res. Brain Res reviews*, 35, 295-303.
- KIM, J. & HOFFMAN, D. A. 2008. Potassium channels: newly found players in synaptic plasticity. *Neuroscientist*, 14, 276-86.
- KNAUS, H. G., SCHWARZER, C., KOCH, R. O., EBERHART, A., KACZOROWSKI, G. J., GLOSSMANN, H., WUNDER, F., PONGS, O., GARCIA, M. L. & SPERK, G. 1996. Distribution of high-conductance Ca(2+)-activated K<sup>+</sup> channels in rat brain: targeting to axons and nerve terminals. *J Neurosci*, 16, 955-63.
- KOURRICH, S., MANRIQUE, C., SALIN, P. & MOURRE, C. 2005. Transient hippocampal down-regulation of Kv1.1 subunit mRNA during associative learning in rats. *Learn Mem*, 12, 511-9.
- KOURRICH, S., MOURRE, C. & SOUMIREU-MOURAT, B. 2001. Kaliotoxin, a Kv1.1 and Kv1.3 channel blocker, improves associative learning in rats. *Behav Brain Res*, 120, 35-46.
- KUBO, Y., ADELMAN, J. P., CLAPHAM, D. E., JAN, L. Y., KARSCHIN, A., KURACHI, Y., LAZDUNSKI, M., NICHOLS, C. G., SEINO, S. & VANDENBERG, C. A. 2005. International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacol Rev*, 57, 509-26.
- LALONDE, R. 2002. The neurobiological basis of spontaneous alternation. *Neurosci Biobehav Rev*, 26, 91-104.
- LIPKIND, G. M. & FOZZARD, H. A. 1997. A model of scorpion toxin binding to voltage-gated K<sup>+</sup> channels. *J Membr Biol*, 158, 187-96.
- LUJAN, R., DE CABO DE LA VEGA, C., DOMINGUEZ DEL TORO, E., BALLESTA, J. J., CRIADO, M. & JUIZ, J. M. 2003. Immunohistochemical localization of the voltage-gated

- potassium channel subunit Kv1.4 in the central nervous system of the adult rat. *J Chem Neuroanat*, 26, 209-24.
- MARTIN, S., LINO DE OLIVEIRA, C., MELLO DE QUEIROZ, F., PARDO, L. A., STUHMER, W. & DEL BEL, E. 2008. Eag1 potassium channel immunohistochemistry in the CNS of adult rat and selected regions of human brain. *Neuroscience*, 155, 833-44.
- MATHIE, A., WOOLTORTON, J. R. & WATKINS, C. S. 1998. Voltage-activated potassium channels in mammalian neurons and their block by novel pharmacological agents. *Gen Pharmacol*, 30, 13-24.
- MATTHEWS, E. A. & DISTERHOFT, J. F. 2009. Blocking the BK channel impedes acquisition of trace eyeblink conditioning. *Learn Mem*, 16, 106-9.
- MATUS-AMAT, P., HIGGINS, E. A., BARRIENTOS, R. M. & RUDY, J. W. 2004. The role of the dorsal hippocampus in the acquisition and retrieval of context memory representations. *J Neurosci*, 24, 2431-9.
- MEIRI, N., GHELARDINI, C., TESCO, G., GALEOTTI, N., DAHL, D., TOMSIC, D., CAVALLARO, S., QUATTRONE, A., CAPACCIOLI, S., BARTOLINI, A. & ALKON, D. L. 1997. Reversible antisense inhibition of Shaker-like Kv1.1 potassium channel expression impairs associative memory in mouse and rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 4430-4.
- MIYASHITA, T. & KUBO, Y. 1997. Localization and developmental changes of the expression of two inward rectifying K(+)-channel proteins in the rat brain. *Brain Res*, 750, 251-63.
- MONAGHAN, M. M., TRIMMER, J. S. & RHODES, K. J. 2001. Experimental localization of Kv1 family voltage-gated K+ channel alpha and beta subunits in rat hippocampal formation. *J Neurosci*, 21, 5973-83.
- MORRIS, R. 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*, 11, 47-60.
- MORRIS, R. G., GARRUD, P., RAWLINS, J. N. & O'KEEFE, J. 1982. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, 297, 681-3.
- MPARI, B., SRENG, L., REGAYA, I. & MOURRE, C. 2008. Small-conductance Ca(2+)-activated K(+) channels: Heterogeneous affinity in rat brain structures and cognitive modulation by specific blockers. *Eur J Pharmacol*, 589, 140-8.

- MURER, G., ADELBRECHT, C., LAURITZEN, I., LESAGE, F., LAZDUNSKI, M., AGID, Y. & RAISMAN-VOZARI, R. 1997. An immunocytochemical study on the distribution of two G-protein-gated inward rectifier potassium channels (GIRK2 and GIRK4) in the adult rat brain. *Neuroscience*, 80, 345-57.
- PARK, K. H., CHUNG, Y. H., SHIN, C., KIM, M. J., LEE, B. K., CHO, S. S. & CHA, C. I. 2001. Immunohistochemical study on the distribution of the voltage-gated potassium channels in the gerbil hippocampus. *Neurosci Lett*, 298, 29-32.
- PAUL, C. M., MAGDA, G. & ABEL, S. 2009. Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behav Brain Res*, 203, 151-64.
- PHILLIPS, R. G. & LEDOUX, J. E. 1992. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci*, 106, 274-85.
- RODRIGUEZ DE LA VEGA, R. C. & POSSANI, L. D. 2004. Current views on scorpion toxins specific for K<sup>+</sup>-channels. *Toxicon*, 43, 865-75.
- SAGANICH, M. J., MACHADO, E. & RUDY, B. 2001. Differential expression of genes encoding subthreshold-operating voltage-gated K<sup>+</sup> channels in brain. *J Neurosci*, 21, 4609-24.
- SAILER, C. A., HU, H., KAUFMANN, W. A., TRIEB, M., SCHWARZER, C., STORM, J. F. & KNAUS, H. G. 2002. Regional differences in distribution and functional expression of small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in rat brain. *J Neurosci*, 22, 9698-707.
- SAILER, C. A., KAUFMANN, W. A., KOGLER, M., CHEN, L., SAUSBIER, U., OTTERSEN, O. P., RUTH, P., SHIPSTON, M. J. & KNAUS, H. G. 2006. Immunolocalization of BK channels in hippocampal pyramidal neurons. *Eur J Neurosci*, 24, 442-54.
- SAUSBIER, U., SAUSBIER, M., SAILER, C. A., ARNTZ, C., KNAUS, H. G., NEUHUBER, W. & RUTH, P. 2006. Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels of the BK-type in the mouse brain. *Histochem Cell Biol*, 125, 725-41.
- SERODIO, P. & RUDY, B. 1998. Differential expression of Kv4 K<sup>+</sup> channel subunits mediating subthreshold transient K<sup>+</sup> (A-type) currents in rat brain. *J Neurophysiol*, 79, 1081-91.
- SHARMA, S., RAKOCZY, S. & BROWN-BORG, H. 2010. Assessment of spatial memory in mice. *Life Sci*, 87, 521-36.
- SHRAGER, Y., LEVY, D. A., HOPKINS, R. O. & SQUIRE, L. R. 2008. Working memory and the organization of brain systems. *J Neurosci*, 28, 4818-22.

- SMITH, C., PHILLIPS, M. & MILLER, C. 1986. Purification of charybdotoxin, a specific inhibitor of the high-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel. *J Biol Chem*, 261, 14607-13.
- SQUIRE, L. R. 2004. Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem*, 82, 171-7.
- SRINIVASAN, K. N., SIVARAJA, V., HUYS, I., SASAKI, T., CHENG, B., KUMAR, T. K., SATO, K., TYTGAT, J., YU, C., SAN, B. C., RANGANATHAN, S., BOWIE, H. J., KINI, R. M. & GOPALAKRISHNAKONE, P. 2002. kappa-Hefutoxin1, a novel toxin from the scorpion *Heterometrus fulvipes* with unique structure and function. Importance of the functional diad in potassium channel selectivity. *J Biol Chem*, 277, 30040-7.
- STACKMAN, R. W., JR., BOND, C. T. & ADELMAN, J. P. 2008. Contextual memory deficits observed in mice overexpressing small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> type 2 (KCa2.2, SK2) channels are caused by an encoding deficit. *Learn Mem*, 15, 208-13.
- STOCKER, M. & PEDARZANI, P. 2000. Differential distribution of three Ca(2+)-activated K(+) channel subunits, SK1, SK2, and SK3, in the adult rat central nervous system. *Mol Cell Neurosci*, 15, 476-93.
- TALLEY, E. M., SOLORZANO, G., LEI, Q., KIM, D. & BAYLISS, D. A. 2001. Cns distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family. *J Neurosci*, 21, 7491-505.
- TOMAZ, C. 1993. Psicobiologia da memória. *Psicologia USP*, 4, 49-59.
- TSAUR, M. L., CHOU, C. C., SHIH, Y. H. & WANG, H. L. 1997. Cloning, expression and CNS distribution of Kv4.3, an A-type K<sup>+</sup> channel alpha subunit. *FEBS Lett*, 400, 215-20.
- TULVING, E. 1987. Multiple memory systems and consciousness. *Hum Neurobiol*, 6, 67-80.
- TYTGAT, J., CHANDY, K. G., GARCIA, M. L., GUTMAN, G. A., MARTIN-EAUCLAIRE, M. F., VAN DER WALT, J. J. & POSSANI, L. D. 1999. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-KTx molecular subfamilies. *Trends Pharmacol Sci*, 20, 444-7.
- VACHER, H., MOHAPATRA, D. P. & TRIMMER, J. S. 2008. Localization and targeting of voltage-dependent ion channels in mammalian central neurons. *Physiol Rev*, 88, 1407-47.

- VARGA, A. W., ANDERSON, A. E., ADAMS, J. P., VOGEL, H. & SWEATT, J. D. 2000. Input-specific immunolocalization of differentially phosphorylated Kv4.2 in the mouse brain. *Learn Mem*, 7, 321-32.
- VIANNA, M. R., IZQUIERDO, L. A., BARROS, D. M., ARDENGHI, P., PEREIRA, P., RODRIGUES, C., MOLETTA, B., MEDINA, J. H. & IZQUIERDO, I. 2000. Differential role of hippocampal cAMP-dependent protein kinase in short- and long-term memory. *Neurochem Res*, 25, 621-6.
- VICK, K. A. T., GUIDI, M. & STACKMAN, R. W., JR. 2010. In vivo pharmacological manipulation of small conductance Ca(2+)-activated K(+) channels influences motor behavior, object memory and fear conditioning. *Neuropharmacology*, 58, 650-9.
- VINCENT, A., BUCKLEY, C., SCHOTT, J. M., BAKER, I., DEWAR, B. K., DETERT, N., CLOVER, L., PARKINSON, A., BIEN, C. G., OMER, S., LANG, B., ROSSOR, M. N. & PALACE, J. 2004. Potassium channel antibody-associated encephalopathy: a potentially immunotherapy-responsive form of limbic encephalitis. *Brain*, 127, 701-12.
- VNEK, N. & ROTHBLAT, L. A. 1996. The hippocampus and long-term object memory in the rat. *J Neurosci*, 16, 2780-7.
- WANG, H., KUNKEL, D. D., SCHWARTZKROIN, P. A. & TEMPEL, B. L. 1994. Localization of Kv1.1 and Kv1.2, two K channel proteins, to synaptic terminals, somata, and dendrites in the mouse brain. *J Neurosci*, 14, 4588-99.
- WANKE, E. & RESTANO-CASSULINI, R. 2007. Toxins interacting with ether-a-go-go-related gene voltage-dependent potassium channels. *Toxicon*, 49, 239-48.
- WEI, A. D., GUTMAN, G. A., ALDRICH, R., CHANDY, K. G., GRISSMER, S. & WULFF, H. 2005. International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacol Rev*, 57, 463-72.
- WEISER, M., VEGA-SAENZ DE MIERA, E., KENTROS, C., MORENO, H., FRANZEN, L., HILLMAN, D., BAKER, H. & RUDY, B. 1994. Differential expression of Shaw-related K+ channels in the rat central nervous system. *J Neurosci*, 14, 949-72.
- WEISS, C., BOUWMEESTER, H., POWER, J. M. & DISTERHOFT, J. F. 1999. Hippocampal lesions prevent trace eyeblink conditioning in the freely moving rat. *Behav Brain Res*, 99, 123-32.

- WICKMAN, K., KARSCHIN, C., KARSCHIN, A., PICCIOTTO, M. R. & CLAPHAM, D. E. 2000. Brain localization and behavioral impact of the G-protein-gated K<sup>+</sup> channel subunit GIRK4. *J Neurosci*, 20, 5608-15.
- ZHONG, C. B., PAN, Y. P., TONG, X. Y., XU, X. H. & WANG, X. L. 2005. Delayed rectifier potassium currents and Kv2.1 mRNA increase in hippocampal neurons of scopolamine-induced memory-deficient rats. *Neurosci Lett*, 373, 99-104.
- ZHOU, M., TANAKA, O., SUZUKI, M., SEKIGUCHI, M., TAKATA, K., KAWAHARA, K. & ABE, H. 2002. Localization of pore-forming subunit of the ATP-sensitive K(+) -channel, Kir6.2, in rat brain neurons and glial cells. *Brain Res Mol Brain Res*, 101, 23-32.
- ZINK, W. E., ANDERSON, E., BOYLE, J., HOCK, L., RODRIGUEZ-SIERRA, J., XIONG, H., GENDELMAN, H. E. & PERSIDSKY, Y. 2002. Impaired spatial cognition and synaptic potentiation in a murine model of human immunodeficiency virus type 1 encephalitis. *J Neurosci*, 22, 2096-105.

# Capítulo 2

## Reversão do déficit de memória provocado pela escopolamina por meio do bloqueio de canais $K_v$ com a 4- aminopiridina (4-AP)

Neste capítulo, inicia-se a investigação para elucidar a influência de canais  $K_v$  nos processos da memória. Primeiramente, foi avaliada a influência da 4-AP no estabelecimento da memória injetando-a diretamente na formação hipocampal de ratos e submetendo esses a um teste de memória espacial no campo aberto que depende dessa estrutura. O prejuízo da memória foi produzido pela injeção intraperitoneal de escopolamina. Em seguida, testamos a influência da 4-AP e da escopolamina (separadamente e em conjunto) sobre a indução de potenciação de longo prazo (LTP, do inglês *long-term potentiation*) em fatias da formação hipocampal de ratos, pois esse fenômeno está envolvido na habituação ao campo aberto. Esta etapa também se faz necessária para a padronização dos procedimentos experimentais a serem utilizados com as toxinas.

## INTRODUÇÃO

Como discutido no capítulo 1, os canais para  $K^+$  parecem participar dos processos de aprendizado e memória. Hoje temos um conhecimento maior sobre a participação dos canais  $K_{Ca}$ , em virtude do emprego da apamina, porém, não se pode dizer o mesmo para os canais  $K_v$ . O objetivo neste momento é utilizar a 4-AP como ferramenta para manipular os canais  $K_v$  em situações em que a memória está envolvida. Uma questão que precisa ser resolvida é confirmar se a ação direta deste fármaco na formação hipocampal possui efeito no estabelecimento e ou evocação da memória. Por exemplo, não foram encontrados registros na literatura da administração hipocampal de 4-AP em animais submetidos a testes comportamentais que avaliem essa função. Outra questão seria qual a concentração desse fármaco que deve ser utilizado quando administrado no Sistema Nervoso Central.

A 4-AP é um bloqueador clássico não específico de canais  $K_v$  (Mathie *et al.*, 1998). Esse fármaco atravessa a barreira hematoencefálica (Damsma *et al.*, 1988), tem fórmula molecular  $C_5H_6N_2$  e sua estrutura química é apresentada na Figura 2.1 (Sinha e Shrivastava, 2013). Ela também é o único agente aprovado pelo *U.S. Food and Drug Administration (Department of Health and Human Services, EUA)* para tratamento sintomático da esclerose múltipla que melhora o distúrbio de marcha (Egeberg *et al.*, 2012). Essa medicação, conhecida como dalfampridina nos Estados Unidos e fampridina em outros países (Egeberg *et al.*, 2012), atua em diferentes subtipos de canais  $K_v$ , exceto  $K_v3.4$ ,  $K_v5.1$  e todos das subfamílias  $K_v6$ - $K_v12$  (Gutman *et al.*, 2005). Como não bloqueia os canais  $K_{Ca}$  (Wei *et al.*, 2005), nem os  $K_{2P}$  (Goldstein *et al.*, 2005) e seu efeito inibidor sobre os  $K_{ir}$  (especificamente os subtipos  $K_{ir}3.4$ ,  $K_{ir}6.1$  e  $K_{ir}7.1$ .) é fraco (Inoue *et al.*, 1991; Kubo *et al.*, 2005; Hibino *et al.*, 2010), a 4-AP é considerada um bloqueador de canais  $K_v$  (Mathie *et al.*, 1998). Uma vez que esses canais estejam abertos, a 4-AP passa pelo poro e se liga à sua cavidade interna, ficando presa em seu interior e bloqueando-o (Russell *et al.*, 1994). A administração desse fármaco em fatias da formação hipocampal de rato e de humanos (removidos como tratamento de epilepsia límbica resistente a medicamentos) aumentou a duração dos potenciais de ação e permitiu maior influxo de  $Ca^{2+}$  nos terminais axonais através dos canais para cálcio voltagem-dependentes. Tal fato resulta em um aumento na liberação de neurotransmissores e na facilitação de

potências pós-sinápticos (Haas *et al.*, 1983; Van Harreveld, 1984; Muller *et al.*, 1989; Heemskerk *et al.*, 1991; Wu *et al.*, 2009). Nesses casos, uma concentração de 20  $\mu\text{M}$  de 4-AP aumenta a excitabilidade neuronal (Palani *et al.*, 2010), enquanto o uso de 100  $\mu\text{M}$  induz descargas epileptiformes (Gonzalez-Sulser *et al.*, 2012).

Trabalhos que fizeram testes *in vivo* sugerem que a 4-AP tem efeito preventivo no déficit de memória, em geral. Esse fármaco (1  $\mu\text{mol/kg}$ , intravenoso (i.v.)) atenuou o prejuízo do condicionamento do reflexo de piscar ao tom causado pela toxicidade do alumínio em coelhos (Yokel *et al.*, 1994). A 4-AP (25 e 50  $\mu\text{g/kg}$ ; intraperitoneal (i.p.)) reverteu o efeito amnésico da escopolamina (1 mg/kg, i.p.) e do choque eletroconvulsivo no teste de esQUIVA inibitória em camundongos (Inan *et al.*, 2000). O mesmo resultado, no mesmo teste do trabalho anterior, foi obtido por Banchelli *et al.* (2000) injetando 4-AP (0,23 ou 0,47  $\mu\text{g}$ ) no ventrículo lateral (i.c.v) de camundongos e produzindo o déficit de memória com minoxidil (i.c.v). Keblesh *et al.* (2009) relataram que a 4-AP (5mg/kg, i.p.) conseguiu reverter o prejuízo de memória no labirinto radial aquático produzido pela administração intracerebral de vírus da imunodeficiência humana (HIV) em camundongos imunodeficientes, modelo de desordem neurocognitiva associada à HIV. Porém, nem sempre a 4-AP conseguiu abolir os déficits da memória. Esse fármaco (0.001 – 0.1 mg/kg, subcutâneo (s.c.)) não reverteu a piora de desempenho de ratos no teste de escolha de acordo com a posição com atraso (*delayed matching to position task*) produzida pela escopolamina (0.1 mg/kg, s.c.; Poorheidari *et al.*, 1998).

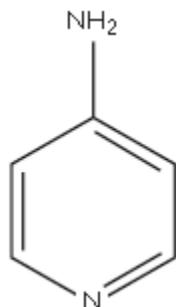
O efeito da 4-AP é contraditório quando administrada em condições em que não ocorreu a indução de déficit de memória. Apenas dois trabalhos citados no parágrafo anterior (Poorheidari *et al.*, 1998; Banchelli *et al.*, 2000) testaram a 4-AP em animais controles (sem amnésia) e nenhum deles relatou efeito sobre o desempenho dos roedores. Esse fármaco (30 – 300 pmol, i.c.v.) também não alterou a resposta de camundongos submetidos ao teste de reconhecimento de objetos, apesar de causar crises tônico-clônicas (Gomes *et al.*, 2013). Porém, Haroutunian *et al.* (1985) constataram que a administração de 0,05 e 0,1 mg/kg (mas não 1 e 2 mg/kg) de 4-AP (i.p) em ratos após a sessão de treino resultou em maior retenção da resposta de esQUIVA inibitória (teste depois de 72 h), quando comparado com os ratos que receberam salina. Esse fármaco (0,5 mg/kg, i.v.) também facilitou a associação do som à resposta da membrana nictitante em coelhos, potencializando o condicionamento clássico

(Wang *et al.*, 2006). Esses resultados não são suficientes para concluir se a 4-AP em condições normais teria efeito positivo ou neutro sobre o aprendizagem e memória.

A dúvida quanto à influência da 4-AP sobre a memória, quando essa não apresenta disfunção, pode estar relacionada com sua ação generalizada sobre o sistema nervoso. Como já foi comentado, o fármaco interfere na excitabilidade e na liberação de neurotransmissores. Foi relatado que a 4-AP potencializa a transmissão de acetilcolina (Damsma *et al.*, 1988; Dolezal e Wecker, 1991; Versteeg *et al.*, 1995; Sperlagh *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2009), de glutamato (Lin *et al.*, 2005; Wang e Chen, 2007; Satoh e Shimeki, 2010), de dopamina e de noradrenalina (Versteeg *et al.*, 1995; Morales-Villagran *et al.*, 1999). Além disso, os trabalhos sobre memória realizados com esse fármaco, em geral, utilizaram administração sistêmica (oral, subcutânea, intraperitoneal ou intravenosa) o que permite uma ação disseminada por todo o sistema nervoso. Apenas dois trabalhos supracitados (Banchelli *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 2013) injetaram a 4-AP no ventrículo lateral, reduzindo os possíveis locais de sua atuação no Sistema Nervoso Central, mas, ainda assim, sua seletividade anatômica é fraca (Engin e Treit, 2008). É interessante destacar o relato recorrente nesses trabalhos, mesmo na administração i.c.v., de crises convulsivas. Portanto, um dos objetivos deste capítulo é constatar a influência da 4-AP na constituição da memória injetando-a diretamente na formação hipocampal de ratos e submetendo esses a um teste de memória espacial dependente dessa estrutura. Nossa expectativa, baseada na literatura, é que o fármaco terá um efeito positivo no desempenho dos animais.

Como a 4-AP tem sido usada para reverter a amnésia, também reproduzimos esse efeito anti-amnésico com a sua administração intrahipocampal. O prejuízo da memória foi produzido pela injeção i.p. de escopolamina. Como o uso da escopolamina em humanos e ratos jovens mimetizam muitas das características (prejuízo da memória e alterações eletroencefalográficas) de pacientes idosos com doença de Alzheimer ou demência senil, a administração de escopolamina tem sido proposta como um modelo de demência (Ebert e Kirch, 1998). Ainda como teste de memória, utilizamos um procedimento no campo aberto que avalia habituação espacial, uma forma de aprendizado menos complexo (Rankin *et al.*, 2009). Finalmente, testamos a influência da 4-AP e da escopolamina (separadamente e em conjunto) sobre a indução de potenciação de longo prazo (LTP, do inglês *long-term potentiation*) em fatias da

formação hipocampal de ratos, pois esse fenômeno está envolvido na habituação ao campo aberto (Vianna *et al.*, 2000).



**Figura 2.1.** Estrutura química da 4-aminopiridina.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **1. Animais**

Para os experimentos comportamentais, utilizaram-se ratos Wistar machos pesando entre 250 e 300 g (aproximadamente 8 semanas de vida). Os animais foram providos pelo biotério do Instituto de Ciências Biológicas (IB) da UnB e permaneceram em suas dependências durante o período dos testes. O biotério possuía iluminação, ventilação e umidade natural. Os roedores foram acomodados em gaiolas coletivas (até quatro ratos em cada) e tiveram livre acesso água e ração específica para roedores (Labina, Brasil).

Para os experimentos eletrofisiológicos, também utilizaram se ratos Wistar machos pesando entre 250 e 320 g (aproximadamente 8 semanas de vida). Porém, os animais foram fornecidos e mantidos pelo *Laboratory Animal Medicine* da *Uniformed Services University of the Health Sciences* (Bethesda, Estados Unidos). A iluminação (ciclo claro-escuro de 12 hs cada fase com o ciclo claro começando as 6 hs da manhã), a temperatura (20-23 °C) e umidade foram controladas. Neste biotério os animais permaneceram em gaiolas (2 ratos em cada) com água e alimentação *ad libitum*.

Todos os procedimentos com animais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do IB-UnB protocolo nº 52449/2011 (anexo 1) e pelo *Institutional Animal Care and Use Committee* da *Uniformed Services University of the Health Sciences* protocolo nº 3206. Além disso, foram seguidas as normas de utilização do uso de animais experimentais regulamentados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e a Lei Arouca (11794/2008). Para os experimentos deste capítulo foram utilizados 67 ratos no total.

### **2. Implante das cânulas**

Com o objetivo de direcionar as injeções de substâncias para a formação hipocampal, duas cânulas-guia foram implantadas no cérebro de cada rato. Cada animal foi profundamente anestesiado por via intraperitoneal com uma combinação de Ketamina (60 mg/Kg) e Xilazina (10 mg/Kg) e subcutaneamente com 0,05 mL de cloridrato de lidocaína 2%. Foi aplicada solução fisiológica (NaCl 0,9 %) nos olhos do animal para proteção contra ressecamento. O

rato foi fixado ao aparelho estereotáxico (Insight – EFF 331) e sofreu uma incisão de 1,5 cm no topo da cabeça com um bisturi. Seguiu a inserção no cérebro de duas cânulas de aço inoxidável (11 mm de altura e 0,70 mm de diâmetro) direcionadas à região dorsal (CA1) da formação hipocampal (uma para cada hemisfério), coordenadas: AP –3,8 mm; ML  $\pm$ 2,7 mm; DV –2,7 mm, referentes ao Bregma e à superfície craniana (Paxinos e Watson, 2007), cujo alvo era a região CA1. Adicionalmente, foram fixados três parafusos também de aço inoxidável na calota craniana. Após o implante, a área cirúrgica foi recoberta com acrílico autopolimerizável e as cânulas tampadas com um mandril (fio de aço inoxidável). Para prevenção de infecções, todo o material usado no implante foi esterilizado e cada animal recebeu, por via s.c., antibiótico Flotril 2,5 % (2,5 mg/kg) da MSD e, topicamente, sulfato de neomicina. O roedor foi devolvido ao biotério somente após seu despertar da anestesia e teve sua recuperação acompanhada diariamente.

### **3. Fármacos, soluções, doses e vias de administração**

#### **3.1. Nos testes comportamentais**

##### **3.1.1. Administração intraperitoneal (i.p.)**

As seguintes substâncias foram administradas por via intraperitoneal:

- Salina (solução estéril de NaCl 0,9 %): 0,2 mL;
- Bromidrato de escopolamina (Sigma – S0929): 0,5 mg/kg (dissolvido em 0,2 mL de salina).

##### **3.1.2. Administração intrahipocampal (i.h.)**

As seguintes substâncias foram administradas bilateralmente na região dorsal (CA1) da formação hipocampal dos ratos:

- Salina: 0,2  $\mu$ L/lado em cada animal;
- 4-AP (Sigma – A78403): 1,0 mM/lado dissolvido em salina (0,2  $\mu$ L/lado) por animal;

As soluções foram administradas com o auxílio de duas seringas Hamilton de 10  $\mu$ L acopladas a uma bomba injetora (Harvard Apparatus – PHD 2000). Essas se conectaram por

meio de tubos de polietileno a agulhas (11,5 mm de altura e 0,30 mm de diâmetro) que foram introduzidas nas cânulas-guia dos ratos no momento do experimento. Foi injetado sempre um volume de 0,2  $\mu$ L bilateralmente a uma velocidade de 0,5  $\mu$ L/min. Em todos os animais, a agulha ainda permaneceu 60 segundos na cânula após o fim da infusão. Os animais ficaram imobilizados durante todo o procedimento de infusão. Cada rato foi, então, conduzido para o teste comportamental.

### **3.2. Nos testes eletrofisiológicos**

#### **3.2.1. Solução de corte**

O cérebro de ratos ficou imerso em solução de corte gelada (preenchia a câmara de corte que ficava rodeada de gelo) durante a realização das fatias pelo vibrátomo. Para essa solução, primeiramente foram preparadas outras duas soluções denominadas A e B.

A solução A era composta por 144 mM N-metil-D-glucamina (NMDG), 1,5 mM KCl, 1,25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 2 mM  $\text{CaCl}_2$  anidro, 2 mM  $\text{MgCl}_2$  anidro e 30 mM  $\text{NaHCO}_3$ . A quantidade dos reagentes foi calculada para 1 L. Eles foram adicionados um a um em 800 mL de água ultrapura (milli-Q). O pH foi ajustado para 7,5 com ácido D-glucônico. O volume foi então aumentado para 1 L com a adição gradativa de água milli-Q, tomando-se o cuidado de medir a osmolaridade durante esse procedimento. Quando o valor de  $330 \pm 5$  mOsm/kg era alcançado parava-se de adicionar água à solução A.

A solução B era composta por 220 mM sacarose, 1 mM KCl, 1,25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 7 mM  $\text{MgCl}_2$  e 30 mM  $\text{NaHCO}_3$ . A quantidade dos reagentes também foi calculada para 1 L. Eles foram adicionados um a um em 800 mL de água ultrapura (milli-Q). O volume foi então aumentado para 1 L com a adição gradativa de água milli-Q, tomando-se o cuidado de medir a osmolaridade durante esse procedimento. Quando o valor de  $330 \pm 5$  mOsm/kg era alcançado, parava-se de adicionar água à solução B.

As soluções A e B eram preparadas semanalmente e guardadas na geladeira. No dia dos ensaios eletrofisiológicos elas eram misturadas na proporção de 1:1.

### **3.2.2. Solução de banho/registo**

A solução de banho/registo continha 125 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1,25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 21 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> e 11 mM D-glicose. Essa solução foi saturada com uma mistura gasosa composta de 95 % de O<sub>2</sub> e 5 % de CO<sub>2</sub> para alcançar o pH 7,4. Ela foi utilizada para banhar as fatias de cérebros de ratos durante a permanência desse na câmara de registo, além de preencher a pipeta de vidro que servia como eletrodo de registo. Essa solução é um líquido cefalorraquidiano artificial (LCRA) e também foi usada para incubação à temperatura ambiente das fatias de cérebro de ratos por pelo menos uma hora antes dos registros.

A 4-AP e a escopolamina foram dissolvidas em LCRA para banhar as fatias de cérebro de ratos durante os registros dos potenciais de campo nos grupos que receberam tratamento farmacológico. Foram produzidas as seguintes soluções:

- solução escop: 2,4 mM escopolamina;
- solução 4-AP: 10 µM 4-AP
- solução 4-AP+escop: 2,4 mM escopolamina e 10 µM 4-AP

## **4. Testes comportamentais**

### **4.1. Habituação dos animais à imobilização (manuseio)**

Administração de substâncias no cérebro dos ratos implantados requer a imobilização do animal, que é uma situação de estresse. Como o objetivo de diminuí-lo e também familiarizar o rato com o experimentador, cada roedor foi imobilizado por 30 s com o auxílio de uma flanela no quarto dia após o implante das cânulas. Esse procedimento foi repetido por mais dois dias aumentando o tempo de restrição de movimentos para 60 s e 90 s, respectivamente.

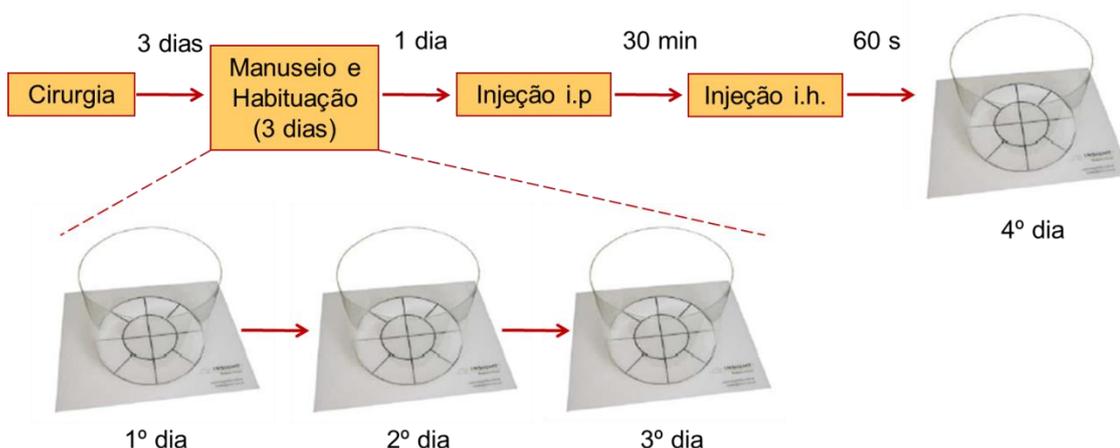
### **4.2. Campo aberto (CA)**

O campo aberto foi uma arena de acrílico branco com 60 cm de diâmetro (dividida em 12 quadrantes) delimitada por uma redoma de acrílico transparente com 45 cm de altura (Figura). O CA foi montado no interior de sala que possui marcações visuais distintas em suas quatro paredes. O comportamento do animal é registrado por uma filmadora digital que transfere as imagens para um computador na sala vizinha para visualização e armazenamento da atividade

motora. O pesquisador não ficou na sala onde se encontra o CA durante a realização da sessão. Entre uma sessão e outra o CA tinha o seu assoalho limpo com álcool 70 % e sua redoma com água e papel. A sessão consistiu em colocar o rato no centro e observar sua atividade locomotora espontânea, contando o número de vezes que o animal cruza as linhas que delimitam os quadrantes ao longo de 30 minutos.



Figura 2.2. Campo aberto.



**Figura 2.3.** Esquema do procedimento adotado no campo aberto. Os ratos foram submetidos à cirurgia para implantação de cânulas-guia bilateralmente na região dorsal (CA1) da formação hipocampal. Após 3 dias, os animais foram submetidos a uma sessão diária, na qual o roedor era colocado no centro da arena e podia se movimentar livremente por 30 min. Antes dessa sessão, cada rato foi imobilizado por 30 a 90 s com auxílio de uma flanela (manuseio). Esses procedimentos ocorrem por três dias (habituação). No quarto dia ocorreu mais uma sessão de 30 min, porém cada roedor recebeu duas injeções: uma por via intraperitoneal (i.p., 30 min antes da sessão) e duas intrahipocampais bilaterais (i.h., imediatamente antes da sessão). Escopolamina (0,5 mg/kg) e salina (0,2 mL) foram administrados por via i.p. e 4-AP (1mM/lado) e salina (0,2 µL/lado), por via i.h..

Os procedimentos adotados neste modelo são baseados nos trabalhos de Kawabe *et al.* (1998) e Chintoh *et al.* (2003). A Fig 2.3 apresenta o esquema de tais procedimentos. Antes de receberem as substâncias, os ratos passaram por uma familiarização ao campo aberto. No quarto, quinto e sexto dias após a implantação das cânulas-guia e em seguida do manuseio (ver item 4.1), os animais foram colocados um por vez na arena e deixados lá por 30 min.

No dia seguinte a essa familiarização, os ratos receberam a administração das substâncias e, em seguida à injeção i.h., foram colocados no campo aberto e tiveram os comportamentos filmados por 30 minutos. Os vídeos foram analisados contando-se o número de cruzamentos para cada animal. Essa quantificação da atividade motora foi feita por pesquisador ciente dos tratamentos dos animais. Todos os ensaios ocorreram entre 8:00 e 11:00 horas. Os roedores foram divididos em grupos caracterizados pelas substâncias que receberam:

- Grupo sal-sal: injeção i.p. de salina, seguida da injeção i.h. de salina (30 min de intervalo);
- Grupo sal-4-AP: injeção i.p. de salina, seguida da injeção i.h. de 4-AP (30 min de intervalo).
- Grupo escop-sal: injeção i.p. de escopolamina, seguida da injeção i.h. de salina (30 min de intervalo);
- Grupo escop-4-AP: injeção i.p. de escopolamina, seguida da injeção i.h. de 4-AP (30 min de intervalo).

## **5. Teste eletrofisiológico (registro de potencial de campo): indução de LTP**

Os registros de potencial de campo em fatias de cérebros de ratos em testes de indução de LTP foram realizados na *Uniformed Services University of the Health Sciences* (Bethesda, Estados Unidos) no laboratório coordenado pela Profa. Dra. Maria Braga.

Ratos Wistar foram anestesiados com isoflourano antes da sua decapitação. O cérebro de cada animal foi retirado e imediatamente mergulhado em solução de corte gelada. Após 3 minutos ele foi transferido para a câmara de corte do vibrátomo (Leica – VT1000S), também preenchida com solução de corte gelada. Foram feitos cortes coronais de 400 µm de espessura (de -3,00 a -4,00 mm do Bregma; Paxinos e Watson, 2007) contendo a região dorsal da

formação hipocampal. Os hemisférios das fatias foram separados pela linha média e transferidos para uma câmara incubadora contendo solução de banho à temperatura ambiente e permaneceram nessa por pelo menos 1 hora. Os registros de potencial de campo foram obtidos em uma câmara do tipo interface, mantida entre 32 e 33 °C e com fluxo constante de LCRA a uma taxa de 2 ml/min.

Os estímulos e registros ocorreram na formação hipocampal das fatias de cérebro (o córtex não era retirado das fatias). Os potenciais de campo foram evocados pela estimulação dos colaterais de Schaffer e registrados na região dos dendritos de neurônios piramidais de CA1 (*stratum radiatum*). A estimulação foi aplicada por meio de eletrodo concêntrico bipolar concêntrico de tungstênio (World Precision Instruments, EUA) com o auxílio de um gerador de pulsos S88X stimulator (Grass Technologies, EUA). Para os registros se utilizou pipetas de vidro, preparadas no estirador de micropipetas P-97 (Sutter Instruments, EUA), e preenchidas com LCRA (resistência de aproximadamente 5 M $\Omega$ ). Os potenciais de campo evocados foram em grande parte resultado da somatória de potenciais de pós-sinápticos excitatórios (PPSE) e sua mensuração foi usado para monitorar a força da transmissão sináptica. Essa medida foi obtida a partir da inclinação máxima (*slope*) da curva gerada no registro do potencial de campo evocado. Os sinais foram pré-amplificados pelo headstage (Axon Instruments, EUA) e, depois, enviados sequencialmente para o amplificador MultiClamp 700B Microelectrode Amplifier (Axon Instruments, EUA), para um eliminador de ruído de 50/60 Hz Hum Bug (Quest Scientific, Canada), para o conversor de sistema analógico em digital Digidata 1440A (Axon instruments, EUA) e por fim para o computador. Os sinais foram registrados usando o programa pClamp10.2 (Molecular Devices, EUA), analisados utilizando o programa Clampfit 10.2 (Molecular Devices, EUA) e a apresentação feita no Excel. Com os eletrodos posicionados, determinou-se a intensidade do estímulo (mV). Esse procedimento consistiu em construir uma curva estímulo-resposta para cada fatia da formação hipocampal, sendo a resposta a amplitude do potencial de campo evocado (mV). Para o ensaio eletrofisiológico, o valor do estímulo foi ajustado para produzir 60-70% da amplitude máxima. Feito isso, realizou-se um registro de 20 minutos a uma frequência de estímulo de 0,05 Hz. Para cada estímulo foi feito um registro, gerando, então, um ponto no gráfico resposta vs tempo. Com o intuito de induzir a LTP, aplicou-se uma estimulação de alta frequência (tetânica): 100 Hz, aplicada duas vezes por 1 s

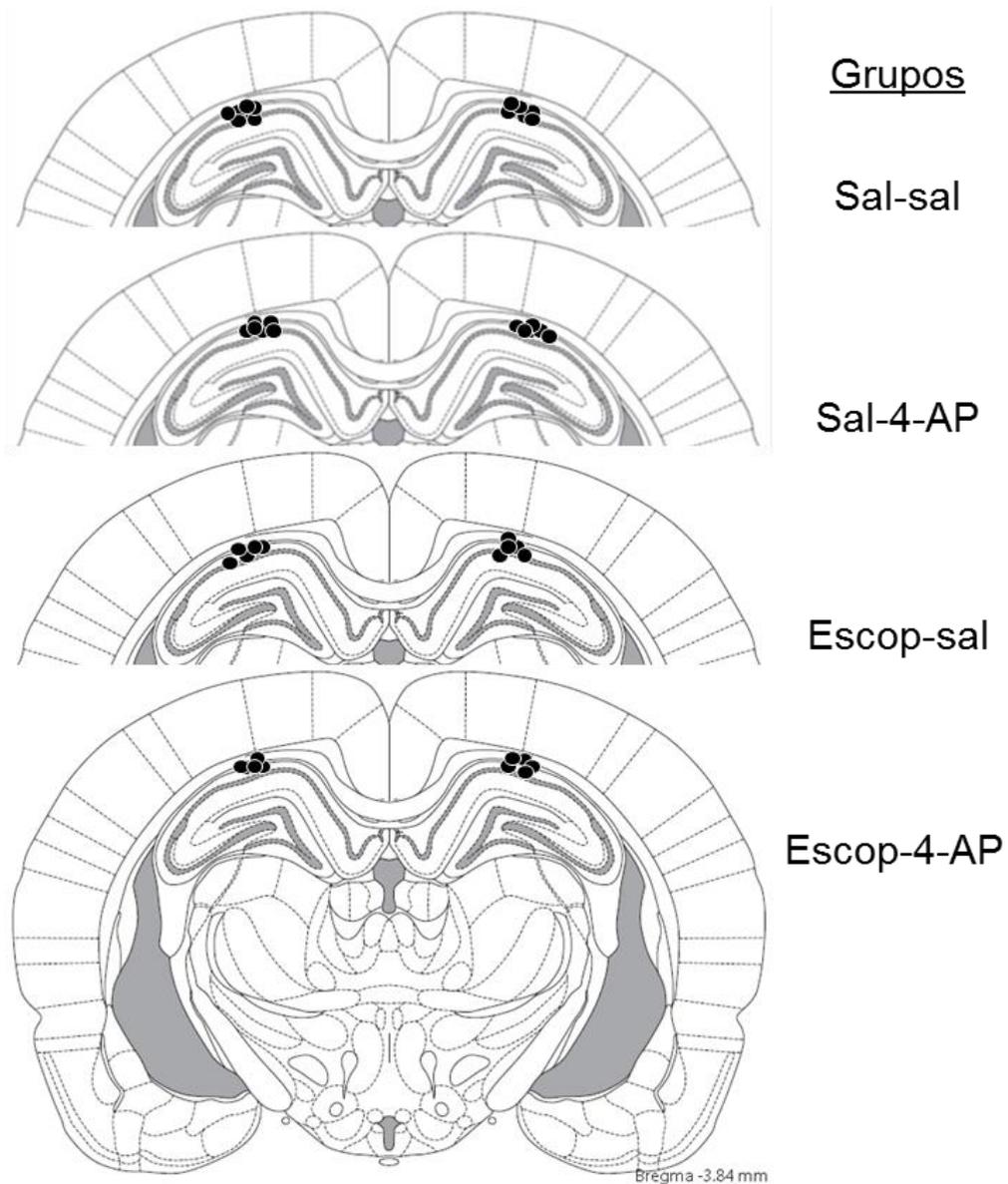
com intervalo de 20 s entre elas. Após essa, voltou-se a estimulação de 0,05 Hz. A intensidade da potenciação da resposta sináptica foi mensurada 50-60 min após a estimulação tetânica. Cada registro foi normalizado com base na média de todos os pontos registrados 10 min antes da estimulação tetânica (resposta basal). Portanto, os pontos de cada registro são expressos como uma porcentagem da resposta basal.

Os registros eletrofisiológicos foram realizados em fatias de cérebro que receberam diferentes tratamentos farmacológicos. Os dados finais para cada tratamento são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Foram constituídos os seguintes grupos com base nas soluções que banhavam os tecidos durante todo o experimento.

- Grupo controle: banhado por LCRA.
- Grupo escop: solução de escopolamina (item 3.2.2)
- Grupo 4-AP: solução de 4-AP (item 3.2.2)
- Grupo escop+4-AP: solução escop+4-AP (item 3.2.2)

## **6. Análise histológica**

Após o teste comportamental, cada animal foi profundamente anestesiado com tiopental sódico 120 mg/kg (Abbott). Com o rato anestesiado, sua caixa torácica foi aberta com auxílio de uma tesoura e a aorta canulada. Em seguida, o rato foi perfundido com 75 mL de NaCl 0,9% e, na seqüência, com 120 mL de formol 10% (v/v) em NaCl 0,9%. O cérebro foi retirado e colocado em fixador (formol 10% (v/v) em NaCl 0,9%) por uma noite. Em seguida, os cérebros foram incluídos em parafina e cortados em secções de 40  $\mu$ m de espessura em um micrótomo. Os cortes, colocados em lâmina gelatinizada (gelatina 0,5 % e sulfato de cromo-alumínio 0,05 %, p/v), foram corados com hematoxilina e eosina para verificação da posição das cânulas. Apenas ratos cujas pontas das duas cânulas-guia estavam sobre a região CA1 da formação hipocampal tiveram seus resultados no teste comportamental analisados (Fig. 2.4)



**Figura 2.4.** Esquema representativo de cortes coronais de cérebro dos ratos dos diferentes grupos de ratos que foram submetidos ao campo abeto. As pontas das cânulas-guia (círculos pretos) dos ratos usados nas análises estavam na região dorsal da formação hipocampal (distância do bregma de -3,84 mm) de acordo com as imagens do atlas de Paxinos e Watson (2007).

## 7. Análise estatística

Para a análise estatística dos resultados (cruzamentos totais no CA em 30 min) envolvendo diferentes tratamentos, empregou-se a análise de variância (ANOVA) de uma via.

Para avaliação das diferenças no número de cruzamentos entre os tratamentos farmacológicos ao longo do tempo (blocos de 5 min), utilizou-se ANOVA de duas vias, onde um fator foi o tratamento farmacológico e o outro fator, o tempo (blocos de 5 min). Neste caso, é importante ressaltar que quando se comparam os resultados entre os diferentes grupos de tratamento farmacológico, as medidas são independentes (grupos com indivíduos distintos). Porém quando se comparam os resultados ao longo do tempo de um mesmo grupo, as medidas são dependes (medidas repetidas do mesmo grupo de indivíduos). Para levar em consideração essa característica na análise estatística (realizada no programa R), foi utilizado o seguinte comando:

```
> dados.aov <- aov(CRUZA ~ TRATAM * TEMPO + Error(RATO), data = dados)
```

Portanto, na ANOVA (`aov`) foi realizada tendo como variável dependente o número de cruzamentos (`CRUZA`) e as variáveis independentes, os dois fatores: tratamento (`TRATAM`) e os blocos de 5 min (`TEMPO`). Deve ser observado que no comando foi solicitado ao programa considerar as medidas repetidas dos ratos (`Error(RATO)`) na análise, quando elas ocorressem. Para um aprofundamento sobre este procedimento estatístico consultar Cohen e Cohen (2008), Institute for Digital Research and Education – UCLA (2014) e o manual do R digitando-se “`?aov`” no *prompt* de comando do programa.

Quando a ANOVA indicou haver diferenças significativas, realizou-se o teste de Tukey para comparações múltiplas. Quando a ANOVA indicou haver diferenças significativas, realizou-se o teste de Tukey para comparações múltiplas. Quando se comparou os resultados de um grupo antes e depois do tratamento, foi utilizado o teste t para observações pareadas. Foi considerado um nível de significância de 0,05. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa R, versão 2.15.0, e os gráficos gerados no programa Excel.

## RESULTADOS

### 1. Campo aberto

A atividade locomotora espontânea não foi influenciada pela administração i.h. de 4-AP (1 mM), quando levamos em consideração o total de cruzamentos nos 30 min de sessão (Fig. 2.5). Os ratos que receberam 4-AP e salina (grupo sal-4-AP, n = 6) fizeram  $76 \pm 17$  cruzamentos (média  $\pm$  EPM), enquanto os controles (grupo sal-sal, n = 7) realizaram  $71 \pm 19$ , diferença estatisticamente não significativa.

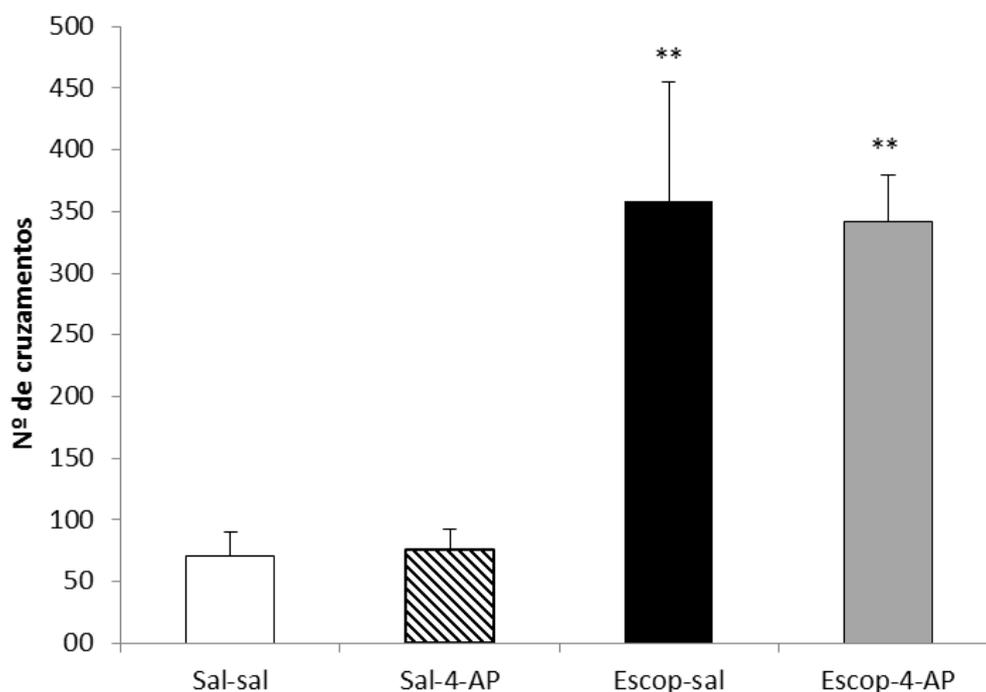
A administração de escopolamina, por outro lado, aumentou a atividade motora em 4,8 vezes (Fig. 2.5). O número de cruzamentos se elevou para  $358 \pm 97$  no grupo escop-sal (n = 5) e para  $342 \pm 38$  no grupo escop-4-AP (n = 5),  $p < 0,01$  em relação aos grupos sal-sal e sal-4-AP. A injeção i.h. de 4-AP não mostrou interferir nesse efeito da escopolamina, uma vez que não houve diferença significativa entre nos grupos escop-sal e escop-4AP. Porém, esta constatação não é válida para todos os 30 min da sessão.

Quando se apresenta o número de cruzamentos divididos em blocos de 5 min (Fig. 2.6), a 4-AP apresenta efeito. No grupo escop-sal, podemos observar que nos primeiros 5 min os ratos já fazem 2,3 vezes mais cruzamentos ( $85 \pm 15$ ) do que os dos grupos sal-sal ( $37 \pm 9$ ) e sal-4-AP ( $38 \pm 9$ ),  $p < 0,05$ . Porém, no mesmo tempo, os animais que receberam tanto escopolamina quanto 4-AP (grupo escop-4-AP) apresentam um número de cruzamentos ( $33 \pm 8$ ) menor que os do grupo escop-sal ( $p < 0,05$ ) e semelhante aos dos grupos sal-sal e sal-4-AP (diferenças não significativas). Portanto, a 4-AP aparentemente reverteu o efeito da escopolamina nesses primeiros minutos, pelo menos para a atividade motora espontânea. Para os demais blocos de 5 min, não existe diferença significativa de resultado entre os grupos sal-sal e sal-4-AP (injeção i.p. de salina em ambos), ou entre os grupos escop-sal e escop-4AP (injeção i.p. de escopolamina em ambos), mas há diferença (ver Fig.2.6) entre os grupos tratados com salina i.p. *versus* aqueles com escopolamina i.p. Nesse caso, os ratos que receberam escopolamina i.p. realizaram maior número de cruzamentos.

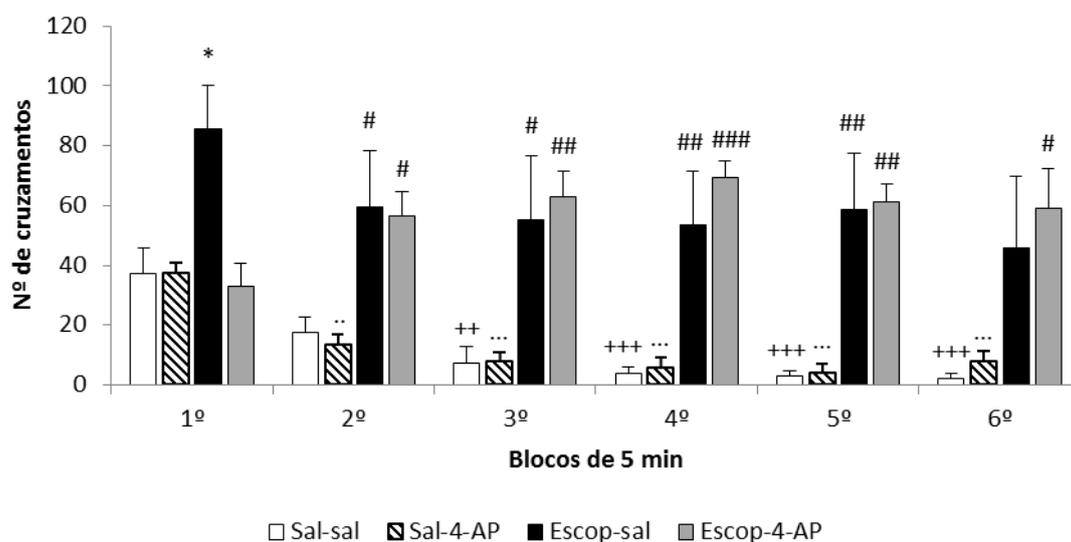
Os dados apresentados na Fig. 2.6, ainda revelam outra diferença de padrão de atividade motora entre os tratamentos. Nos grupos que receberam injeção i.p. de salina (sal-sal e sal-4-AP), o número de cruzamentos no início é alto (primeiros 5 minutos), mas vai reduzindo ao

longo do tempo. Isso não ocorre para os grupos injetados com escopolamina i.p. (escop-sal e escop-4AP) cuja resposta continua elevada no decorrer dos 30 min.

Por último, uma observação se faz relevante. Não foi constatada, em nenhum momento depois da injeção de 4-AP, a ocorrência de comportamentos anormais ou de crises convulsivas.



**Figura 2.5.** Atividade motora espontânea dos ratos no campo aberto quantificada por meio do número total de cruzamentos em 30 min de sessão do quarto dia. Resultado (média ± EPM) para os grupos sal-sal (salina i.p. + salina i.h., n = 7), sal-4-AP (salina i.p. + 4-AP i.h., n = 6), escop-sal (escopolamina i.p. + salina i.h., n = 5) e escop-4-AP (escopolamina i.p. + 4-AP i.h., n = 5). As doses de escopolamina e 4-AP (dissolvidas em salina) utilizadas foram 0,5 mg/kg e 1 mM, respectivamente. As injeções i.p. (0,2 mL) e i.h. (0,2 µL/lado) foram realizadas 30 min antes e imediatamente antes da sessão, respectivamente. \*\*, p < 0,01 em relação tanto ao grupo sal-sal, quanto ao sal-4-AP.

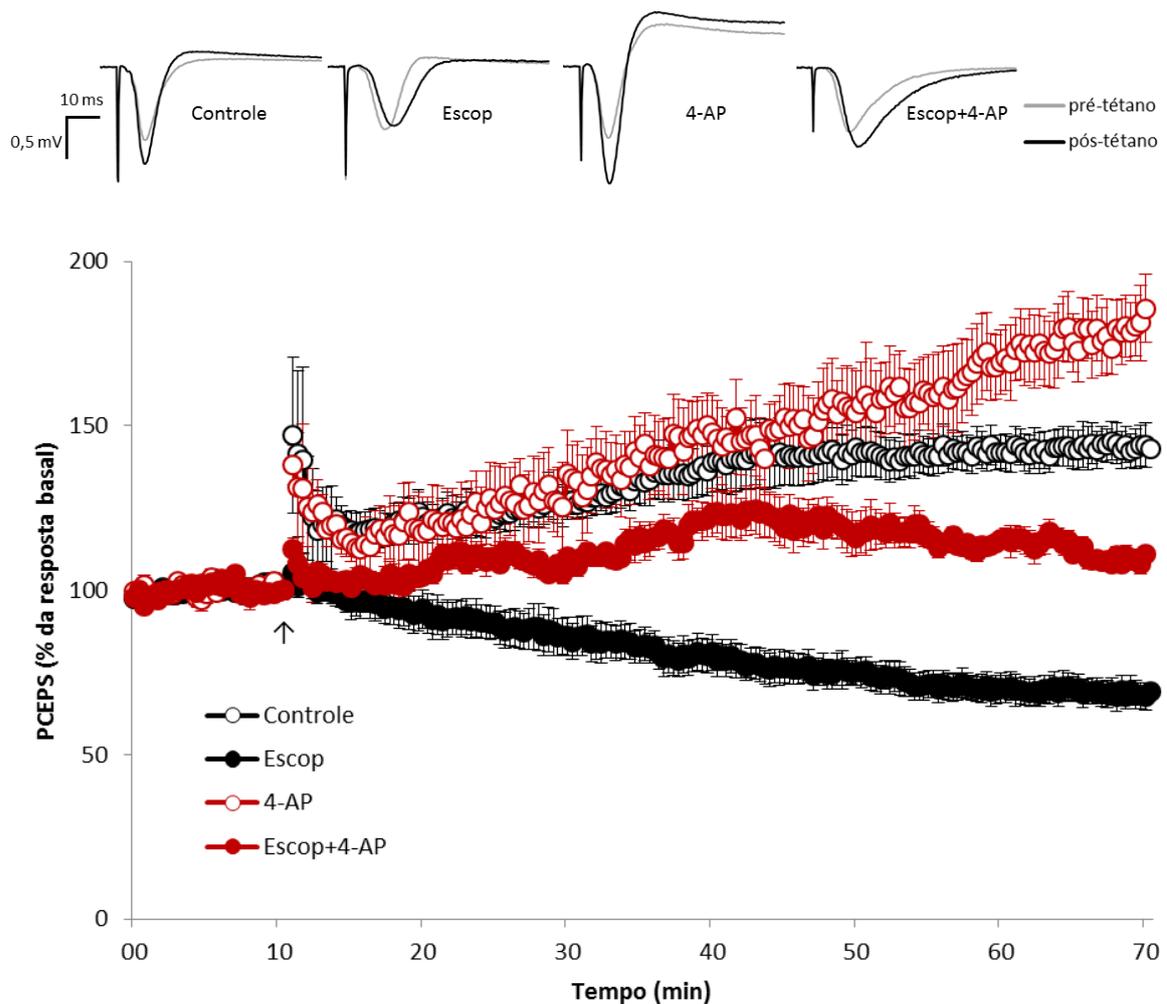


**Figura 2.6.** Decurso temporal da atividade motora espontânea (cruzamentos) dos ratos no campo aberto na sessão do quarto dia. As observações de 30 min tiveram o número de cruzamentos quantificados em intervalos de 5 min a partir do início da sessão totalizando 6 blocos (1º ao 6º). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  EPM. Os grupos foram: sal-sal (salina i.p. + salina i.h., n = 7); sal-4-AP (salina i.p. + salina i.h., n = 6); escop-sal (escopolamina i.p. + salina i.h., n = 5); e escop-4-AP (escopolamina i.p. + 4-AP i.h., n = 5). As doses de escopolamina e 4-AP (dissolvidas em salina) utilizadas foram 0,5 mg/kg e 1 mM, respectivamente. As injeções i.p. (0,2 mL) e i.h. (0,2  $\mu$ L/lado) foram realizadas 30 min antes e imediatamente antes da sessão, respectivamente. \* indica  $p < 0,05$  em relação aos grupos sal-sal, sal-4-AP e escop-4-AP. #, ## e ### indicam  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$  em relação aos grupos sal-sal e sal-4-AP. ++ e +++ indicam  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente, em relação 1º bloco de 5 min do grupo sal-sal. .. e ... indicam  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente, em relação 1º bloco de 5 min do grupo sal-4-AP.

## 2. Indução de LTP

Como mostrado na Fig. 2.7, a indução de LTP ocorreu com sucesso nas fatias dos cérebros de ratos do grupo controle (n = 6). Podemos observar que, durante os 10 minutos anteriores da estimulação tetânica (resposta basal), o registro do potencial de campo excitatório pós-sináptico (PCEPS) evocado foi constante. Como os dados de cada fatia foram normalizados com base na resposta basal dela mesma (ver item 5 do material e métodos), o valor médio do grupo controle para a inclinação das curvas dos PCEPS durante os 10 min pré-

estimulação tetânica foi de  $100,00 \pm 0,22$  % (média  $\pm$  EPM). Essa resposta mensurada entre 50 e 60 min após a estimulação tetânica aumentou para  $143,15 \pm 0,21$  % ( $p < 0,001$ ).



**Figura 2.7.** Influência de diferentes tratamentos na indução de LTP. As médias ( $\pm$  EPM) da inclinação da curva (*slope*) dos potenciais de campo excitatórios pós-sinápticos (PCEPS) são apresentadas como porcentagem da resposta basal (obtida durante 10 minutos anteriores à estimulação tetânica) ao longo do tempo. O momento dessa estimulação é indicado pela seta. Os círculos pretos abertos representam o grupo controle (sem fármacos,  $n = 6$ ); os pretos sólidos, o grupo escop (recebeu 2,4 mM escopolamina,  $n = 6$ ); os vermelhos abertos, o grupo 4-AP (recebeu 10  $\mu$ M 4-AP,  $n = 6$ ); e os vermelhos fechados, o grupo escop+4-AP (recebeu 2,4 mM escopolamina + 10  $\mu$ M 4-AP,  $n = 6$ ). Os traçados acima da figura são exemplos de curvas obtidas para cada um dos tratamentos e apresentam os valores sobrepostos dos potenciais de campos evocados antes (cinza) e 60 min após a estimulação tetânica (cada traçado é a média de 10 *sweeps*).

No grupo escop (n = 6), a escopolamina diminuiu a resposta pós-estimulação tetânica (Fig. 2.7). Nos dez minutos antes dessa estimulação, a resposta foi de  $100,00 \pm 0,24$  % e entre 50 e 60 min depois ela estava reduzida para  $69,28 \pm 0,17$  %. Esse resultado foi significativamente menor quando comparado ao do grupo controle ( $p < 0,001$ ), sugerindo não só a inibição da indução de LTP, mas a diminuição da atividade eletrofisiológica dos neurônios hipocâmpais de CA1.

A administração de 4-AP na solução de banho das fatias do grupo 4-AP (n = 6) intensificou o aumento da inclinação das curvas dos potenciais de campos evocados depois da estimulação tetânica (Fig 2.7). Como já esperado, a resposta nos 10 min pré-estimulação tetânica foi de  $100,00 \pm 0,30$  %. Porém, o valor da inclinação das curvas (50-60 min) após a estimulação foi  $176,01 \pm 0,71$  %, um aumento significativamente maior que o observado no grupo controle ( $p < 0,05$ ). Portanto, a 4-AP potencializou a indução de LTP.

No caso do grupo escop+4-AP (n = 6), houve indução de LTP nas fatias de cérebros que receberam conjuntamente a escopolamina e a 4-AP (Fig. 2.7). A média das respostas obtidas entre 50 e 60 minutos após a estimulação tetânica foi de  $112,43 \pm 0,55$  %, portanto maior que o valor de  $100,00 \pm 0,34$  observado durante os 10 min antes dos estímulos ( $p < 0,01$ ). O valor pós-estimulação desse grupo ainda foi menor que os do controle ( $p < 0,05$ ) e do tratado apenas com 4-AP ( $p < 0,001$ ), porém maior que o do grupo que recebeu somente escopolamina ( $p < 0,01$ ). Logo, a 4-AP reverteu, pelo menos em parte, a inibição da indução de LTP pela escopolamina.

## DISCUSSÃO

Antes de discutir os resultados, algumas explicações e evidências precisam ser apresentadas quanto ao uso do campo aberto como teste de memória e uso da escopolamina como produtor de amnésia.

O campo aberto pode ser utilizado para observar o fenômeno de habituação (Russell *et al.*, 1990; Tomaz *et al.*, 1990; Honey *et al.*, 2007). Habituação é uma forma de aprendizado e memória em que a intensidade de uma resposta naturalmente eliciada por um estímulo é diminuída com a apresentação repetida do dado estímulo. Portanto, o indivíduo aprende a reconhecer um estímulo não importante como familiar e passa a ignorá-lo (Rankin *et al.*, 2009; Squire e Kandel, 2009). Em ratos, esse estímulo pode ser um ambiente novo que exacerba seu comportamento exploratório. Quando esses roedores são colocados pela primeira vez no campo aberto (ambiente novo), eles apresentam elevada atividade locomotora (medida de exploração) que vai reduzindo com as reexposições (Walsh e Cummins, 1976; Alleva e Bignami, 1985; Laviola *et al.*, 1988; Thiel *et al.*, 1999). Além disso, dentro de uma mesma exposição, o comportamento exploratório (atividade locomotora e levantamentos) vai diminuindo com o tempo que o animal permanece no campo aberto (Stewart e Blain, 1975; Laviola *et al.*, 1988; Brenes *et al.*, 2009). Essas observações sugerem que o animal vai se habituando como o ambiente.

A formação hipocampal possui papel relevante no processo de habituação que ocorre em ratos submetidos repetidamente ao campo aberto. Faz-se necessário salientar que o campo aberto aqui se referido é colocado em uma sala cujas paredes possuem pistas visuais distintas que permitem ao animal se orientar no espaço. É proposto que a formação hipocampal constituiria um mapa cognitivo espacial (O'Keefe e Dostrovsky, 1971; O'Keefe e Nadel, 1978), permitindo uma representação interna do ambiente ao indivíduo. Nessa estrutura, existem neurônios (*place cells*) que disparam mais frequentemente quando o rato está em um dado local do que em outro (O'Keefe e Dostrovsky, 1971). O que parece ocorrer é que o conjunto dessas células disparando, quando o animal está no seu ambiente usual, forma um código populacional neuronal que representa esse espaço. Porém, quando o rato é colocado em um local novo, um outro conjunto de *place cells* emerge para caracterizar internamente essa

novidade para o indivíduo. Esse padrão no início é simples (poucas células envolvidas e baixa correlação entre disparos), mas vai melhorando (mais células e maior correlação) ao longo do tempo em que o rato vai explorando o novo ambiente (Wilson e McNaughton, 1993). Durante esse processo, ocorre alteração da atividade da circuitaria hipocampal, como a supressão da atividade de neurônios inibitórios, sugerindo modificações na plasticidade sináptica relacionadas ao aprendizado (Wilson e McNaughton, 1993). Esse fenômeno pode ser responsável pela familiarização do ambiente novo (o campo aberto, por exemplo) durante o processo de habituação, que, portanto, estaria prejudicado em uma situação de formação hipocampal deficiente. Há quase 40 anos, Lanier e Isaacson (1975) mostraram que ratos que tinham sido submetidos ao campo aberto durante 6 dias consecutivos apresentavam aumento da atividade locomotora em reexposições após a lesão de sua formação hipocampal por aspiração. Honey *et al.* (2007) apresentaram ratos sem (controle) e com lesões químicas (ácido ibotênico) da formação hipocampal ao campo aberto por 2 dias consecutivos (sessões de 3 minutos). Além de um aumento pronunciado da atividade motora dos ratos lesionados no segundo dia em relação ao primeiro (não presente nos controles), eles também observaram que os animais com lesão na formação hipocampal revisitavam zonas recém-visitas mais vezes do que os não lesionados. Em trabalho recente, Li *et al.* (2012) fizeram lesão eletrolítica unilateral da região dorsal da formação hipocampal de ratos e os submeteram a dois testes: campo aberto e labirinto aquático de Morris (LAM). No campo aberto, os animais (lesados e os controles não lesados) realizaram 4 sessões consecutivas de 5 min e tiveram seus deslocamentos e levantamentos quantificados. Como já era esperado, os animais lesionados (com 1 semana pós-lesão), diferente dos controles, não diminuíram sua atividade locomotora, nem o número de levantamentos, com as reapresentações ao campo aberto. Eles também obtiveram pior desempenho (maiores latências de escape e menor permanência no quadrante crítico) comparado aos controles no LAM, confirmando que a lesão da formação hipocampal prejudica o aprendizado espacial. Vianna *et al.* (2000) não fizeram lesão, mas injetaram diretamente na formação hipocampal (região CA1) diferentes fármacos agonistas e antagonistas de receptores e inibidores de enzimas da sinalização intracelular envolvidos no processo de aprendizado e memória em ratos submetidos ao campo aberto. Os animais eram submetidos a duas sessões (treino e teste) de 5 minutos com intervalo de 24 horas. Os

pesquisadores administraram os agentes químicos momentos antes do treino ou depois desse em diferentes intervalos de tempo e observaram aumento nos cruzamentos e nos levantamentos na sessão de teste para alguns tratamentos em relação aos controles. Eles constataram que a habituação espacial ao campo aberto dependia da atividade dos receptores N-metil-DL-aspartato (NMDA) hipocampais, importantes para a indução de LTP (ver adiante). Tomados juntos, esses resultados sugerem que os ratos com lesão ou manipulação química na formação hipocampal apresentam comprometimento da habituação a ambientes novos e que os testes em campo aberto com várias exposições podem detectar essa disfunção, expressa pelo aumento, ou não redução, da atividade motora ao longo das reexposições.

A acetilcolina parecer ser crítica no processo de aprendizado e memória. Por exemplo, a transmissão colinérgica possui papel relevante na formação de memória declarativa (espacial) e não declarativa (condicionamento e memória perceptiva) – para uma revisão ver Robinson *et al.* (2011) e Deiana *et al.* (2011), respectivamente. É também interessante destacar que a transmissão colinérgica é um importante modulador da transmissão e plasticidade sináptica na formação hipocampal (para uma revisão ver Drever *et al.*, 2011).

Esse relevante papel da transmissão colinérgica não poderia ser diferente na habituação (Carlton, 1968). Em roedores, a acetilcolina, junto com a serotonina, dopamina e glutamato constituem a base neuroquímica da habituação a ambientes novos (Leussis e Bolivar, 2006). Thiel *et al.* (1998) mostraram, por meio da técnica de microdiálise, que a reexposição de ratos ao campo aberto, além de diminuir a atividade exploratória (locomoção e levantamentos), provoca o aumento da liberação de acetilcolina na formação hipocampal. Resultado semelhante foi encontrado por Giovannini *et al.* (2001). Esses pesquisadores também encontram um aumento da acetilcolina na formação hipocampal tanto na primeira exposição (maior aumento) ao ambiente novo, quanto na segunda (menor aumento), que se correlacionava positivamente com a atividade motora (maior na primeira e menor na segunda exposição).

Sendo a acetilcolina realmente crítica para habituação a lugares novos, a utilização de agentes anticolinérgicos deveria prejudicar esse fenômeno. A escopolamina é um antagonista de receptor muscarínico, portanto um anticolinérgico, que possui efeito prejudicial na formação de memória (Deiana *et al.*, 2011; Robinson *et al.*, 2011). Vários trabalhos também mostraram

que ela perturba e pode até impedir a habituação ao campo aberto durante uma apresentação (Stewart e Blain, 1975) ou ao longo de sucessivas exposições. Alleva e Bignami (1985) submeteram camundongos com diferentes dias de vida a três sessões no campo aberto de 4 min com 24 horas de intervalo. Eles observaram que, a partir de 21 dias de vida, a escopolamina intraperitoneal (1 e 2 mg/kg aplicada 15 min antes de cada sessão) impedia a diminuição ou aumentava a atividade locomotora ao longo das exposições. Posteriormente, esses mesmos achados foram reproduzidos em camundongos adultos (Laviola *et al.*, 1992). Laviola *et al.* (1988) realizaram um trabalho semelhante porém com ratos. Além de utilizarem outra espécie de roedor, as outras diferenças metodológicas foram a redução da dose de escopolamina para 0,5 mg/kg e aumento do tempo das 3 sessões para 5 min cada. Esse trabalho também constatou que o agente anticolinérgico aumentou a locomoção dos animais com mais de 6 semanas de vida, tanto de uma reapresentação para outra, quanto ao longo do tempo de uma mesma sessão no campo aberto. Thiel *et al.* (1999) testaram ratos durante 5 dias nessa arena (10 min de sessão), sendo que no quinto dia, 10 min antes da sessão, foi injetado 0,5 mg/kg de escopolamina i.p.. Eles observaram entre o primeiro e quarto dias a redução da locomoção (habituação), porém um aumento dele no quinto. Chintoh *et al.* (2003) fizeram a habituação de ratos ao campo aberto durante três dias (sessões diárias de 1 h) e no quarto administraram salina (0,5 µL) na área tegmental ventral e escopolamina i.p. (3 mg/kg) antes da sessão. Animais controle receberam salina tanto centralmente quanto sistemicamente. Na última apresentação, a distância percorrida pelos ratos com escopolamina foi em média 6 vezes maior a dos controles ao longo dos 60 minutos. Diferentemente dos trabalhos supracitados que administraram a escopolamina antes da sessão de teste, Zhou *et al.* (2009) injetaram 1 mg/kg de escopolamina de forma subcutânea logo após o fim a primeira sessão de exposição de ratos ao campo aberto. Nesse caso, não foi constatado aumento da locomoção na segunda apresentação, sendo a sua intensidade semelhante ao dos controles (salina). Portanto, quando se bloqueia a transmissão colinérgica antes de uma reexposição, o processo de habituação é prejudicado, porém, aparentemente, ele ocorre normalmente se a inibição da ação da acetilcolina ocorre logo após a primeira exposição. Isso evidencia não só a importância da acetilcolina, mas que ela pode ter um papel na habituação espacial diferente de outros tipos de aprendizagem espacial. Por exemplo, Toumane e Durkin (1993) mostraram que

1 mg/kg de escopolamina i.p. só produz amnésia no labirinto radial de 8 braços se ela for ministrada até 3 horas após a primeira sessão de treinamento.

Neste trabalho, a escopolamina também produziu prejuízo da habituação espacial. Na sessão (a 4ª) em que os ratos receberam esse fármaco (30 min antes), eles apresentaram aumento da atividade locomotora (Fig 2.5). Esse resultado foi semelhante ao encontrado por Thiel *et al.* (1999) e Chintoh *et al.* (2003). É interessante destacar que esses dois trabalhos possuem um desenho experimental análogo ao nosso: 3 a 4 sessões de treino (10 a 60 min de duração) em dias consecutivos e, 24 horas depois do último treino, uma sessão de teste em que os animais recebiam escopolamina i.p. minutos antes do seu início. O trabalho de Chintoh *et al.* (2003) ainda é mais semelhante pois, além dos treinos acontecerem em três dias, os animais também recebiam uma injeção central de salina momentos antes do teste. As diferenças estão no tempo da sessão e na concentração de escopolamina utilizada: eles, 60 min e 3 mg/kg respectivamente; enquanto nós, 30 min e 0,5 mg/kg. Essas diferenças podem explicar porque o aumento da locomoção neste trabalho foi de 4,8 vezes em relação ao controle, enquanto no deles foi de 6 vezes.

A administração sozinha da 4-AP não teve efeito sobre a recuperação da informação espacial. Ela não alterou o total de cruzamentos dos ratos (Fig 2.5) e nem o padrão temporal da atividade locomotora (Fig 2.6) na reexposição ao campo aberto quando comparados aos animais controles. Essa ausência do efeito da 4-AP também foi encontrado por Poorheidari *et al.* (1998), com ratos no teste de escolha de acordo com a posição com atraso, por Banchelli *et al.* (2000), com camundongos no teste de esquiva passiva, e por Gomes *et al.* (2013), com camundongos em teste de reconhecimento de objetos. Porém, diferente desse último, não observamos em nossos experimentos crises convulsivas nos ratos tratados com 4-AP intrahipocampal, mesmo usando uma concentração  $3,3 \times 10^5$  vezes maior. A ausência de efeito desse fármaco não confirmou a nossa expectativa inicial, porém não é suficiente para afastar a possibilidade da 4-AP influenciar positivamente a aprendizagem e a memória. Com base no trabalho de Haroutunian *et al.* (1985), que evidenciou efeito positivo da 4-AP, levantamos duas questões a serem consideradas. Primeira, diz respeito ao momento do processo de formação de memória no qual foi administrado o fármaco. Nós o administramos imediatamente antes da sessão teste enquanto Haroutunian *et al.* (1985) administraram logo ao final da sessão treino.

Portanto a 4-AP estava atuando em momentos diferentes da consolidação e recuperação da memória. Talvez a atividade dos canais bloqueados pelo fármaco seja mais relevante para a consolidação da informação aprendida, do que para a recuperação dela. O segundo ponto é com relação ao tempo de duração da memória. Por exemplo, tanto Banchelli *et al.* (2000) quanto Haroutunian *et al.* (1985) injetaram 4-AP e submeteram os roedores ao teste de esquiwa passiva, porém apenas no segundo trabalho foi constatado uma melhora no desempenho dos animais (no primeiro foi neutro). A diferença é que em Banchelli *et al.* (2000) o teste para verificar a retenção da resposta foi feito com 24 horas, enquanto Haroutunian *et al.* (1985) o fizeram com 72 horas. Talvez o efeito da 4-AP se faça presente em longo prazo quando mecanismos responsáveis pela memória estejam funcionando normalmente. Também temos de considerar a hipótese de que o procedimento no campo aberto como modelo de habituação espacial não ser sensível o suficiente para detectar as influências da 4-AP na formação da memória em condições normais. Por fim, o fato da 4-AP não ter alterado o número de cruzamentos no campo aberto sugere que não há comprometimento da atividade motora dos ratos. Essa conclusão é corroborada pelo trabalho de Inan *et al.* (2000) que também não constatou alteração da resposta no rotarod (teste de atividade motora coordenada) nem na caixa de atividades (teste de atividade motora espontânea) de camundongos sob efeito do referido fármaco.

A 4-AP injetada na formação hipocampal possui efeito anti-amnésico, pelo menos parcialmente. Comparando o número total de cruzamentos em 30 min dos ratos que receberam tanto 4-AP intrahipocampal quanto escopolamina i.p. com os dos demais grupos (Fig. 2.5), temos a impressão de que a 4-AP não interferiu na ação amnésica da escopolamina. Porém, quando fazemos a mesma comparação levando-se em consideração a distribuição temporal da atividade locomotora (Fig. 2.6), observa-se que a 4-AP reverteu o efeito da escopolamina nos primeiros 5 min. Esse resultado não pode ser atribuído a um comprometimento motor, pois, como já foi comentado, a 4-AP não possui esse efeito. Descartando essa explicação, a outra possibilidade é que a 4-AP produziu um efeito anti-amnésico. Isso não é uma novidade, pois vários trabalhos já apresentados na introdução mostraram tal resultado em diferentes testes de memória. O que há de original aqui é a demonstração do efeito anti-amnésico da 4-AP quando administrada na formação hipocampal, sem causar convulsão. Mas, porque esse efeito se

mostrou presente apenas nos primeiros minutos? Talvez esse fenômeno seja resultado da forma com que os fármacos foram administrados. Uma pequena quantidade de 4-AP (1 mM; 0,2 µL/lado) foi administrada na formação hipocampal. É interessante lembrar que injeções intracerebrais, apesar de seletivas com relação ao substrato neural influenciado, possui efeito agudo e tênue (Menard e Treit, 1999; Engin e Treit, 2008). Por outro lado, a escopolamina foi infundida i.p. e, portanto, sua atuação foi mais difusa e duradoura no sistema nervoso. Por exemplo, a escopolamina em ratos tem meia vida de 18 min (Perlstein *et al.*, 2002) e de 17,3 min (Lyeth *et al.*, 1992) quando administrada intravenosamente e intraperitonealmente, respectivamente. Além disso, nessas condições, o efeito desse fármaco sobre o sistema nervoso parassimpático ocorre a partir de 70 min, após sua administração (Perlstein *et al.*, 2002), e sobre a atividade motora já está presente com 10 minutos depois de sua injeção, continuando por pelo menos mais 40 minutos (Stewart e Blain, 1975).

A potenciação de longo prazo da transmissão sináptica na formação hipocampal é considerada um mecanismo molecular/celular dos processos de aprendizado e memória (Bliss e Collingridge, 1993; Nicoll e Malenka, 1999; Neves *et al.*, 2008). A LTP se caracteriza por um aumento abrupto e sustentado da eficiência da transmissão sináptica após uma breve estimulação de alta frequência (estimulação tetânica) pré-sináptica em um circuito neural monossináptico e foi descrito primeiramente em coelhos anestesiados (Bliss e Lomo, 1973) e não anestesiados (Bliss e Gardner-Medwin, 1973). A ativação dos receptores NMDA é essencial para a indução desse fenômeno e a inibição deles por seu antagonista D-2-amino-5-fosfonopentanoato (AP5) impede a LTP, sem interferir na transmissão sináptica (Collingridge *et al.*, 1983a; Collingridge *et al.*, 1983b). Morris *et al.* (1986) e Davis *et al.* (1992) mostraram que esse antagonista de receptores NMDA administrado no ventrículo lateral de ratos também prejudica o aprendizado espacial no labirinto aquático de Morris de maneira dose dependente, além de atenuar a indução de LTP *in vivo*. Interessantemente, 4-AP pode potencializar a indução de LTP na formação hipocampal de fatias de cérebro de ratos (Lee *et al.*, 1986; Muller *et al.*, 1989). Lee *et al.* (1986) também conseguiram impedir esse efeito administrando AP5 à preparação, sugerindo que ação da 4-AP é mediada pelos receptores NMDA.

A indução de LTP hipocampal é considerada um exemplo de plasticidade sináptica (Neves *et al.*, 2008). Wilson e McNaughton (1993), que estudaram o padrão de atividade da *place cells*

da formação hipocampal, mostraram que durante a exploração de um ambiente novo ocorre alteração da atividade da circuitaria hipocampal, sugerindo modificações na plasticidade sináptica relacionadas ao aprendizado. Somando-se a isso, Vianna *et al.* (2000) conseguiram impedir a habituação no campo aberto aplicando AP5 na formação hipocampal de ratos. Logo indução de LTP está envolvida no processo de habitação espacial.

Neste trabalho a 4-AP reverteu em parte a supressão da indução de LTP pela escopolamina. A 4-AP conseguiu aumentar a LTP (Fig. 2.7), assim como constado por Lee *et al.* (1986) e Muller *et al.* (1989). Esse fármaco induz um maior influxo de  $Ca^{2+}$  no terminal pré-sináptico (Heemskerk *et al.*, 1991; Wu *et al.*, 2009) e aumenta a probabilidade de liberação de neurotransmissores (Hjelmstad *et al.*, 1997), porém esses efeitos parecem não serem determinantes do maior aumento da LTP (Muller e Lynch, 1989; Hjelmstad *et al.*, 1997). A 4-AP também aumenta a liberação de glutamato (Lin *et al.*, 2005; Wang e Chen, 2007; Satoh e Shimeki, 2010) e isso poderia explicar a potenciação da LTP observada neste trabalho, uma vez que esse neurotransmissor é necessário e suficiente para ocorrência do fenômeno de potenciação (Bagal *et al.*, 2005). Por outro lado, a escopolamina inibiu a indução de LTP na formação hipocampal (Fig. 2.7), como já tinha sido demonstrado em fatias de cérebro de ratos (Hirotsu *et al.*, 1989) e em ratos anestesiados (Ovsepian, 2008). Esses pesquisadores (Hirotsu *et al.*, 1989; Ovsepian, 2008) sugerem um papel regulador da acetilcolina na indução de LTP, função reforçada pelo trabalho de Li *et al.* (2007). Eles aumentaram a liberação de acetilcolina em ratos anestesiados reduzindo a inibição pré-sináptica desse neurotransmissor pela administração i.c.v de methoctramina e observaram uma potenciação da indução de LTP na formação hipocampal (CA1). Uma vez que a ativação de receptores muscarínicos pela acetilcolina potencializa a atividade dos receptores NMDA em neurônios piramidais hipocampais (Markram e Segal, 1990; Segal, 1992; Marino *et al.*, 1998), é esperado que a inibição dos receptores muscarínicos pela escopolamina suprima a LTP, como evidenciado por nossos resultados. A novidade deste trabalho está no achado da 4-AP reverter esses efeitos do agonista muscarínico (Fig. 2.7). A reversão poder ser explicada por dois fatores. Primeiro, pela capacidade da 4-AP aumentar a liberação de glutamato (já comentado) e, segundo, porque ela também exacerba a liberação de acetilcolina na formação hipocampal (Versteeg *et al.*, 1995; Sperlagh *et al.*, 2001). Esses dois fatores, separada ou conjuntamente, resultariam em

exacerbação da atividade dos receptores NMDA, revertendo os efeitos negativos sobre a indução de LTP e a habituação espacial no campo aberto, demonstrados neste capítulo. Podemos perceber ainda que o aumento da potenciação quando a 4-AP e a escopolamina estão presentes não é tão grande quanto na situação controle (sem fármacos), sugerindo que a prevenção da inibição do LTP não é plena. Esse resultado também pode explicar porque o efeito anti-aminésico da 4-AP foi parcial nos testes do campo aberto.

Em conjunto, os resultados deste capítulo mostram efeitos positivos da 4-AP intrahipocampal na memória. A sua administração na formação hipocampal *in vivo* (1 mM) ou *in vitro* (10  $\mu$ M) mostrou ter efeito anamnésico, intensificador de LTP e reversor de efeitos da inibição da transmissão colinérgica. Do ponto de vista dos objetivos práticos, conseguimos definir o uso da 4-AP para a padronização dos testes comportamentais de memória. Apesar desse fármaco ser um bloqueador não específico de canais para  $K^+$ , sua ação é direcionada aos canais  $K_v$ , não atuando nos  $K_{Ca}$ . É bom lembrar que o objetivo geral deste trabalho é investigar o papel dos canais  $K_v$  na aprendizagem e memória espacial, o diferenciando daquele desempenhado pelos canais  $K_{Ca}$  no mesmo fenômeno. Também determinamos a sua via de administração como sendo intrahipocampal, região de CA1 dorsal, e a dose de 1mM (0,2  $\mu$ l/lado) porque estes procedimentos reproduziram resultados da literatura com injeções sistêmicas, porém sem levar os animais a crises convulsivas. Administração central reduz a quantidade de fármacos utilizados em cada animal, o que é algo desejável neste trabalho tendo em vista a dificuldade de obtenção das toxinas. Outros pontos positivos da 4-AP são os de poder ser adquirida em grandes quantidades e a baixo custo, se comparada às toxinas, além de ser usada na clínica, facilitando comparação de resultados de animais de laboratório e de seres humanos. Existe, por exemplo, relato que o uso de 4-AP em pacientes com doença de Alzheimer resultou em melhora de aprendizado e memória (Wesseling *et al.*, 1984).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEVA, E. & BIGNAMI, G. 1985. Development of mouse activity, stimulus reactivity, habituation, and response to amphetamine and scopolamine. *Physiol Behav*, 34, 519-23.
- BAGAL, A. A., KAO, J. P., TANG, C. M. & THOMPSON, S. M. 2005. Long-term potentiation of exogenous glutamate responses at single dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 14434-9.
- BANCHELLI, G., RAIMONDI, L., GHELARDINI, C., PIRISINO, R., BERTINI, V., DE MUNNO, A. & LUCCHESINI, F. 2000. Benzylamine-related compounds stimulate rat vas deferens neurotransmission and potentiate memory in the mouse acting as potassium channel blockers. *Pharmacol Res*, 41, 151-62.
- BLISS, T. V. & COLLINGRIDGE, G. L. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361, 31-9.
- BLISS, T. V. & GARDNER-MEDWIN, A. R. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*, 232, 357-74.
- BLISS, T. V. & LOMO, T. 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol*, 232, 331-56.
- BRENES, J. C., PADILLA, M. & FORNAGUERA, J. 2009. A detailed analysis of open-field habituation and behavioral and neurochemical antidepressant-like effects in postweaning enriched rats. *Behav Brain Res*, 197, 125-37.
- CARLTON, P. L. 1968. Brain acetylcholine and habituation. *Prog Brain Res*, 28, 48-60.
- CHINTOH, A., FULTON, J., KOZIEL, N., AZIZ, M., SUD, M. & YEOMANS, J. S. 2003. Role of cholinergic receptors in locomotion induced by scopolamine and oxotremorine-M. *Pharmacol Biochem Behav*, 76, 53-61.
- COHEN, Y & COHEN, J. Y. 2008. Analysis of variance. In: COHEN, Y & COHEN, J. Y. (eds.) *Statistics and Data with R*. Chichester: Wiley.

- COLLINGRIDGE, G. L., KEHL, S. J. & MCLENNAN, H. 1983a. The antagonism of amino acid-induced excitations of rat hippocampal CA1 neurones in vitro. *J Physiol*, 334, 19-31.
- COLLINGRIDGE, G. L., KEHL, S. J. & MCLENNAN, H. 1983b. Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J Physiol*, 334, 33-46.
- DAMSMA, G., BIESELS, P. T., WESTERINK, B. H., DE VRIES, J. B. & HORN, A. S. 1988. Differential effects of 4-aminopyridine and 2,4-diaminopyridine on the in vivo release of acetylcholine and dopamine in freely moving rats measured by intrastriatal dialysis. *Eur J Pharmacol*, 145, 15-20.
- DAVIS, S., BUTCHER, S. P. & MORRIS, R. G. 1992. The NMDA receptor antagonist D-2-amino-5-phosphonopentanoate (D-AP5) impairs spatial learning and LTP in vivo at intracerebral concentrations comparable to those that block LTP in vitro. *J Neurosci*, 12, 21-34.
- DEIANA, S., PLATT, B. & RIEDEL, G. 2011. The cholinergic system and spatial learning. *Behav Brain Res*, 221, 389-411.
- DOLEZAL, V. & WECKER, L. 1991. Modulation of acetylcholine release from rat striatal slices: interaction between 4-aminopyridine and atropine. *J Pharmacol Exp Ther*, 258, 762-6.
- DREVER, B. D., RIEDEL, G. & PLATT, B. 2011. The cholinergic system and hippocampal plasticity. *Behav Brain Res*, 221, 505-14.
- EBERT, U. & KIRCH, W. 1998. Scopolamine model of dementia: electroencephalogram findings and cognitive performance. *Eur J Clin Invest*, 28, 944-9.
- EGEBERG, M. D., OH, C. Y. & BAINBRIDGE, J. L. 2012. Clinical overview of dalfampridine: an agent with a novel mechanism of action to help with gait disturbances. *Clin Ther*, 34, 2185-94.
- ENGIN, E. & TREIT, D. 2008. The effects of intra-cerebral drug infusions on animals' unconditioned fear reactions: a systematic review. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 32, 1399-419.
- GIOVANNINI, M. G., RAKOVSKA, A., BENTON, R. S., PAZZAGLI, M., BIANCHI, L. & PEPEU, G. 2001. Effects of novelty and habituation on acetylcholine, GABA, and glutamate

- release from the frontal cortex and hippocampus of freely moving rats. *Neuroscience*, 106, 43-53.
- GOLDSTEIN, S. A., BAYLISS, D. A., KIM, D., LESAGE, F., PLANT, L. D. & RAJAN, S. 2005. International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and molecular relationships of two-P potassium channels. *Pharmacol Rev*, 57, 527-40.
- GOMES, G. M., DALMOLIN, G. D., CORDEIRO, M. D., GOMEZ, M. V., FERREIRA, J. & RUBIN, M. A. 2013. The selective A-type K current blocker Tx3-1 isolated from the Phoneutria nigriventer venom enhances memory of naive and Abeta-treated mice. *Toxicon*, 76C, 23-27.
- GONZALEZ-SULSER, A., WANG, J., QUEENAN, B. N., AVOLI, M., VICINI, S. & DZAKPASU, R. 2012. Hippocampal neuron firing and local field potentials in the in vitro 4-aminopyridine epilepsy model. *J Neurophysiol*, 108, 2568-80.
- GUTMAN, G. A., CHANDY, K. G., GRISSMER, S., LAZDUNSKI, M., MCKINNON, D., PARDO, L. A., ROBERTSON, G. A., RUDY, B., SANGUINETTI, M. C., STUHMER, W. & WANG, X. 2005. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev*, 57, 473-508.
- HAAS, H. L., WIESER, H. G. & YASARGIL, M. G. 1983. 4-Aminopyridine and fiber potentials in rat and human hippocampal slices. *Experientia*, 39, 114-5.
- HAROUTUNIAN, V., BARNES, E. & DAVIS, K. L. 1985. Cholinergic modulation of memory in rats. *Psychopharmacology*, 87, 266-71.
- HEEMSKERK, F. M., SCHRAMA, L. H., GHIJSEN, W. E., DE GRAAN, P. N., LOPES DA SILVA, F. H. & GISPEN, W. H. 1991. Presynaptic mechanism of action of 4-aminopyridine: changes in intracellular free Ca<sup>2+</sup> concentration and its relationship to B-50 (GAP-43) phosphorylation. *J Neurochem*, 56, 1827-35.
- HIBINO, H., INANOBE, A., FURUTANI, K., MURAKAMI, S., FINDLAY, I. & KURACHI, Y. 2010. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev*, 90, 291-366.
- HIROTSU, I., HORI, N., KATSUDA, N. & ISHIHARA, T. 1989. Effect of anticholinergic drug on long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Brain Res*, 482, 194-7.

- HJELMSTAD, G. O., NICOLL, R. A. & MALENKA, R. C. 1997. Synaptic refractory period provides a measure of probability of release in the hippocampus. *Neuron*, 19, 1309-18.
- HONEY, R. C., MARSHALL, V. J., MCGREGOR, A., FUTTER, J. & GOOD, M. 2007. Revisiting places passed: sensitization of exploratory activity in rats with hippocampal lesions. *Q J Exp Psychol*, 60, 625-34.
- INAN, S. Y., AKSU, F. & BAYSAL, F. 2000. The effects of some K(+) channel blockers on scopolamine- or electroconvulsive shock-induced amnesia in mice. *Eur J Pharmacol*, 407, 159-64.
- INOUE, I., NAGASE, H., KISHI, K. & HIGUTI, T. 1991. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature*, 352, 244-7.
- INSTITUTE FOR DIGITAL RESEARCH AND EDUCATION – UCLA. 2014. Statistical computing seminars: repeated measures analysis with R. Disponível em: <[http://statistics.ats.ucla.edu/stat/r/seminars/Repeated\\_Measures/repeated\\_measures.htm](http://statistics.ats.ucla.edu/stat/r/seminars/Repeated_Measures/repeated_measures.htm)>. Acesso em: 17 mar. 2014.
- KAWABE, K., ICHITANI, Y. & IWASAKI, T. 1998. Effects of intrahippocampal AP5 treatment on radial-arm maze performance in rats. *Brain Res*, 781, 300-6.
- KEBLESH, J. P., DOU, H., GENDELMAN, H. E. & XIONG, H. 2009. 4-Aminopyridine improves spatial memory in a murine model of HIV-1 encephalitis. *J Neuroimmune Pharmacol*, 4, 317-27.
- KUBO, Y., ADELMAN, J. P., CLAPHAM, D. E., JAN, L. Y., KARSCHIN, A., KURACHI, Y., LAZDUNSKI, M., NICHOLS, C. G., SEINO, S. & VANDENBERG, C. A. 2005. International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacol Rev*, 57, 509-26.
- LANIER, L. P. & ISAACSON, R. L. 1975. Activity changes related to the location of lesion in the hippocampus. *Behav Biol*, 13, 59-69.
- LAVIOLA, G., PICK, C. G., YANAI, J. & ALLEVA, E. 1992. Eight-arm maze performance, neophobia, and hippocampal cholinergic alterations after prenatal oxazepam in mice. *Brain Res Bull*, 29, 609-16.

- LAVIOLA, G., RENNA, G., BIGNAMI, G. & CUOMO, V. 1988. Ontogenetic and pharmacological dissociation of various components of locomotor activity and habituation in the rat. *Int J Dev Neurosci*, 6, 431-8.
- LEE, W. L., ANWYL, R. & ROWAN, M. 1986. 4-Aminopyridine-mediated increase in long-term potentiation in CA1 of the rat hippocampus. *Neurosci Lett*, 70, 106-9.
- LEUSSIS, M. P. & BOLIVAR, V. J. 2006. Habituation in rodents: a review of behavior, neurobiology, and genetics. *Neurosci Biobehav Rev*, 30, 1045-64.
- LI, H., WU, X., BAI, Y., HUANG, Y., HE, W. & DONG, Z. 2012. Unilateral lesion of dorsal hippocampus in adult rats impairs contralateral long-term potentiation in vivo and spatial memory in the early postoperative phase. *Behav Brain Res*, 230, 428-32.
- LI, S., CULLEN, W. K., ANWYL, R. & ROWAN, M. J. 2007. Muscarinic acetylcholine receptor-dependent induction of persistent synaptic enhancement in rat hippocampus in vivo. *Neuroscience*, 144, 754-61.
- LIN, C. H., LEE, C. C., HUANG, Y. C., WANG, S. J. & GEAN, P. W. 2005. Activation of group II metabotropic glutamate receptors induces depotentiation in amygdala slices and reduces fear-potentiated startle in rats. *Learn Mem*, 12, 130-7.
- LYETH, B. G., RAY, M., HAMM, R. J., SCHNABEL, J., SAADY, J. J., POKLIS, A., JENKINS, L. W., GUDEMAN, S. K. & HAYES, R. L. 1992. Postinjury scopolamine administration in experimental traumatic brain injury. *Brain Res*, 569, 281-6.
- MARINO, M. J., ROUSE, S. T., LEVEY, A. I., POTTER, L. T. & CONN, P. J. 1998. Activation of the genetically defined m1 muscarinic receptor potentiates N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor currents in hippocampal pyramidal cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 11465-70.
- MARKRAM, H. & SEGAL, M. 1990. Acetylcholine potentiates responses to N-methyl-D-aspartate in the rat hippocampus. *Neurosci Lett*, 113, 62-5.
- MATHIE, A., WOOLTORTON, J. R. & WATKINS, C. S. 1998. Voltage-activated potassium channels in mammalian neurons and their block by novel pharmacological agents. *Gen Pharmacol*, 30, 13-24.
- MENARD, J. & TREIT, D. 1999. Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*, 23, 591-613.

- MORALES-VILLAGRAN, A., LOPEZ-PEREZ, S., MEDINA-CEJA, L. & TAPIA, R. 1999. Cortical catecholamine changes and seizures induced by 4-aminopyridine in awake rats, studied with a dual microdialysis-electrical recording technique. *Neurosci Lett*, 275, 133-6.
- MORRIS, R. G., ANDERSON, E., LYNCH, G. S. & BAUDRY, M. 1986. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature*, 319, 774-6.
- MULLER, D. & LYNCH, G. 1989. Evidence that changes in presynaptic calcium currents are not responsible for long-term potentiation in hippocampus. *Brain Res*, 479, 290-9.
- MULLER, D., OLIVER, M. & LYNCH, G. 1989. Developmental changes in synaptic properties in hippocampus of neonatal rats. *Brain Res Dev Brain Res*, 49, 105-14.
- NEVES, G., COOKE, S. F. & BLISS, T. V. 2008. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci*, 9, 65-75.
- NICOLL, R. A. & MALENKA, R. C. 1999. Expression mechanisms underlying NMDA receptor-dependent long-term potentiation. *Ann N Y Acad Sci*, 868, 515-25.
- O'KEEFE, J. & DOSTROVSKY, J. 1971. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res*, 34, 171-5.
- O'KEEFE, J. & NADEL, L. 1978. *The Hippocampus as a Cognitive Map*. Oxford: Oxford University Press.
- OVSEPIAN, S. V. 2008. Differential cholinergic modulation of synaptic encoding and gain control mechanisms in rat hippocampus. *Neurosci Res*, 61, 92-8.
- PALANI, D., BAGINSKAS, A. & RAASTAD, M. 2010. Bursts and hyperexcitability in non-myelinated axons of the rat hippocampus. *Neuroscience*, 167, 1004-13.
- PAXINOS, G. & WATSON, C. 2007. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 6 ed. London: Academic Press.
- PERLSTEIN, I., STEPENSKY, D., KRZYZANSKI, W. & HOFFMAN, A. 2002. A signal transduction pharmacodynamic model of the kinetics of the parasympathomimetic activity of low-dose scopolamine and atropine in rats. *J Pharm Sci*, 91, 2500-10.
- POORHEIDARI, G., STANHOPE, K. J. & PRATT, J. A. 1998. Effects of the potassium channel blockers, apamin and 4-aminopyridine, on scopolamine-induced deficits in the delayed

- matching to position task in rats: a comparison with the cholinesterase inhibitor E2020. *Psychopharmacology*, 135, 242-55.
- RANKIN, C. H., ABRAMS, T., BARRY, R. J., BHATNAGAR, S., CLAYTON, D. F., COLOMBO, J., COPPOLA, G., GEYER, M. A., GLANZMAN, D. L., MARSLAND, S., MCSWEENEY, F. K., WILSON, D. A., WU, C. F. & THOMPSON, R. F. 2009. Habituation revisited: an updated and revised description of the behavioral characteristics of habituation. *Neurobiol Learn Mem*, 92, 135-8.
- ROBINSON, L., PLATT, B. & RIEDEL, G. 2011. Involvement of the cholinergic system in conditioning and perceptual memory. *Behav Brain Res*, 221, 443-65.
- RUSSELL, R. W., JENDEN, D. J., BOOTH, R. A., LAURETZ, S. D., RICE, K. M. & ROCH, M. 1990. Global in vivo replacement of choline by N-aminodeanol. Testing a hypothesis about progressive degenerative dementia: II. Physiological and behavioral effects. *Pharmacol Biochem Behav*, 37, 811-20.
- RUSSELL, S. N., PUBLICOVER, N. G., HART, P. J., CARL, A., HUME, J. R., SANDERS, K. M. & HOROWITZ, B. 1994. Block by 4-aminopyridine of a Kv1.2 delayed rectifier K<sup>+</sup> current expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol*, 481 ( Pt 3), 571-84.
- SATOH, E. & SHIMEKI, S. 2010. Acute restraint stress enhances calcium mobilization and glutamate exocytosis in cerebrocortical synaptosomes from mice. *Neurochem Res*, 35, 693-701.
- SEGAL, M. 1992. Acetylcholine enhances NMDA-evoked calcium rise in hippocampal neurons. *Brain Res*, 587, 83-7.
- SINHA, S. K. & SHRIVASTAVA, S. K. 2013. Design, synthesis and evaluation of some new 4-aminopyridine derivatives in learning and memory. *Bioorg Med Chem Lett*, 23, 2984-9.
- SPERLAGH, B., ZSILLA, G. & VIZI, E. S. 2001. K(ATP) channel blockers selectively interact with A(1)-adenosine receptor mediated modulation of acetylcholine release in the rat hippocampus. *Brain Res*, 889, 63-70.
- SQUIRE, L. R. & KANDEL, E. R. 2009. Modifiable synapses for nondeclarative memory. *In*: SQUIRE, L. R. & KANDEL, E. R. (eds.) *Memory: from Mind to Molecules*. 2 ed. Greenwood: Roberts and Company Publishers.

- STEWART, W. J. & BLAIN, S. 1975. Dose-response effects of scopolamine on activity in an open field. *Psychopharmacologia*, 44, 291-5.
- THIEL, C. M., HUSTON, J. P. & SCHWARTING, R. K. 1998. Hippocampal acetylcholine and habituation learning. *Neuroscience*, 85, 1253-62.
- THIEL, C. M., MULLER, C. P., HUSTON, J. P. & SCHWARTING, R. K. 1999. High versus low reactivity to a novel environment: behavioural, pharmacological and neurochemical assessments. *Neuroscience*, 93, 243-51.
- TOMAZ, C., AGUIAR, M. S. & NOGUEIRA, P. J. 1990. Facilitation of memory by peripheral administration of substance P and naloxone using avoidance and habituation learning tasks. *Neurosci Biobehav Rev*, 14, 447-53.
- TOUMANE, A. & DURKIN, T. P. 1993. Time gradient for post-test vulnerability to scopolamine-induced amnesia following the initial acquisition session of a spatial reference memory task in mice. *Behav Neural Biol*, 60, 139-51.
- VAN HARREVELD, A. 1984. Effects of 4-aminopyridine on the field potentials of hippocampal slices. *Neurosci Lett*, 50, 283-7.
- VERSTEEG, D. H., HEEMSKERK, F. M., SPIERENBURG, H. A., DE GRAAN, P. N. & SCHRAMA, L. H. 1995. 4-Aminopyridine differentially affects the spontaneous release of radiolabelled transmitters from rat brain slices in vitro. *Brain Res*, 686, 233-8.
- VIANNA, M. R., ALONSO, M., VIOLA, H., QUEVEDO, J., DE PARIS, F., FURMAN, M., DE STEIN, M. L., MEDINA, J. H. & IZQUIERDO, I. 2000. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learn Mem*, 7, 333-40.
- WALSH, R. N. & CUMMINS, R. A. 1976. The Open-Field Test: a critical review. *Psychol Bull*, 83, 482-504.
- WANG, D., DARWISH, D. S. & SCHREURS, B. G. 2006. Effects of 4-aminopyridine on classical conditioning of the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) nictitating membrane response. *Behav Pharmacol*, 17, 319-29.
- WANG, S. J. & CHEN, H. H. 2007. Presynaptic mechanisms underlying the alpha-lipoic acid facilitation of glutamate exocytosis in rat cerebral cortex nerve terminals. *Neurochem Int*, 50, 51-60.

- WEI, A. D., GUTMAN, G. A., ALDRICH, R., CHANDY, K. G., GRISSMER, S. & WULFF, H. 2005. International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacol Rev*, 57, 463-72.
- WESSELING, H., AGOSTON, S., VAN DAM, G. B., PASMA, J., DEWIT, D. J. & HAVINGA, H. 1984. Effects of 4-aminopyridine in elderly patients with Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, 310, 988-9.
- WILSON, M. A. & MCNAUGHTON, B. L. 1993. Dynamics of the hippocampal ensemble code for space. *Science*, 261, 1055-8.
- WU, Z. Z., LI, D. P., CHEN, S. R. & PAN, H. L. 2009. Aminopyridines potentiate synaptic and neuromuscular transmission by targeting the voltage-activated calcium channel beta subunit. *J Biol Chem*, 284, 36453-61.
- YOKEL, R. A., ALLEN, D. D. & MEYER, J. J. 1994. Studies of aluminum neurobehavioral toxicity in the intact mammal. *Cell Mol Neurobiol*, 14, 791-808.
- ZHOU, W., FUKUMOTO, S. & YOKOGOSHI, H. 2009. Components of lemon essential oil attenuate dementia induced by scopolamine. *Nutr Neurosci*, 12, 57-64.

# Capítulo 3

## **Definição do protocolo experimental para o estudo do efeito da 4-AP e de toxinas sobre a memória espacial em ratos.**

Neste capítulo, a influência de canais  $K_v$  nos processos da memória foi avaliada. O objetivo dos experimentos desta seção foi o de escolher o modelo comportamental de memória espacial que seria usado no teste com as toxinas bloqueadoras desses canais. Além disso, foi definido o momento de injeção de 4-AP de modo a garantir que as toxinas estivessem agindo sobre os canais  $K_v$  hipocámpais no mesmo momento em que eles estão contribuindo para a formação da memória espacial.

## INTRODUÇÃO

Até o momento, não está claro se os canais  $K_v$  teriam um papel relevante na formação da memória espacial. Os trabalhos de Haroutunian *et al.* (1985) e Wang *et al.* (2006) sugerem que o bloqueio de canais  $K_v$  pela 4-AP facilita o condicionamento operante e o clássico. Mas, e quanto ao aprendizado espacial? Após busca, não foram encontrados registros na literatura de ensaios com 4-AP no labirinto aquático de Morris (LAM) ou no labirinto radial de oito braços (LR). Como são modelos importantes de aprendizado espacial, é surpreendente que testes não tenham sido feitos, ou foram realizados, mas não foram conclusivos e, portanto, não foram publicados. Neste capítulo de doutorado foi feita uma investigação para verificar se as ações de canais  $K_v$  são relevantes para o aprendizado espacial. Se eles não o forem, os testes com as toxinas específicas para esses canais podem ser em vão.

Apesar de relatos na literatura e de nossos próprios experimentos (capítulo 2) mostrarem que a 4-AP potencializa a indução de potenciação de longo prazo (LTP, sigla em inglês) em fatias da formação hipocampal, um modelo molecular/celular de memória, não foi constatado efeito de melhora de desempenho em animais por esse fármaco em testes comportamentais para memória espacial. Como explicar isso? O processo de aprendizagem e memória é complexo e envolve diferentes etapas (Kessels *et al.*, 2001; Paul *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2010; Nadel *et al.*, 2012). Uma explicação para esse aparente paradoxo pode estar na possibilidade de que os canais  $K_v$  bloqueados pela 4-AP tenham participação em momentos específicos dos processos da memória e que os pesquisadores que usaram esse fármaco em modelos animais de memória espacial não o administraram nesses tempos decisivos. A solução dessa questão passa a ser muito relevante neste trabalho, pois se escolhido um momento de aplicação das toxinas bloqueadoras de canais  $K_v$  em que a atividade desses não seja relevante para a formação da memória espacial, não detectaremos seus efeitos e poderemos chegar a uma falso negativo. Portanto, esse é o principal objetivo deste capítulo.

Como já comentado no capítulo 1, a memória espacial se refere a uma função cerebral que capacita um animal adquirir e armazenar informações do espaço ao ser redor (Kessels *et al.*, 2001; Paul *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2010). Essas informações podem ser recuperadas

pelo indivíduo permitindo o reconhecimento de objetos e sua disposição no ambiente ou elaboração de rotas que o levem a locais mais seguros ou com maior probabilidade de obtenção de alimento (Kessels *et al.*, 2001; Paul *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2010). Ela pode ser subdividida em memória espacial de curto prazo, capacidade limitada de reter informação por vários segundos a minutos, e de longo prazo, que armazena mais e por um período potencialmente ilimitado (Kessels *et al.*, 2001; Paul *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2010). Como já foi comentado no capítulo 2, a formação hipocampal possui papel crítico nessa função e sua lesão produz déficit de memória espacial em roedores (Morris *et al.*, 1982; Deacon *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2004; Ramos, 2008; Levita e Muzzio, 2010) e primatas (Murray *et al.*, 1998; Bachevalier e Nemanic, 2008), entre eles o homem (Smith e Milner, 1989; Holdstock *et al.*, 2000; Finke *et al.*, 2011). Dois testes muito utilizados para constatar e medir alterações na memória espacial em roedores são o LAM e o LR (Dudchenko, 2004; Paul *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2010).

O LR foi inicialmente sugerido por Olton e Samuelson em 1976 (Olton e Samuelson, 1976). Na proposta inicial do labirinto, ratos privados de alimento eram colocados (um por vez) em uma plataforma central de onde se originavam oito braços, todos com alimento na extremidade distal. Os roedores eram submetidos a várias sessões (uma por dia) em que podiam entrar nos braços para pegar o alimento, porém era considerado erro quando revisitavam um local no qual já tinha se alimentado. O LR é colocado em uma sala que possui várias pistas visuais em suas paredes permitindo que o animal oriente-se no ambiente. Esse dispositivo pode possuir até 17 braços e o alimento pode estar presente só em alguns deles (Olton e Papas, 1979). Os poucos braços que possuem alimento sempre mantêm a mesma posição em relação às pistas espaciais. Nesse caso, o animal pode cometer erros relacionados a dois tipos de memória: memória de referência e memória operacional.

No LR, as memórias de referência e operacional são memórias espaciais de longo e curto prazo, respectivamente. A memória de referência é resultado do aprendizado espacial constante, de sessão a sessão, sobre a localização do alimento e é resistente a possíveis interferências (Olton e Papas, 1979). Como envolve a retenção de informação espacial ao longo de várias sessões de treino, ela é considerada uma memória de longo prazo (Paul *et al.*, 2009). O erro de memória de referência ocorre quando o roedor entra em um braço que nunca

teve alimentos ao longo dos experimentos. A memória operacional espacial é um aprendizado flexível que muda de sessão para sessão e é suscetível à interferência (Olton e Papas, 1979). Ela pode ser definida como uma memória de curto prazo da localização do alimento dentro de uma dada sessão. Assim que se encerra essa, a informação espacial é descartada e uma nova será adquirida na próxima sessão (Dudchenko, 2004). O erro de memória operacional ocorre quando o roedor entra em um braço já visitado naquela sessão. Lesões na formação hipocampal (Galani *et al.*, 2002), em especial da região dorsal (Pothuizen *et al.*, 2004) causam prejuízo tanto da memória operacional, quanto da de referência.

O LAM foi proposto por Morris em 1981 (Morris, 1981). Esse labirinto é uma piscina com água turva em que o animal é colocado e tem de nadar até uma plataforma submersa seguindo por pistas externas ao tanque. Os roedores são submetidos a várias sessões de aquisição. No começo, como eles nunca estiveram no dispositivo, demoram a alcançar a plataforma (latência de escape). Com a repetição das sessões, vão levando cada vez menos tempo para concluir a tarefa (taxa de aquisição), além de nadar em trajetória mais direcionada à plataforma, efetuando menos voltas ao redor da piscina (Morris, 1981; Morris, 1984). Ao final das sessões de aquisição, é realizado um teste de sondagem, transferência ou retenção (esse último 24 horas após à última sessão de aquisição) em que a plataforma não está presente na piscina e o animal nada livremente por período predeterminado. Nesses testes, busca-se determinar a precisão espacial da busca da plataforma pelos indivíduos (D'Hooge e De Deyn, 2001). Essa avaliação é caracterizada pelo tempo gasto por eles no quadrante onde estava posicionada a plataforma ou pelo número de vezes que cruzam a área onde ela ficava. Esse processo de aprendizado e formação de memória é dependente da integralidade da formação hipocampal, uma vez que roedores com lesões nessa estrutura apresentam pior desempenho em relação aos não lesionados (Morris *et al.*, 1982; Deacon *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2004). O teste de roedores no LAM é simples de ser executado, acurado, reprodutível e elimina a possibilidade de o animal utilizar-se do odor, em vez das pistas visuais, para guiar sua navegação (D'Hooge e De Deyn, 2001; Sharma *et al.*, 2010). Esse labirinto, na configuração em que a posição da plataforma ao longo das sessões é fixa, mensura a taxa de aquisição da informação espacial (Hodges, 1996). Como nesse caso o aprendizado espacial se faz de forma constante de sessão a sessão, alguns autores (Lindner *et al.*, 1992; Schweizer *et al.*, 2003;

Sharma *et al.*, 2010) consideram que esse processo leva à formação de memória de referência. Porém, essa opinião não é compartilhada pelos demais pesquisadores cujos trabalhos são citados neste capítulo e que preferem chamá-la de memória de longo prazo.

Este capítulo relata as consequências da administração da 4-AP em ratos submetidos ao LR e ao LAM. Esses experimentos têm por intuito responder duas questões práticas. Primeira, qual desses dois testes de memória espacial seria o mais adequado para verificar o efeito do bloqueio de canais  $K_v$  sobre a aprendizagem espacial. Segunda, qual procedimento experimental e em que momento o bloqueador de canais  $K_v$  deve ser aplicado para observarmos um possível efeito desses na formação da memória espacial.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **1. Animais**

Utilizaram-se ratos Wistar machos como descrito no item 1 do material e métodos do capítulo 2. Para os experimentos deste capítulo foram utilizados 89 ratos no total.

### **2. Implante das cânulas**

As cânulas foram implantadas como descrito no item 2 do material e métodos do capítulo 2.

### **3. Fármacos, soluções, doses e vias de administração**

#### **3.1. Administração intraperitoneal (i.p.)**

As seguintes substâncias foram administradas por via intraperitoneal:

- Salina (solução estéril de NaCl 0,9 %): 0,2 mL;
- Bromidrato de escopolamina (Sigma – S0929): 0,5 mg/kg (dissolvido em 0,2 mL de salina).
- 4-AP (Sigma – A78403): 0,1 ou 0,5 mg/kg (dissolvido em 0,2 mL de salina).

#### **3.2. Administração intrahipocampal (i.h.)**

As seguintes substâncias serão administradas bilateralmente na região CA1 da formação hipocampal dos ratos:

- Tampão fosfato salino (PBS) - NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 9,1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM, pH 7,4: 0,2 µL/lado em cada animal;
- 4-AP (Sigma – A78403): 1,0 mM/lado dissolvido em PBS (0,2 µL/lado) por animal.

As soluções foram administradas como descrito no item 3 do material e métodos do capítulo 2.

#### **4. Testes comportamentais**

##### **4.1. Habituação dos animais à imobilização (manuseio)**

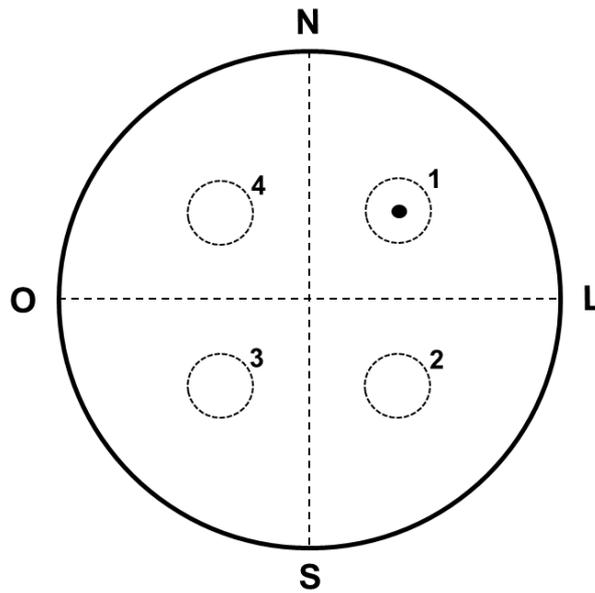
Os animais foram manuseados como descrito no item 4.1 do material e métodos do capítulo 2.

##### **4.2. Labirinto aquático de Morris (LAM)**

O LAM consistiu em um tanque redondo com 2 m de diâmetro e 45 cm de altura de cor azul escuro. Esse foi dividido em quatro quadrantes iguais (norte, sul, leste e oeste) e preenchido com água até uma altura de 30 cm para constituir uma piscina. No centro de um dos quadrantes (denominado quadrante crítico) foi colocada uma plataforma branca móvel que tinha 10 cm de diâmetro (a base era mais larga para assegurar a estabilidade) e 28,5 cm de altura. Portanto, o topo da plataforma ficava submerso a 1,5 cm da superfície e, para impedir sua visualização pelo rato, 1 L de leite integral foi misturado à água.

A Figura 3.1 é uma representação esquemática do LAM. Nessa, as linhas imaginárias que dividem a piscina em quatro quadrantes e a posição da plataforma no centro de um deles podem ser observadas. Também se nota um círculo imaginário de 30 cm de diâmetro denominado contador sobre o centro de cada quadrante. O contador é concêntrico à plataforma no quadrante crítico e às posições hipotéticas da plataforma nos demais quadrantes.

O LAM ficou dentro de uma sala exclusiva que tinha em suas paredes pistas visuais grandes e distintas para o animal. Uma câmara digital foi fixada no alto da sala para filmagem das sessões e a imagem transferida por cabos para um computador que se encontrava do lado de fora.



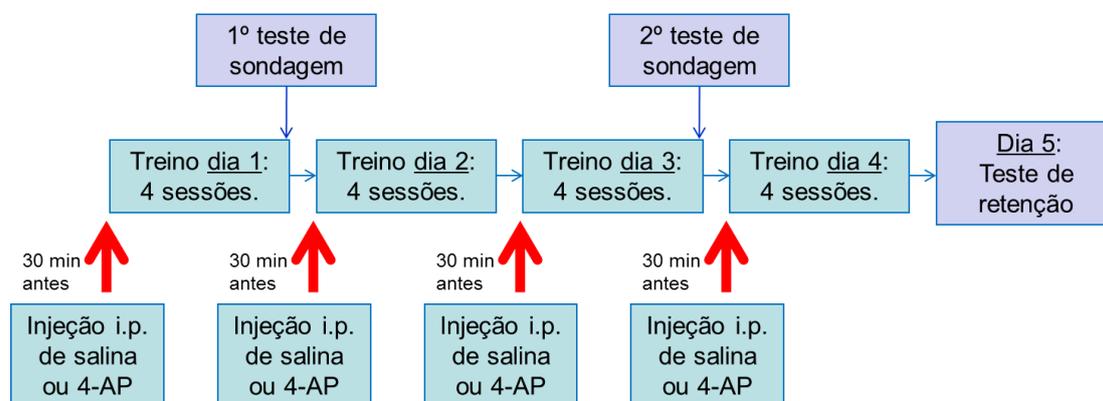
**Figura 3.1.** Representação esquemática (vista aérea) do labirinto aquático de Morris. A piscina é dividida em 4 quadrantes iguais. Apenas no centro de um deles existe uma plataforma submersa (1,5 cm da superfície) representada por um círculo preto. O quadrante que contém a plataforma é denominado quadrante crítico. Cada quadrante possui em seu centro um contador (círculos pontilhados) numerado de 1 a 4. O labirinto fica em uma sala exclusiva que possui em suas paredes pistas visuais distintas para a orientação dos ratos. N, S, L e O são os pontos cardeais norte, sul, leste e oeste, respectivamente.

#### 4.2.1. Injeção intraperitoneal (i.p.) e teste no LAM

O protocolo experimental descrito nesta seção é baseado no trabalho de Stackman *et al.* (2002) e Keblesh *et al.* (2009). Esse procedimento teve como objetivo verificar se o bloqueio de canais  $K_v$  pela 4-AP injetada intraperitonealmente influencia a aprendizagem e a formação de memória no LAM. Inicialmente fizemos um piloto usando 5 mg/kg de 4-AP, mas como os animais tiveram crises convulsivas, reduzimos esse valor para 0,1 e 0,5 mg/kg. Outra razão para escolha de 0,1 mg/kg foi que Haroutunian *et al.* (1985) observaram melhora na retenção da resposta de esQUIVA inibitória em ratos que receberam essa quantidade também por via i.p.

Antes de serem colocados no LAM, os ratos foram habituados ao manuseio (item 4.1) seguido de uma injeção i.p. de salina (0,2 mL) diariamente por 3 dias. Cada animal foi submetido ao treino espacial que consistiu em 16 sessões (quatro por dia) nas quais a plataforma foi sempre deixada no centro do mesmo quadrante, além de manter a mesma

posição em relação às pistas visuais da sala. Em cada sessão, o animal foi colocado na piscina a partir de um dos quatro pontos cardeais com o focinho voltado para a parede da piscina e teve 90 s para nadar até a plataforma. A ordem dos pontos de início de cada tentativa variou aleatoriamente para cada roedor todos os dias. Uma vez alcançada a plataforma, o rato permaneceu nela por 45 s e então retornou para sua gaiola por 10 s até a próxima sessão. Quando o animal não encontrava a plataforma em 90 s, ele era retirado da água e colocado nela pelo experimentador por 45 s. As injeções i.p. de salina (controle) e 4-AP foram aplicadas 30 min antes da primeira sessão de treinamento de cada dia, exceto no dia do teste de retenção (explicado a frente). A Fig. 3.2 apresenta um esquema do procedimento utilizado para injeção i.p.



**Figura 3.2.** Esquema do procedimento no labirinto aquático de Morris quando da injeção intraperitoneal (i.p.). Tempo das sessões foram: treino – 90 s; teste de sondagem – 45 s; e teste de retenção – 90 s. Todas as sessões ocorriam entre 9 e 12 h da manhã. Salina era solução estéril de NaCl 0,9 % e o volume injetado foi de 0,2 mL. 4-aminopiridina (4-AP) era dissolvido em salina (0,2 mL) em duas quantidades: 0,1 ou 0,5 mg/kg.

Testes de memória espacial ocorreram nos 1º, 3º e 5º dias. Logo após a 4ª e a 12ª sessões de treino, um teste de sondagem foi realizado no qual foi permitido que cada rato nadasse livremente por 45 s na piscina com a plataforma retirada. Vinte e quatro horas depois da última sessão de treino (16ª), cada animal foi submetido ao teste de retenção: nado livre sem plataforma por 90 s (Fig. 3.2). Todas as sessões ocorreram entre 9:00 e 12:00 horas.

O comportamento de cada indivíduo durante as sessões de treino e teste foram filmados e gravados em um computador. As imagens foram assistidas por um pesquisador (cinte dos

tratamentos dos animais) que quantificou, com o auxílio de um cronômetro, os seguintes parâmetros por sessão:

- a. Latência de escape nas sessões de treino: tempo em segundos entre a liberação do rato na piscina e sua subida na plataforma (quando o animal não encontrou a plataforma em uma sessão, sua latência de escape foi considerada com sendo 90 s);
- b. Permanência no quadrante crítico (PQC) nos testes de sondagem e de retenção: tempo em segundos que o animal permaneceu no quadrante crítico dividido pelo tempo total da sessão; e
- c. Taxa de procura (TP) do quadrante crítico nos testes de sondagem e de retenção: número de cruzamentos da borda (de fora para dentro) do contador do quadrante crítico dividido pelo número total de cruzamentos de todos os contadores.

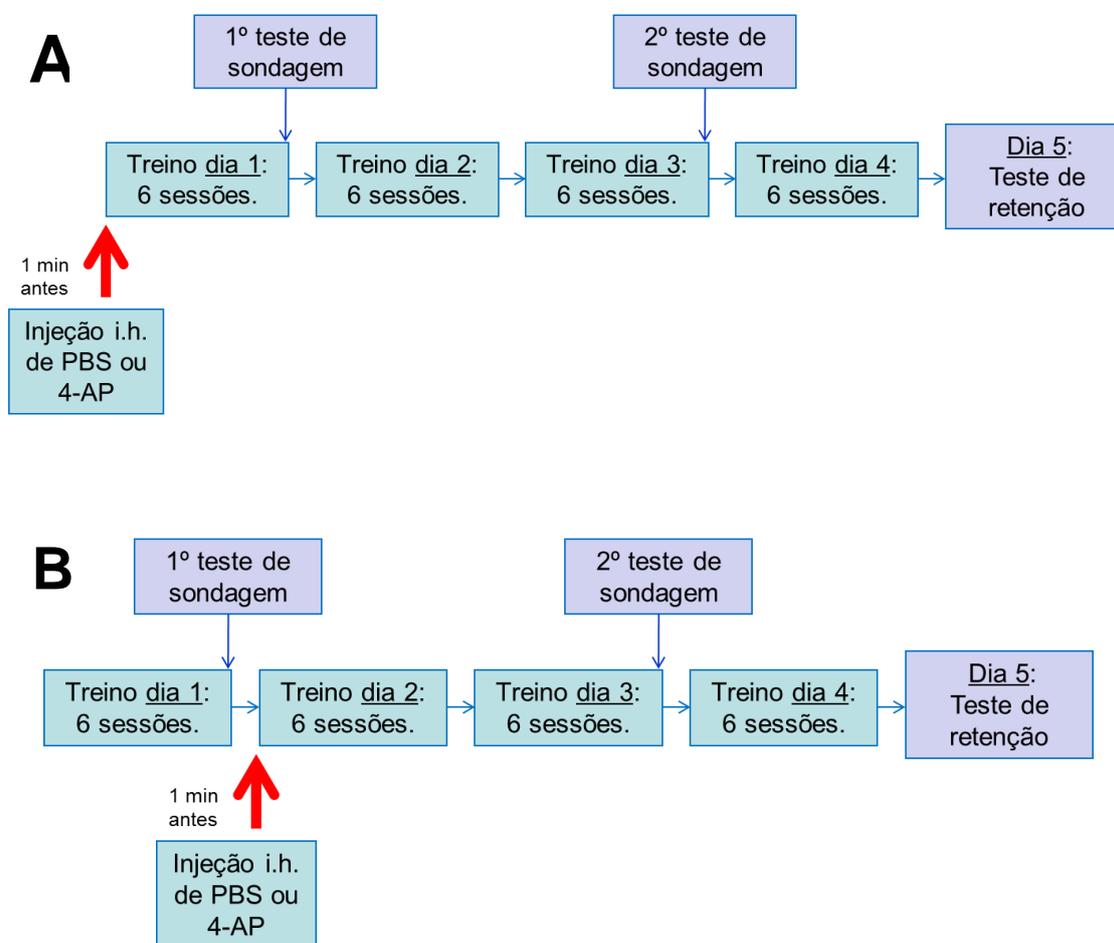
Os animais foram divididos em três grupos (n = 7 cada):

- Grupo controle-i.p.: os ratos desse grupo receberam injeção i.p. de salina (0,2 mL) 30 min antes da primeira sessão de treino do dia;
- Grupo 4-AP0,1-i.p.: os ratos desse grupo receberam intraperitonealmente 0,1 mg/kg de 4-AP (em 0,2 mL de salina) 30 min antes da primeira sessão de treino do dia.
- Grupo 4-AP0,5-i.p.: os ratos desse grupo receberam intraperitonealmente 0,5 mg/kg de 4-AP (em 0,2 mL de salina) 30 min antes da primeira sessão de treino do dia.

#### **4.2.2. Injeção intrahipocampal (i.h.) de 4-AP e teste no LAM**

Uma semana antes de serem submetidos ao labirinto, os ratos sofreram uma cirurgia para implante de cânulas-guia bilateralmente na formação hipocampal (ver item 2). O procedimento usado no LAM para injeção i.h. foi semelhante ao da i.p. relatado no item anterior com três diferenças: (1<sup>a</sup>) a já mencionada administração bilateral da 4-AP na região CA1 da formação hipocampal; (2<sup>a</sup>) a injeção aconteceu uma única vez ao longo do experimento; e (3<sup>a</sup>) ocorreram

6 sessões de treinamento por dia. Essa única injeção ocorreu imediatamente antes da primeira sessão do primeiro dia, ou do segundo dia (ver esquema na Fig. 3.3). Não houve alteração do tempo das sessões e os testes de sondagem e de retenção ocorreram seguindo o mesmo protocolo descrito anteriormente.



**Figura 3.3.** Esquema do procedimento no labirinto aquático de Morris quando da injeção intrahipocampal dorsal (i.h.). A, injeção no primeiro dia. B, injeção no segundo dia. Tempo das sessões foram: treino – 90 s; teste de sondagem – 45 s; e teste de retenção – 90 s. Todas as sessões ocorriam entre 9 e 12 hs da manhã. O controle foi tampão PBS, pH 7,4, autoclavado e o volume injetado foi de 0,2  $\mu$ L/lado (região de CA1). 4-aminopiridina (4-AP) foi dissolvido em PBS para uma concentração final de 1mM e injetado 0,2  $\mu$ L/lado.

Foram constituídos os seguintes grupos:

- Grupo 1dPBS-i.h.: os ratos desse grupo receberam injeção i.h. de PBS (0,2  $\mu$ L/lado) 1 min antes da primeira sessão de treino do primeiro dia.

- Grupo 1d4AP-i.h.: os ratos desse grupo receberam injeção i.h. de 4-AP (1mM; 0,2 µL/lado) 1 min antes da primeira sessão de treino do primeiro dia
- Grupo 2dPBS-i.h.: os ratos desse grupo receberam injeção i.h. de PBS (0,2 µL/lado) 1 min antes da primeira sessão de treino do segundo dia.
- Grupo 2d4AP-i.h.: os ratos desse grupo receberam injeção i.h. de 4-AP (1mM; 0,2 µL/lado) 1 min antes da primeira sessão de treino do segundo dia.

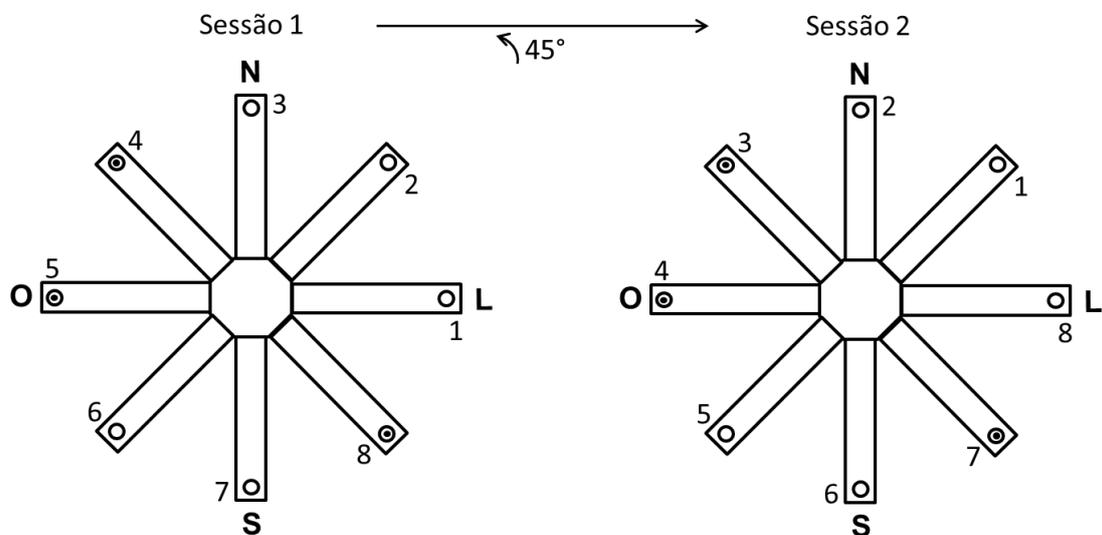
### **4.3. Labirinto radial de oito braços (LR)**

O labirinto radial de oito braços consiste em uma pequena plataforma octogonal central (20 cm entre vértices diametralmente opostos) de onde se originam oito braços (5 cm de largura e 60 cm de extensão) com pequena parede (2 cm) contornando seus limites, exceto no encontro do braço com a plataforma quando a parede passa a ter 20 cm de altura (ver esquema na Fig. 3.4). O assoalho do aparelho é preto e as paredes são feitas de acrílico transparente. Na extremidade de cada braço que parte da plataforma central existe uma porta preta que abre e fecha usando o sistema guilhotina. Todo o conjunto fica suspenso a 40 cm do chão. O equipamento é colocado em uma sala com marcações bem visíveis e distintas para os ratos em cada parede, de modo a servirem como pistas externas ao labirinto permitindo a orientação deles. Uma câmera digital no topo da sala captura o comportamento dos ratos e transfere as imagens para um computador na sala ao lado por meio de cabos conectores.

#### **4.3.1. Injeção i.h. e teste no LR**

Os procedimentos adotados neste item (Fig. 3.5) foram baseados nos trabalhos de Campos e Saito (1999) e Mpari *et al.* (2008). Os ratos receberam o implante bilateral de cânulas-guia na região dorsal da formação hipocampal (ver item 2) e tiveram uma semana para se recuperarem do procedimento. Antes de serem submetidos ao labirinto, eles tiveram o fornecimento de ração diminuído com o objetivo de reduzirem suas massas corpóreas em 15 %. Uma vez isso alcançado, cada animal (com jejum de 22 horas) foi colocado no centro do labirinto, tendo acesso a todos os braços (todas as portas estavam abertas). No início de cada um (local de encaixe do braço à plataforma), foi colocado um pote redondo (3,4 cm de diâmetro e 1,3 cm de altura) azul claro com cerca de 40 mg (0,19 Kcal) de chocolate granulado (Dr. Oetker, Brasil). O

animal foi retirado do labirinto (encerramento da sessão) depois de ter comido todo o chocolate ou ter passado 10 min. O roedor ainda passou por outras 4 sessões no dia (intervalo de 3 min), seguindo o mesmo procedimento. Ao voltar para sua gaiola, o animal teve acesso à ração *ad libitum* por duas horas. Depois desse tempo, foi novamente privado de alimento até o dia seguinte. Essas sessões (5 por dia) foram repetidas por mais dois dias seguidos (24 horas de intervalo), porém, na segunda vez, o chocolate foi colocado no meio do braço e, na terceira, o chocolate esteve no final dos braços. Seguiu-se mais um dia de experimento (5 sessões) no qual o chocolate também foi colocado na extremidade distal do braço, porém, quando o rato entrava nele, a porta era fechada prendendo-o. Ela só era aberta depois do roedor ter comido todo o chocolate. Apenas os ratos que conseguiam recolher o chocolate de todos os braços em menos de 7 min no quarto dia seguiram para próxima fase do teste.



**Figura 3.4.** Representação esquemática do labirinto radial de 8 braços. Os braços foram numerados de 1 a 8. Os círculos abertos representam os potes circulares onde foi colocado o chocolate granulado (círculos fechados). O esquema apresenta uma combinação de três posições com chocolate usado para um rato durante a fase de treino (seis sessões diárias de 10 min por 3 dias). Apesar de a cada sessão o labirinto ser girado 45° em torno de seu eixo central, as posições nas quais o chocolate era colocado permaneciam as mesmas. O labirinto fica em uma sala exclusiva que possui em suas paredes pistas visuais distintas para a orientação dos ratos. N, S, L e O são os pontos cardeais norte, sul, leste e oeste, respectivamente.

Após essa familiarização dos ratos ao labirinto, cada indivíduo foi submetido a seis sessões por dia, com 3 min de intervalo entre elas, durante 3 dias consecutivos (fase de treino). Os recipientes azuis foram colocados no final de cada braço, mas agora apenas três possuíam chocolate. Para cada rato, um padrão diferente de apenas três das oito posições em relação às pistas visuais da parede continham chocolate. Esse padrão permaneceu o mesmo para um dado animal ao longo de todos os dias. Ao final de cada sessão o LR foi girado 45°, mas o chocolate foi apresentado na próxima reexposição nas mesmas 3 posições em relação às pistas externas ao labirinto. Portanto, o alimento era associado à posição e não ao braço (Fig 3.4). Em nenhuma das combinações utilizadas, três posições consecutivas continham chocolate.

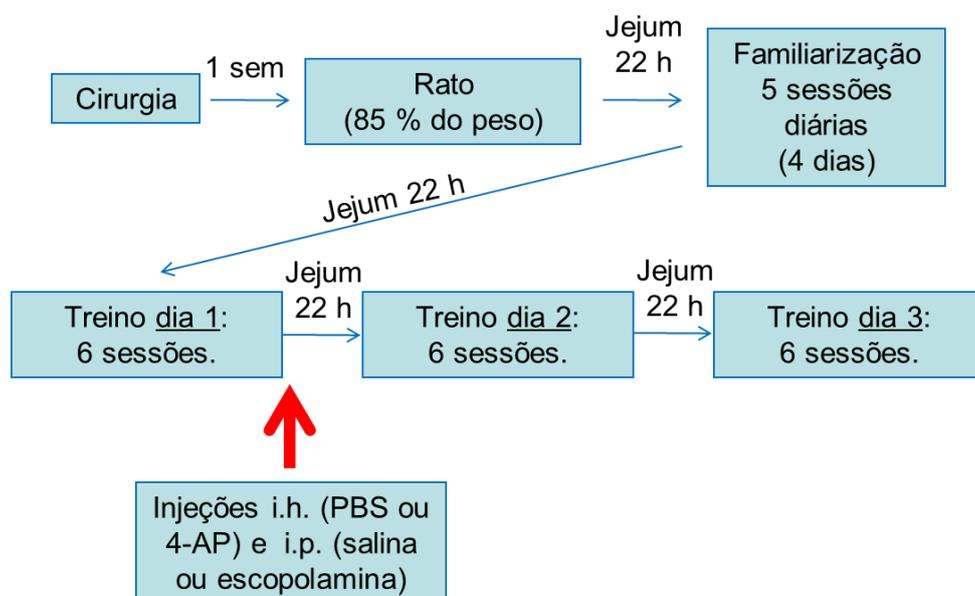
No início de cada sessão, o rato foi posicionado no centro do labirinto com todas as portas fechadas. Após 10 s, elas foram abertas e quando o animal entrava em um braço, sua porta foi fechada. Caso o braço tivesse chocolate, a porta foi aberta assim que o roedor terminasse de comer o chocolate. Não tendo chocolate, o rato ficava preso por 30 s. Caso o rato voltasse a entrar em um braço cujo chocolate já tivesse sido retirado, ele permanecia preso por 30 s. A sessão terminava com 10 min ou quando todo o chocolate tivesse sido consumido. Todos os experimentos ocorreram entre 9:00 e 12:00 horas. O LR foi limpo entre as sessões. Os potes azuis foram guardados junto com o chocolate granulado de um dia para o outro.

As injeções i.h. (PBS ou 4-AP) e i.p. (salina ou escopolamina) foram administradas logo após a última sessão do primeiro dia, baseando-se no procedimento de Mpari *et al.* (2008). O esquema do procedimento no LR é apresentado na Fig. 3.5. Os ratos foram divididos em grupos caracterizados pelas substâncias que receberam:

- Grupo PBS (controle): injeção i.h. de PBS e i.p. de salina (item 3);
- Grupo escopo: injeção i.h. de PBS e i.p. de escopolamina (0,5 mg/kg – item 3);
- Grupo 4-AP: injeção i.h. de 4-AP (1mM – item 3) e i.p. de salina.

O desempenho dos animais nas sessões de treino foi avaliado por um pesquisador (ciente do tratamento dos animais) com base em dois parâmetros: erros de memória de referência e erros de memória operacional. A primeira entrada em um braço que nunca teve alimento foi

considerada como um erro de memória de referência, enquanto a reentrada em braços onde a ração já foi retirada (ou que nunca tiveram alimento) foi considerada como erro de memória operacional. Foi considerado que o animal entrou em um braço quando todas as suas quatro patas estiverem simultaneamente presentes no dado braço. A média dos erros das sessões do primeiro dia (Dia 1) de um dado grupo foi usada como referência para normalizar os resultados das sessões de cada rato do grupo nos três dias de treino (Dia 1, Dia 2 e Dia 3). Esse procedimento gerou os índices de erro de memória operacional (IEMO) e de referência (IEMR) usados para elaboração dos gráficos que apresentam média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).



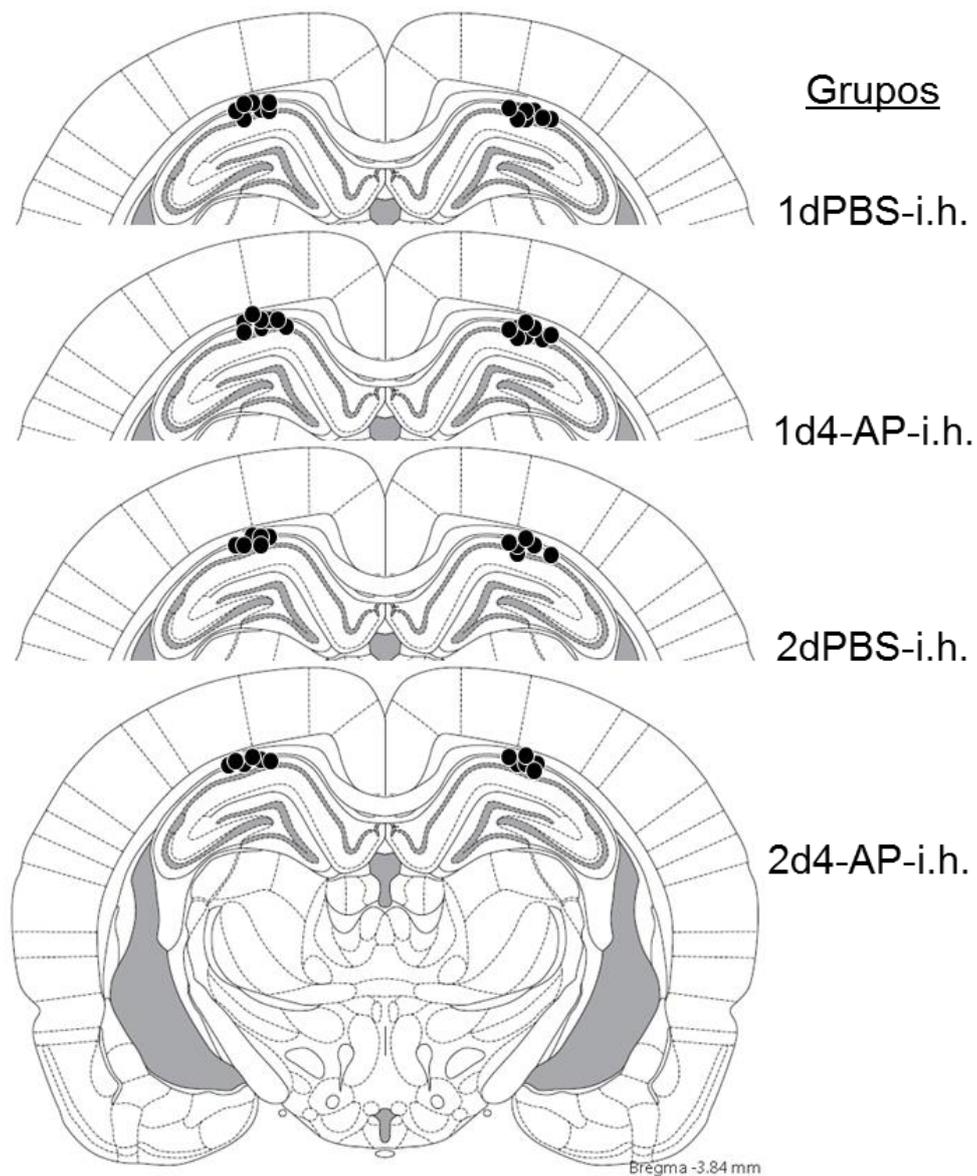
**Figura 3.5.** Esquema do procedimento no labirinto radial de oito braços. Os ratos eram submetidos à cirurgia para implantação de cânulas-guia bilateralmente na região dorsal (CA1) da formação hipocampal. Após 1 semana, os animais eram submetidos a restrição calórica para redução da massa corporal para 85 %. Os animais, sempre em jejum de 22 h, foram submetidos a 5 sessões diárias por 4 dias para familiarização e outras 6 diárias por 3 dias para treino. Na familiarização havia chocolate granulado em todos os braços, e no treino, apenas em três (eram mantidas as mesmas posições a cada reexposição de um dado rato). As injeções intrahipocâmpais (i.h.) de PBS (0,2  $\mu$ L/lado) ou de 4-AP (1mM em 0,2  $\mu$ L de PBS/lado) e intraperitoneais (i.p.) de salina (0,2 mL) ou de escopolamina (0,5 mg/kg em 0,2 mL de salina) foram realizadas ao término da última sessão do primeiro dia de treino. As sessões se encerravam quando o animal consumia todo o chocolate até o limite de 10 min. O intervalo entre as sessões no mesmo dia foi de 3 min. Todas as sessões ocorreram entre 9 e 12 hs da manhã.

## **5. Análise histológica**

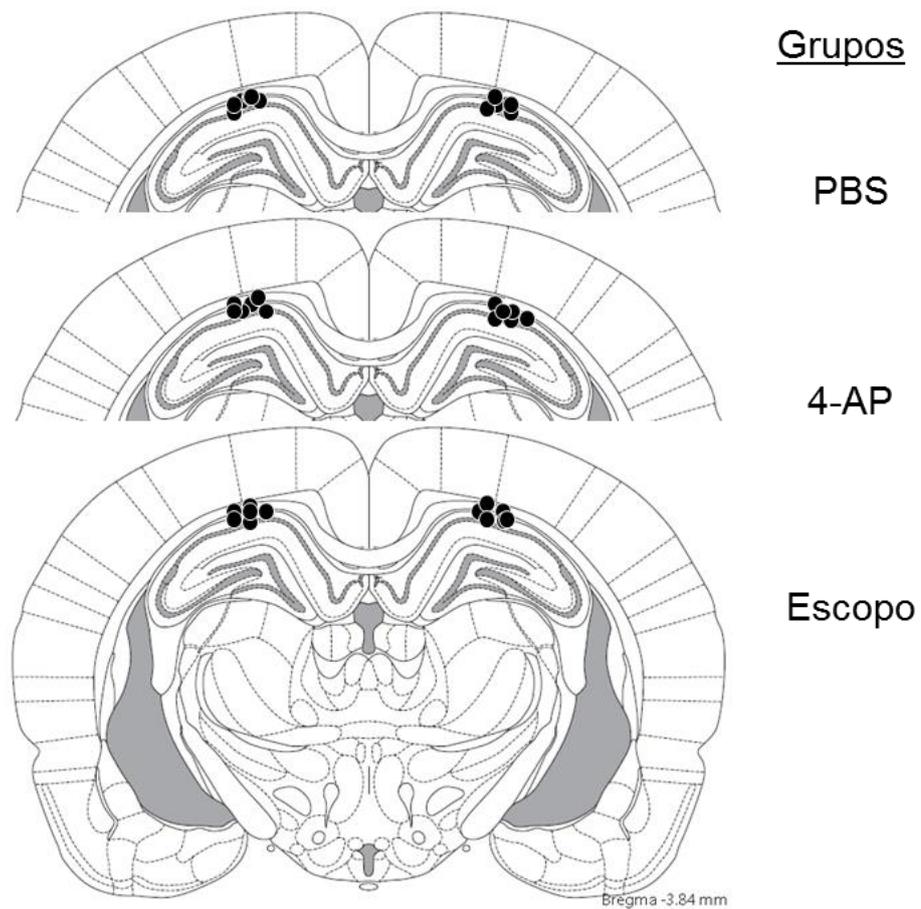
Após os testes comportamentais, cada animal foi profundamente anestesiado com tiopental sódico 120 mg/kg (Abbott). Com o rato anestesiado, sua caixa torácica foi aberta com auxílio de uma tesoura e a aorta canulada. Em seguida o rato foi perfundido com 75 mL de NaCl 0,9% e, na sequência, com 120 mL de formol 10% (v/v) em NaCl 0,9%. O cérebro foi retirado e colocado em fixador (formol 10% (v/v) em NaCl 0,9%) por uma noite. Em seguida, os cérebros foram cortados em um micrótomo de vibração (vibrátomo, Leica – VT1000S) em fatias de 200 µm na região lesada pelas cânulas-guia. Essas secções foram colocadas em uma placa de Petri com NaCl 0,9% e levadas para uma lupa para verificação da posição da ponta das cânulas na formação hipocampal. Apenas ratos cujas pontas das duas cânulas-guia estavam sobre a região CA1 da formação hipocampal tiveram seus resultados nos testes comportamentais analisados (Fig 3.6 e 3.7).

## **6. Análise estatística**

Para a análise estatística dos resultados envolvendo diferentes tratamentos, empregou-se a análise de variância (ANOVA) de uma via. Para avaliação das diferenças entre os tratamentos farmacológicos ao longo do tempo no LAM, utilizou-se ANOVA de duas vias, onde um fator foi o tratamento farmacológico e o outro fator, o tempo (dias) (D'Hooge e De Deyn, 2001). A análise considerou as medidas repetidas apenas quando elas ocorreram (ver item 7 do material e métodos do capítulo 2 para mais detalhes). Quando a ANOVA indicou haver diferenças significativas, realizou-se o teste de Tukey para comparações múltiplas. Para análise dos dados do LR se utilizou a análise de variância multivariada (MANOVA), no qual os fatores foram o tratamento e os dias de treino e as variáveis dependentes foram o IEMR e o IEMO. A análise também considerou as medidas repetidas apenas quando elas ocorreram. Quando essa revelava fatores com diferenças significativas, era seguida por ANOVAs de uma via para o fator significativo. Uma vez essa também significativa, realizou-se o teste de Tukey. Foi considerado um nível de significância de 0,05. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa R, versão 2.15.0 e os gráficos gerados no programa Excel.



**Figura 3.6.** Esquema representativo de cortes coronais de cérebro dos ratos dos diferentes grupos de ratos que foram submetidos ao LAM. As pontas das cânulas-guia (círculos pretos) dos ratos usados nas análises estavam na região dorsal da formação hipocampal (distância do bregma de -3,84 mm) de acordo com as imagens do atlas de Paxinos e Watson (2007).



**Figura 3.7.** Esquema representativo de cortes coronais de cérebro dos ratos dos diferentes grupos de ratos que foram submetidos ao LR. As pontas das cânulas-guia (círculos pretos) dos ratos usados nas análises estavam na região dorsal da formação hipocampal (distância do bregma de -3,84 mm) de acordo com as imagens do atlas de Paxinos e Watson (2007).

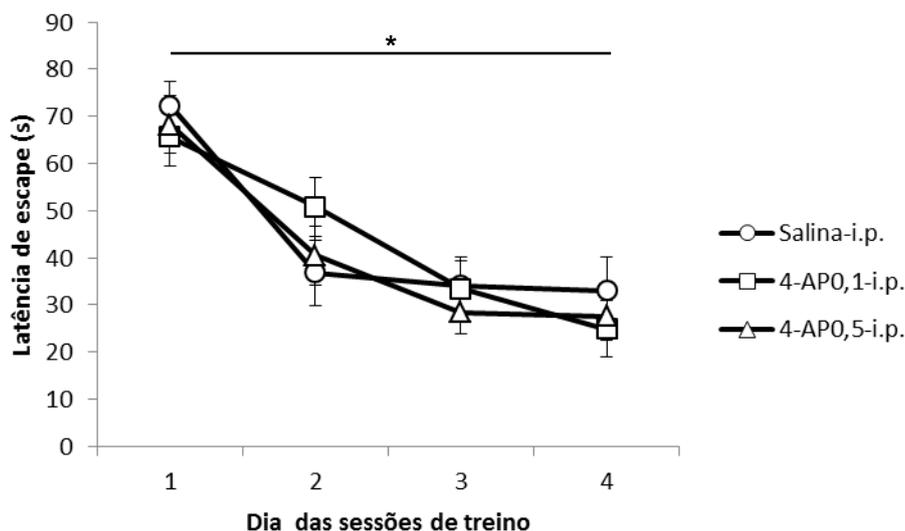
## RESULTADOS

Relatos do uso de 4-AP no LAM ou no LR são escassos. Portanto, os resultados apresentados nessa sessão são uma importante contribuição à literatura científica. Os experimentos tentam responder a seguinte pergunta: os canais  $K_v$  influenciam o aprendizado que ocorre nesses testes comportamentais?

### 1. Teste no LAM com injeção i.p.

A administração de 4-AP por via i.p. não alterou o desempenho dos ratos em relação àqueles que receberam salina (Fig. 3.8). A única alteração observada para todos os grupos foi a redução das latências à medida que os animais foram reapresentados ao LAM (Fig. 3.8). A ANOVA de duas vias não apontou diferença entre os tratamentos ( $F_{(2,18)} = 1,139$ ,  $p = 0,342$ ) e nem interação entre os tratamentos e os dias de sessões de treino ( $F_{(6,54)} = 1,206$ ,  $p = 0,317$ ). Porém, essa análise estatística mostrou diferenças significativas entre os dias de treino ( $F_{(3,54)} = 31,251$ ;  $p < 0,001$ ). Na Tabela 3.1 constam as médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM) das latências de escape das quatro sessões diárias no LAM para administração i.p. de salina ou 4-AP (0,1 ou 0,5 mg/kg). Essas injeções aconteceram 30 min antes da 1ª sessão de cada dia de treino. Poderemos notar que houve uma redução de 37,9% (em média) da latência de escape no segundo dia em relação ao primeiro.

A injeção de 4-AP (0,1 ou 0,5 mg/kg) também não influenciou a resposta dos ratos nos testes de sondagem, como pode ser observado na Fig. 3.9. Os valores (média  $\pm$  EPM) de PQC e TP para os testes de sondagem são apresentados na Tab. 3.2. A ANOVA de duas vias não indicou diferenças significativas entre os tratamentos e nem para a interação entre tratamento e dia do teste: para fator tratamento,  $F_{(2,18)} = 0,074$ ,  $p = 0,929$  (PQC) e  $F_{(2,18)} = 0,098$ ,  $p = 0,907$  (TP); e para interação  $F_{(2,18)} = 0,492$ ,  $p = 0,620$  (PQC) e  $F_{(2,18)} = 0,651$ ,  $p = 0,533$  (TP). Por outro lado, os aumentos de 39,7 % (em média) na PCT e de 70,3 % (em média) na TP do 1º para o 2º teste de sondagem foram significativos ( $p < 0,05$ , valores de F na Fig 3.9). É interessante notar que os valores médios da PQC ( $0,24 \pm 0,05$ ) e da TP ( $0,25 \pm 0,07$ ) no primeiro dia do teste são os que seriam esperados para animais que estão nadando de forma aleatória pelo labirinto aquático (0,25).

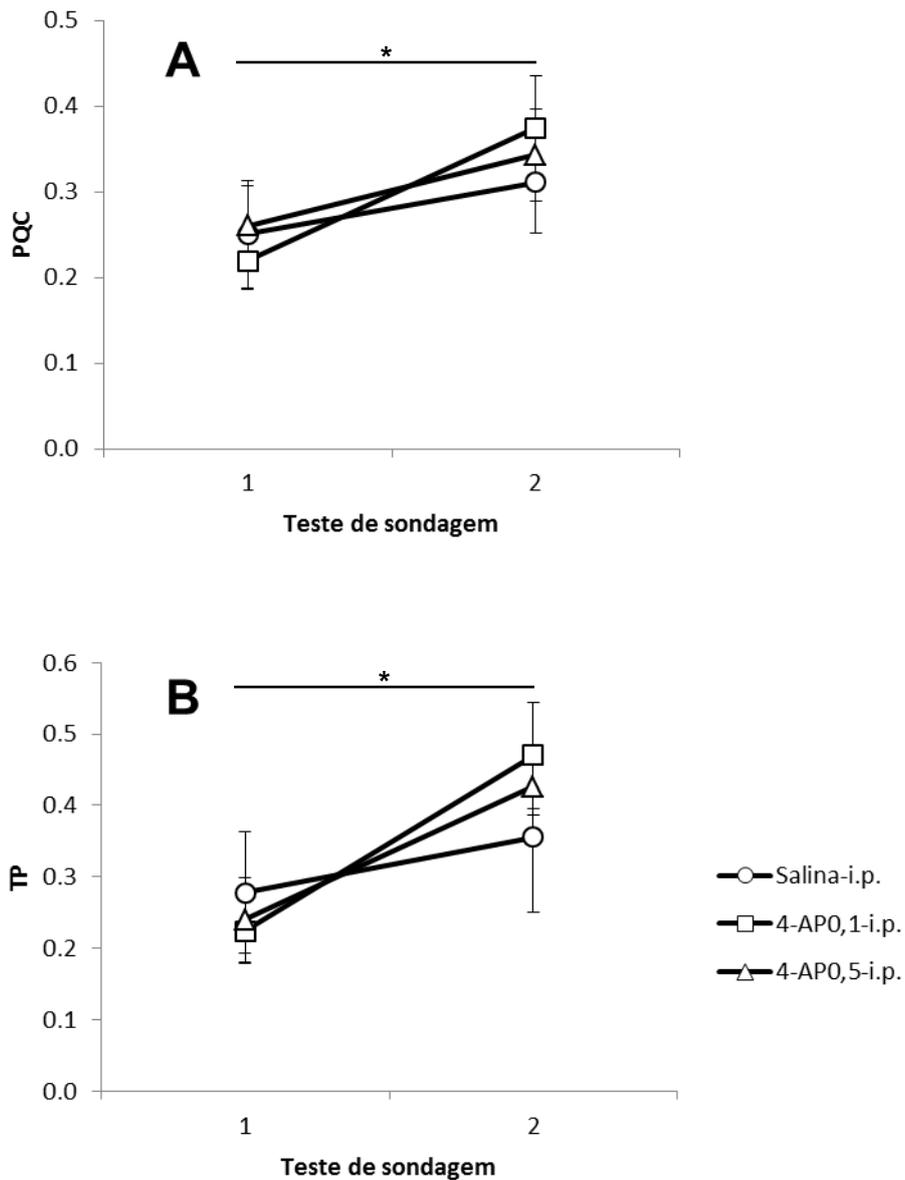


**Figura 3.8.** Média ( $\pm$  EPM) das latências de escape dos ratos que receberam injeção intraperitoneal (i.p.). As injeções de salina (salina-i.p.), 0,1 (4-AP0,1-i.p.) ou 0,5 mg/kg (4-AP0,5-i.p.) de 4-aminopiridina ocorreram 30 min antes da 1ª sessão de treino do dia. Foram quatro sessões diárias em 4 dias de treino. As diferenças entre o 2º, 3º e 4º dias de treino foram significativas em relação ao 1º (\*  $p < 0,001$ , teste de Tukey).  $n = 7$  para todos os tratamentos.

**Tabela 3.1.** Média ( $\pm$  EPM) das latências de escape das quatro sessões diárias de cada dia de treino no LAM após injeções intraperitoneais (i.p.)

Dia de treino	Latências de escape (s)		
	Salina i.p.	4-AP i.p.	
		0,1 mg/kg	0,5 mg/kg
1	72 $\pm$ 5	66 $\pm$ 6	68 $\pm$ 6
2	37 $\pm$ 7***	51 $\pm$ 6***	40 $\pm$ 6***
3	34 $\pm$ 6***	33 $\pm$ 6***	28 $\pm$ 5***
4	33 $\pm$ 7***	25 $\pm$ 6***	28 $\pm$ 5***

As injeções foram ministradas 30 min antes da 1ª sessão de cada dia. LAM: labirinto aquático de Morris. 4-AP: 4-aminopiridina. EPM: erro padrão da média.\*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao 1º dia (teste de Tukey).  $n = 7$  para todos os tratamentos.



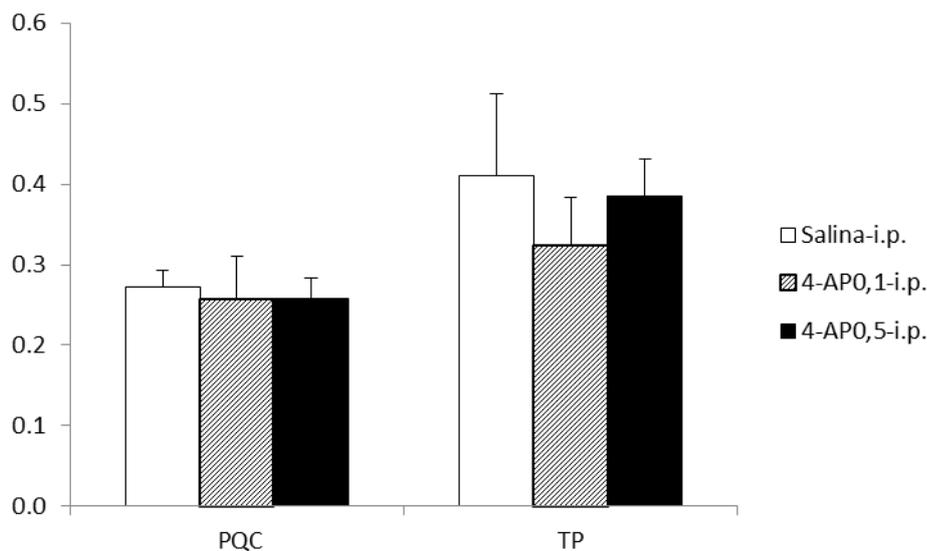
**Figura 3.9.** Resposta nos testes de sondagem no LAM dos ratos que receberam injeção intraperitoneal (i.p.). A, média ( $\pm$  EPM) da permanência no quadrante crítico (PQC), não tendo diferenças entre os grupos, mais sim entre o dia dos testes (\*ANOVA de duas vias,  $F_{1,18} = 5,853$ ,  $p < 0,05$ ). B, média ( $\pm$  EPM) da taxa de procura (TP) do quadrante crítico, não tendo diferenças entre os grupos, mas sim entre o dia dos testes (\*ANOVA de duas vias,  $F_{1,18} = 7,682$ ,  $p < 0,05$ ). As injeções de salina (salina-i.p.), 0,1 (4-AP0,1-i.p.) ou 0,5 mg/kg (4-AP0,5-i.p.) de 4-aminopiridina ocorreram 30 min antes da 1ª sessão de treino dos 4 dias de treino. Os testes de sondagem (45 s de duração) ocorreram ao final do 1º e 3º dias de treino e sem a presença da plataforma. LAM: labirinto aquático de Morris. EPM: erro padrão da média.  $n = 7$  para todos os tratamentos.

Com relação ao teste de retenção (Fig. 3.10), a 4-AP i.p. (0,1 e 0,5 mg/kg) também não teve efeito na resposta dos ratos, quando comparado ao controle (salina i.p.). As PQC (média  $\pm$  EPM) nesse teste foram  $0,27 \pm 0,02$  (salina),  $0,26 \pm 0,05$  (4-AP - 0,1 mg/kg) e  $0,26 \pm 0,03$  (4-AP - 0,5 mg/kg), sendo as diferenças não significativas ( $F_{(2,17)} = 0,062$ ,  $p = 0,940$ , ANOVA de uma via). As médias ( $\pm$  EPM) da TP para os grupos salina-i.p., 4-AP0,1-i.p. e 4-AP0,5-i.p. foram  $0,41 \pm 0,10$ ,  $0,32 \pm 0,06$  e  $0,38 \pm 0,05$ , respectivamente, e elas não foram significativamente diferentes ( $F_{(2,17)} = 0,363$ ,  $p = 0,701$ , ANOVA de uma via). O  $n$  foi igual a 7 para salina-i.p. e 4-AP0,1-i.p. e igual a 6 para 4-AP0,5-i.p..

**Tabela 3.2.** Média ( $\pm$  EPM) da permanência no quadrante crítico (PQC) e taxa de procura (TP) do mesmo durante os testes de sondagem no LAM por ratos que receberam injeção intraperitoneal (i.p.).

Teste de sondagem	Salina i.p.	4-AP i.p.	
		0,1 mg/kg	0,5 mg/kg
PQC			
1	$0,25 \pm 0,06$	$0,22 \pm 0,03$	$0,26 \pm 0,05$
2	$0,31 \pm 0,06^*$	$0,37 \pm 0,06^*$	$0,34 \pm 0,05^*$
TP			
1	$0,28 \pm 0,09$	$0,22 \pm 0,05$	$0,24 \pm 0,06$
2	$0,36 \pm 0,11^*$	$0,47 \pm 0,07^*$	$0,43 \pm 0,04^*$

As injeções foram ministradas 30 min antes da 1ª sessão dos 4 dias de treino. Os testes de sondagem ocorreram ao final do 1º e 3º dias de treino e sem a presença da plataforma. LAM: labirinto aquático de Morris. 4-AP: 4-aminopiridina. EPM: erro padrão da média.\*  $p < 0,05$  em relação ao 1º dia (ANOVA de duas vias).  $n = 7$  para todos os tratamentos.

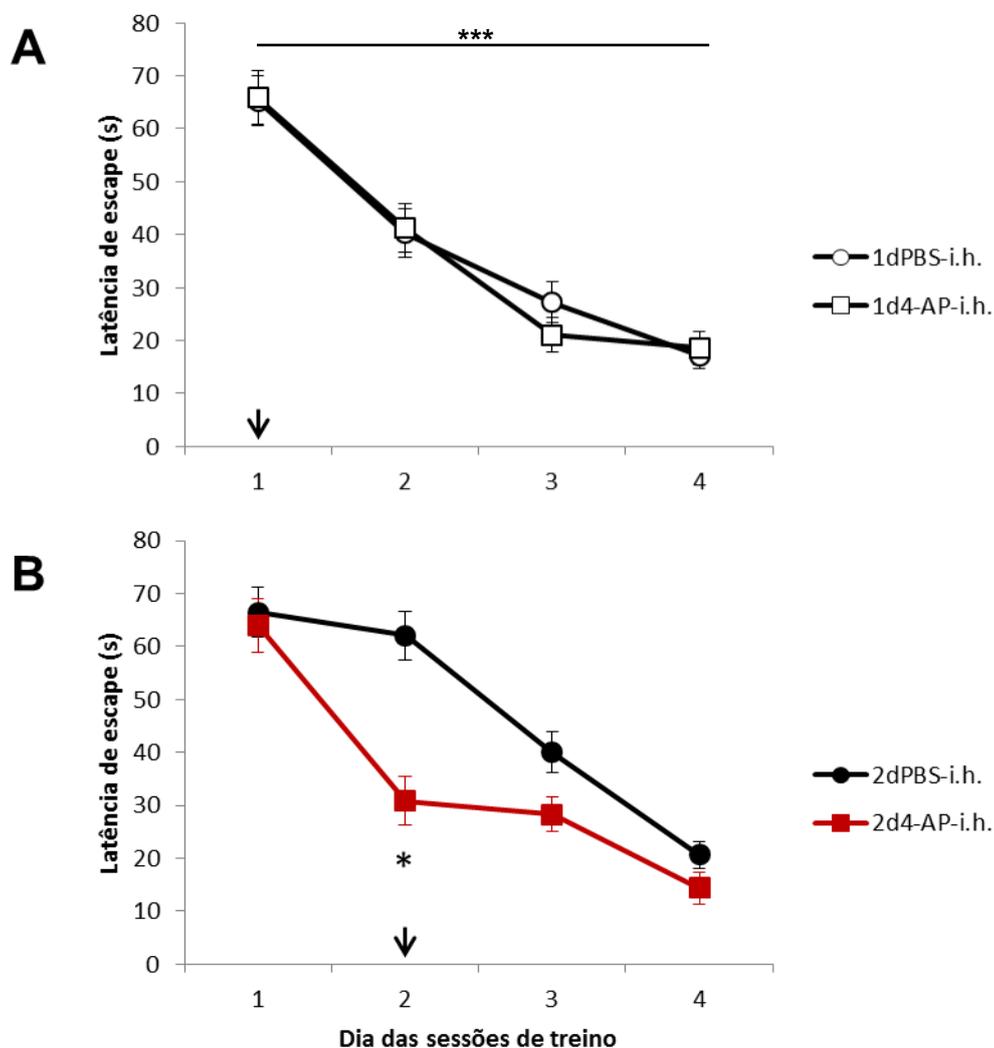


**Figura 3.10.** Média ( $\pm$  EPM) da permanência no quadrante crítico (PQC) e taxa de procura (TP) do mesmo durante o teste de retenção no LAM por ratos que receberam injeção intraperitoneal (i.p.). Esse teste foi realizado 24 horas após a última sessão de treino e ocorreu sem a presença da plataforma. As injeções de salina (salina-i.p.), 0,1 (4-AP0,1-i.p.) ou 0,5 mg/kg (4-AP0,5-i.p.) de 4-aminopiridina ocorreram 30 min antes da 1ª sessão de treino dos 4 dias de treino. LAM: labirinto aquático de Morris. EPM: erro padrão da média.  $n = 7$  para salina-i.p. e 4-AP0,1-i.p..  $n = 6$  para 4-AP0,5-i.p..

## 2. Teste no LAM com injeção i.h.

Quando administrada no primeiro dia de treino, a microinjeção i.h. de 1mM de 4-AP não teve efeito no teste do LAM. A Fig. 3.11A apresenta as médias ( $\pm$  EPM) das 6 sessões de cada dia de treino nos ratos que receberam injeção i.h. de PBS (1dPBS-i.h.,  $n = 8$ ) ou 4-AP (1d4-AP-i.h.,  $n = 8$ ) antes da primeira sessão do 1º dia. Há uma clara redução do tempo que os animais levam para achar a plataforma ao longo dos dias, confirmada pela ANOVA de duas vias ( $F_{(3,42)} = 48,230$ ,  $p < 0,001$ ). As diferenças foram significativas tanto entre os dias 1 e 2 de treino (redução média de 37,8 %,  $p < 0,001$ , teste de Tukey), quanto entre os dias 2 e 3 (redução média de 25,4%,  $p < 0,01$ , teste de Tukey). A ANOVA de duas vias não indicou efeito significativo entre os tratamentos farmacológicos ( $F_{(1,14)} = 0,063$ ,  $p = 0,806$ ), nem interação

significativa entre tratamento e os dias de treino ( $F_{(3,42)} = 0,340$ ,  $p = 0,796$ ). Os valores médios das latências de escape se encontram na Tab. 3.3.



**Figura 3.11.** Média ( $\pm$  EPM) das latências de escape dos ratos que receberam injeção intrahipocampal bilateral (i.h.). Cada dia de treino teve 6 sessões de 90 s. A, as microinjeções (seta) de tampão fosfato salino pH 7,4 (PBS) ou 1 mM de 4-aminopiridina (AP) ocorreram imediatamente antes da 1ª sessão do 1º dia de treino (1dPBS-i.h. e 1d4-AP-i.h.,  $n = 8$ ). A ANOVA de duas vias de medidas repetidas indicou efeito significativo somente para o fator dia (\*\*\*)  $F_{(3,42)} = 48,230$ ,  $p < 0,001$ ). B, as microinjeções (seta) de PBS ou 1 mM de 4-AP ocorreram imediatamente antes da 1ª sessão do 2º dia de treino (2dPBS-i.h. e 2d4-AP-i.h.,  $n = 6$ ). A ANOVA de duas vias de medidas repetidas indicou efeito significativo para o fator dia ( $F_{(3,30)} = 38,105$ ,  $p < 0,001$ ) e para a interação tratamento  $\times$  dia ( $F_{(3,30)} = 3,827$ ,  $p < 0,05$ ). O teste de Tukey revelou que essa interação significativa ocorreu no 2º dia (\*  $p < 0,05$ ), dia das microinjeções.

Por outro lado, a administração i.h. de 4-AP (1mM) nos ratos no segundo dia de treino no LAM reduziu a latência de escape das sessões desse dia, quando comparado ao desempenho daqueles que receberam PBS (Fig. 3.11B). A ANOVA de duas vias apontou uma interação entre tratamento farmacológico e os dias de treinamento ( $F_{(3,30)} = 3,827$ ,  $p < 0,05$ ). O teste de Tukey revelou que essa interação significativa ocorreu no 2º dia de treino (\*  $p < 0,05$ ), dia das microinjeções. A análise estatística também indicou efeito significativo entre os dias de treinamento ( $F_{(3,30)} = 38,105$ ,  $p < 0,001$ ), porém esse resultado deve ser considerado com grande reserva, pois, quando existe uma interação significante, a interpretação dos efeitos principais pode conduzir a conclusões errôneas (Zar 1999). Os valores médios das latências de escape se encontram na Tab. 3.3.

**Tabela 3.3.** Média ( $\pm$  EPM) das latências de escape das seis sessões diárias de cada dia de treino no LAM após injeções intrahipocâmpais (i.h.)

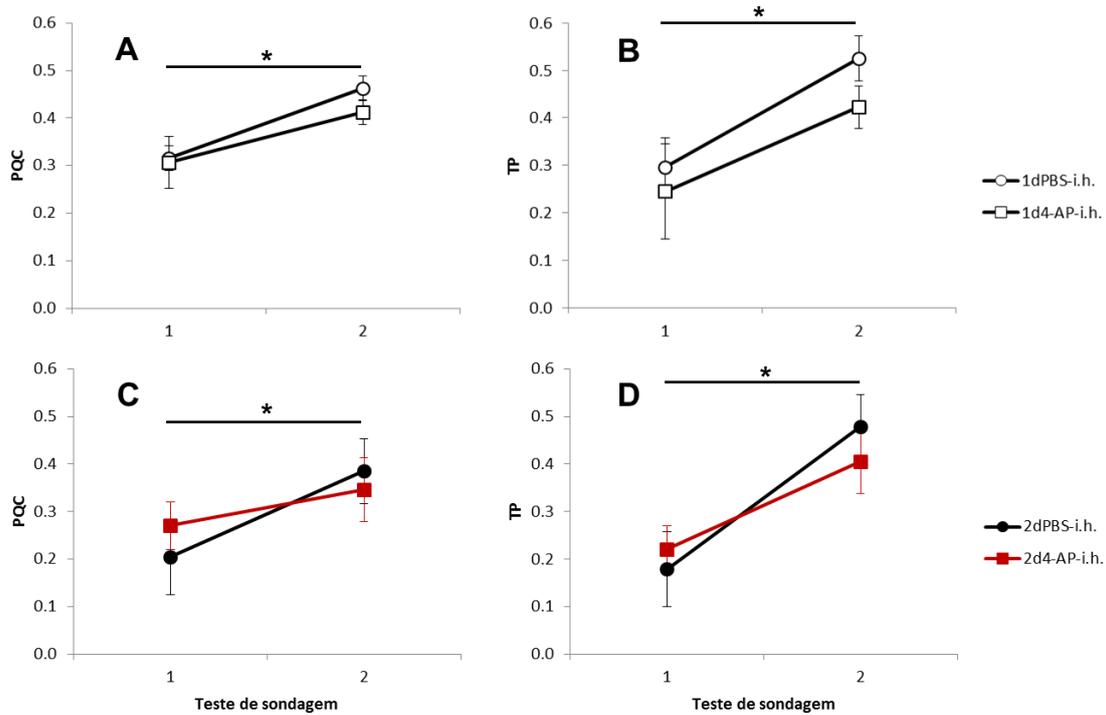
Dia de treino	Latências de escape (s)	
	1dPBS-i.h.	1d4-AP-i.h.
1	65 $\pm$ 5	66 $\pm$ 5
2	40 $\pm$ 5	41 $\pm$ 5
3	27 $\pm$ 4	21 $\pm$ 3
4	17 $\pm$ 3	19 $\pm$ 3
	2dPBS-i.h.	2d4-AP-i.h.
1	66 $\pm$ 5	64 $\pm$ 5
2	62 $\pm$ 5	31 $\pm$ 5*
3	40 $\pm$ 6	28 $\pm$ 5
4	21 $\pm$ 4	14 $\pm$ 2

As microinjeções bilaterais de tampão fosfato salino pH 7,4 (PBS) ou 1 mM de 4-aminopiridina (4-AP) foram ministradas imediatamente antes da 1ª sessão do primeiro (1dPBS-i.h. e 1d4-AP-i.h.,  $n = 8$ ) ou do segundo (2dPBS-i.h. e 2d4-AP-i.h.,  $n = 6$ ) dia de treino. LAM: labirinto aquático de Morris. EPM: erro padrão da média. A ANOVA duas vias de medidas repetidas indicou efeito significativo do tempo (dias) tanto para as microinjeções feitas no dia 1 ( $F_{(3,42)} = 48,230$ ,  $p < 0,001$ ) quanto para as do dia 2 de treino ( $F_{(3,30)} = 38,105$ ,  $p < 0,001$ ). A única interação tratamento  $\times$  dia de treinamento apontada pela análise estatística foi entre os grupos do segundo dia (2dPBS-i.h. e 2d4-AP-i.h.),  $F_{(3,30)} = 3,827$ ,  $p < 0,05$ . O teste de Tukey revelou que essa interação significativa ocorreu no 2º dia de treino (\*  $p < 0,05$ ), dia das microinjeções.

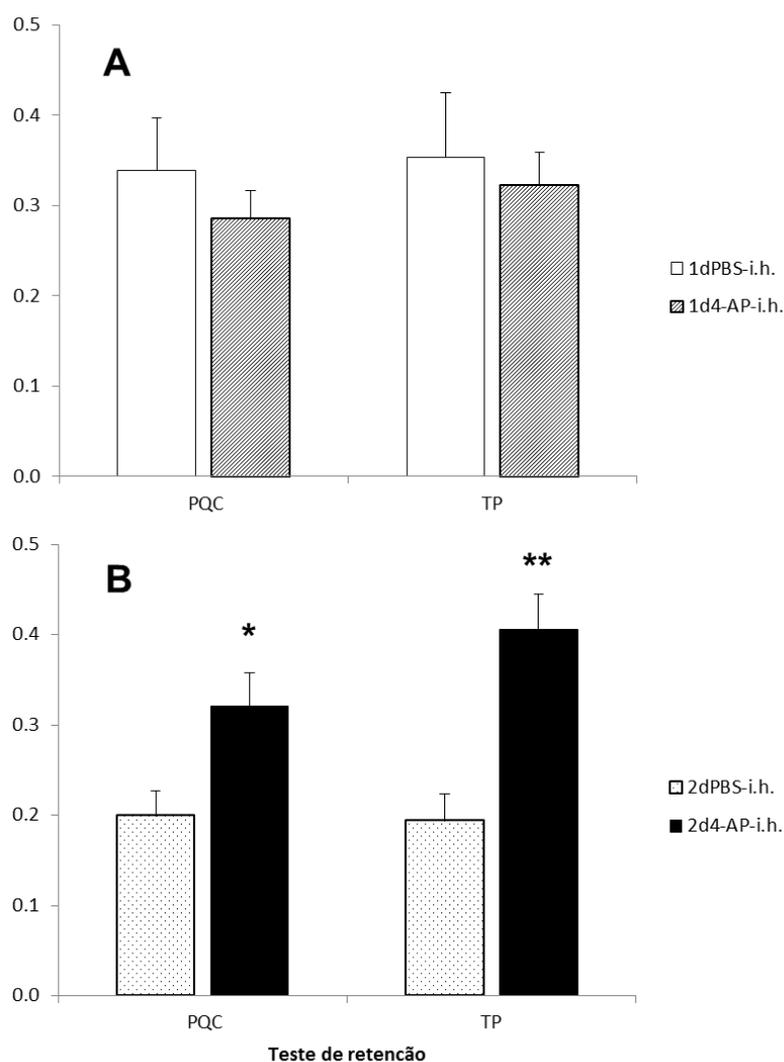
A Fig. 3.12 apresenta o resultado nos testes de sondagem no LAM dos ratos dos grupos 1dPBS-i.h., 1d4-AP-i.h., 2dPBS-i.h. e 2d4-AP-i.h.. Semelhante ao encontrado para as injeções i.p., as microinjeções i.h de 4-AP, independente do dia de sua administração, não influenciaram a PQC nem a TP, se comparadas com o controle com PBS i.h. ( $F_{(3,24)} = 1,734$ ,  $p = 0,187$ , ANOVA de duas vias). Só foi observada uma melhora do desempenho de todos os grupos do primeiro para o segundo teste de sondagem ( $F_{(1,24)} = 12,628$ ,  $p < 0,05$ ).

A 4-AP i.h., quando administrada no início do primeiro dia treino, também não teve efeito sobre a resposta dos ratos no teste de retenção. É importante lembrar que esse teste ocorreu 24 h após a última sessão de treino (24ª sessão) e foi realizado sem a plataforma na piscina. A Fig. 3.13A mostra a PQC e a TP no teste de retenção dos animais que receberam as injeções intrahipocâmpais de PBS ou 4-AP no primeiro dia de treino. O teste t não apontou diferença significativa entre os grupos 1dPBS-i.h. e 1d4-AP-i.h. para nenhuma das duas variáveis dependentes (PQC e TP).

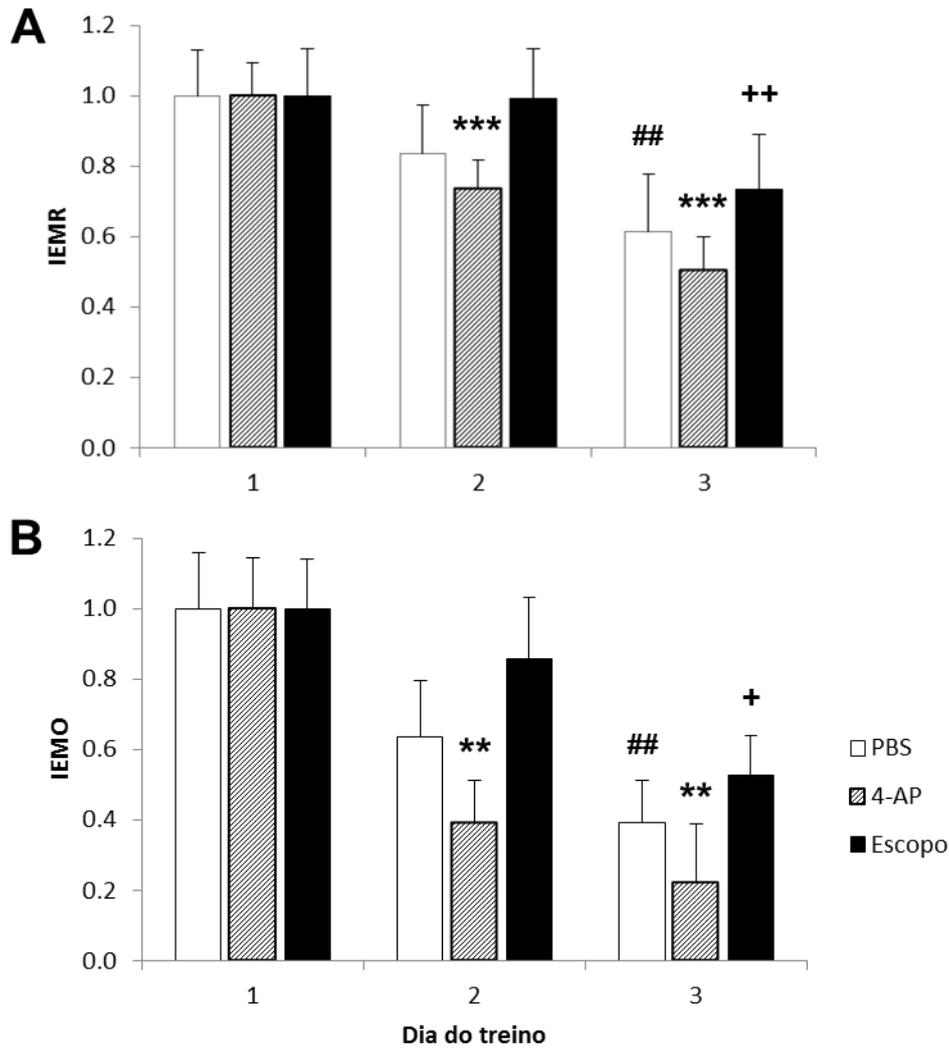
Por outro lado, a 4-AP i.h. melhorou o desempenho dos roedores no teste de retenção, quando injetada no começo do segundo dia de treino. Podemos observar na Figura 3.13B que tanto a PQC e a TP aumentam significativamente (teste t,  $p < 0,5$  e  $p < 0,01$ , respectivamente) no grupo que recebeu a 4-AP antes da primeira sessão do segundo dia (2d4-AP-i.h.) em relação à aquele que ganhou PBS i.h no mesmo momento (2dPBS-i.h.). Para PQC, as médias ( $\pm$  EPM) foram  $0,20 \pm 0,03$  (2dPBS-i.h.) e  $0,32 \pm 0,04$  (2d4-AP-i.h.), um aumento de 60 %. Para TP, os valores (média  $\pm$  EPM) foram  $0,19 \pm 0,03$  (2dPBS-i.h.) e  $0,41 \pm 0,04$  (2d4-AP-i.h.), portanto uma elevação de 116 %. Também foi realizada uma ANOVA de duas vias, considerando o tratamento farmacológico (PBS ou 4-AP) como um fator e o dia em que ocorreu a injeção (1º ou 2º) como o segundo fator. Esta análise indicou um efeito de interação significativo ( $F_{(1,24)} = 5,586$ ,  $p < 0,05$ ) e o teste de Tukey revelou que essa interação ocorreu entre os grupos que receberam injeção i.h no 2º dia ( $p < 0,05$ ).



**Figura 3.12.** Resposta nos testes de sondagem no LAM dos ratos que receberam injeção intrahipocampal (i.h.). As microinjeções de tampão fosfato salino pH 7,4 (PBS) ou 4-aminopiridina (4-AP) ocorreram no 1º dia (1dPBS-i.h. e 1d4-AP-i.h., n = 8) ou no 2º dia de treino (2dPBS-i.h. e 2d4-AP-i.h., n = 6), ambas administradas imediatamente antes da 1ª sessão do dia. Os testes de sondagem ocorreram ao final do 1º e 3º dias de treino e sem a presença da plataforma. A, média ( $\pm$  EPM) da permanência no quadrante crítico (PQC) para ratos dos grupos 1dPBS-i.h. e 1d4-AP-i.h.. B, média ( $\pm$  EPM) da taxa de procura (TP) da plataforma para ratos dos grupos 1dPBS-i.h. e 1d4-AP-i.h.. C e D são médias ( $\pm$  EPM) da PQC e TP, respectivamente, para ratos dos grupos 2dPBS-i.h. e 2d4-AP-i.h.. A ANOVA duas vias revelou efeito significativo apenas para o fator dia do teste ( $* F_{(1,24)} = 12,628, p < 0,05$ ). LAM: labirinto aquático de Morris. EPM: erro padrão da média.



**Figura 3.13.** Desempenho no teste de retenção no LAM de ratos que receberam injeção intrahipocampal (i.h.). O teste de retenção ocorreu 24 h após a última sessão de treino (24<sup>a</sup> sessão). Esse teste teve 90 s de duração e foi realizado sem a plataforma. A, média ( $\pm$  EPM) da permanência no quadrante crítico (PQC) e taxa de procura (TP) da plataforma para os animais que receberam tampão fosfato salino (PBS) ou 1 mM de 4-aminopiridina (4-AP) imediatamente antes da primeira sessão do primeiro dia de treino (1dPBS-i.h. e 1d4-AP-i.h.). B, PQC e TP (média  $\pm$  EPM) para animais cujas microinjeções i.h. (PBS ou 4-AP) ocorreram no começo do segundo dia de treino (2dPBS-i.h. e 2d4-AP-i.h.). LAM: labirinto aquático de Morris. EPM: erro padrão da média. \* e \*\* significam  $p < 0,05$  e  $< 0,01$ , respectivamente.



**Figura 3.14.** Desempenho dos ratos no labirinto radial de oito braços ao longo de três dias de treino (6 sessões por dia). Os animais foram injetados tanto intrahipocampalmente (i.h.) quanto intraperitonealmente (i.p.) logo após a última sessão do dia 1. Alimento (chocolate) foi colocado em uma combinação de três das oito posições (braços). Cada rato teve sua combinação que permaneceu a mesma ao longo das sessões. O grupo PBS (n = 6) foi o controle e recebeu salina (NaCl 0,9 %) i.p e tampão fosfato salino (PBS) i.h.. O grupo 4-AP (n = 6) recebeu salina i.p. e 1mM de 4-aminopiridina (4-AP) i.h.. O grupo Escopo (n = 6) recebeu 0,5 mg/kg de escopolamina i.p. e PBS i.h.. A 4-AP e a escopolamina foram dissolvidas em PBS e salina, respectivamente. A, média ( $\pm$  EPM) do índice de erros de memória de referência (IEMR) que era anotado para cada sessão quando o rato entrava pela primeira vez em um braço que nunca teve chocolate. B, média ( $\pm$  EPM) do índice de erros de memória operacional (IEMO) que era anotado toda vez que o animal revisitava um braço na mesma sessão. \*\* e \*\*\* representam  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente, em relação ao primeiro dia do grupo 4-AP. ## representa  $p < 0,01$  em relação ao primeiro dia do grupo PBS. + e ++ representam  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente, em relação ao primeiro dia do grupo Escopo (++ também é em relação ao segundo dia). EPM: erro padrão da média.

### 3. Teste no LR com injeção i.h.

Tanto os erros de memória de referência quanto os de memória operacional cometidos por todos os grupos de ratos (PBS, 4-AP e Escopo) diminuíram ao longo dos dias exposição ao LR. A Fig. 3.14 apresenta o IEMR e IEMO desses grupos para os três dias de treinamento ( $n = 6$  para todos). A MANOVA indicou diferenças significativas para o fator dia (Pillai's trace = 0,8587,  $F_{(2,30)} = 11,2865$ ,  $P < 0,001$ ). Porém, essa análise não apontou diferenças significativas para o fator tratamento (Pillai's trace = 0,2252,  $F_{(2,15)} = 0,9519$ ,  $P = 0,448$ ) e nem para interação tratamento  $\times$  dias (Pillai's trace = 0,2848,  $F_{(4,30)} = 1,2456$ ,  $P = 0,289$ ). Portanto, administração de 4-AP não influenciou a redução dos erros do grupo, quando comparado com a injeção de PBS ou escopolamina. Como a reexposição ao LR longo dos dias influenciou o desempenho dos animais, uma ANOVA de uma via para o fator dia foi realizada para cada grupo levando em consideração as variáveis dependentes IEMR e IEMO separadamente.

O grupo que recebeu 4-AP i.h. apresentou redução de erros de memória de referência antes dos demais grupos. Com relação ao fator dia e a variável IEMR, a ANOVA apontou diferenças significativas em todos os grupos: PBS ( $F_{(2,10)} = 7,873$ ,  $p < 0,01$ ); 4-AP ( $F_{(2,10)} = 49,440$ ,  $p < 0,001$ ); e Escopo ( $F_{(2,10)} = 9,793$ ,  $p < 0,01$ ). O teste de Tukey revelou que nos grupos PBS e Escopo a redução do IEMR só é significativa no dia 3 (2º após a injeção) em relação ao dia 1 (antes da injeção), sendo o  $p < 0,01$  (Fig. 3.14). Para o grupo 4-AP, esse teste indicou que a diminuição do IEMR observada no dia 2 (1º após a injeção) já é significativa ( $P < 0,001$ ), além de ser também no dia 3 ( $P < 0,001$ ), ambos comparados com o dia 1 (Fig. 3.14). Ainda no grupo 4-AP, a diferença no IEMR entre os dias 2 e 3 é significativa ( $P < 0,01$ ). Logo, a diminuição de erros de memória de referência ocorreu primeiro quando da administração i.h. de 4-AP.

A administração de 4-AP i.h. fez com que nesse grupo de ratos a redução dos erros de memória operacional também ocorresse primeiro. Com relação ao fator dia e variável IEMO, A ANOVA apontou diferenças significativas em todos os grupos: PBS ( $F_{(2,10)} = 8,288$ ,  $p < 0,01$ ); 4-AP ( $F_{(2,10)} = 13,690$ ,  $p < 0,01$ ); e Escopo ( $F_{(2,10)} = 4,349$ ,  $p < 0,05$ ). O teste de Tukey revelou que nos grupos PBS e Escopo a redução do IEMO só é significativa no dia 3 (2º após a injeção) em relação ao dia 1 (antes da injeção), sendo o  $p < 0,01$  (PBS) e  $p < 0,05$  (Escopo) (Fig. 3.14). Para o grupo 4-AP, esse teste indicou que a diminuição do IEMO observada no dia 2 (1º após a

injeção) já é significativa ( $P < 0,01$ ), além de ser também no dia 3 ( $P < 0,01$ ), ambos comparados com o dia 1 (Fig. 3.14). Portanto, a redução de erros de memória de operacional também ocorreu antes quando da microinjeção i.h. de 4-AP.

Tomados juntos, esses resultados sugerem que a 4-AP não aumenta a intensidade da redução dos erros cometidos pelos ratos no LR, mas eleva a velocidade com que isso ocorre.

## DISCUSSÃO

Dados dos efeitos da 4-AP em modelos de memória espacial são escassos e isto dificulta uma discussão mais detalhada e pormenorizada dos resultados obtidos. Um trabalho que envolve essa situação foi realizado por Keblesh *et al.* (2009). Eles injetaram diariamente 5 mg/kg de 4-AP i.p. em camundongos infectados centralmente com vírus da imunodeficiência humana (HIV) e observaram que este tratamento revertia o prejuízo de memória espacial que os animais infectados apresentavam no labirinto radial aquático, uma adaptação do LR para a água (Hyde *et al.*, 1998). Além disso, Keblesh *et al.* (2009) não administraram 4-AP nos animais controles (sem HIV), uma falha experimental do trabalho que impossibilita sabermos se o bloqueio dos canais  $K_v$  em animais sem infecção poderia resultar em melhora do desempenho dos camundongos no teste de memória, e não apenas a reversão do déficit.

No presente trabalho, a injeção repetida i.p. de 4-AP não teve efeito sobre o desempenho dos ratos no LAM em relação àqueles que receberam salina. A administração intraperitoneal de 0,1 ou de 0,5 mg/kg desse fármaco no início dos dias de treino não alterou a taxa de aquisição de memória ao longo dos dias (Fig. 3.8), nem a resposta dos animais nos testes de sondagem (Fig. 3.9) e muito menos no teste de retenção de memória (Fig. 3.10). Portanto, esses resultados podem sugerir que os canais  $K_v$  bloqueados pela 4-AP não influenciariam a aprendizagem e a memória espacial, porém essa interpretação tem de ser vista com algumas ressalvas. Primeiro, por ter sido injetada intraperitonealmente, a atuação do fármaco foi difusa no sistema nervoso central (ou em áreas periféricas) e, por isso, produziria efeito resultante nulo. Isto porque, como os canais  $K_v$  são expressos de forma generalizada no encéfalo de mamíferos (Vacher *et al.*, 2008) e a formação hipocampal recebe aferências de diferentes regiões cerebrais (Solari e Stoner, 2011), os efeitos hipocampais da 4-AP podem ter sido anulados pela sua interferência em outras estruturas do cérebro que, por sua vez, influenciam a atividade da formação hipocampal. Outra explicação é que as doses usadas não foram efetivas para produzir alteração no processo de formação de memória. Porém, Haroutunian *et al.* (1985) constataram que a administração i.p. de 0,1 mg/kg de 4-AP (dose também usada neste trabalho) em ratos, após a sessão de treino, resultou em maior retenção da resposta de esQUIVA inibitória, quando comparado com os ratos que receberam salina. Esse

achado diminui a probabilidade de ocorrência das duas explicações anteriores (efeito resultante nulo e dose ineficaz). Aqui relembremos da nossa hipótese que diz que tanto os canais  $K_v1$  e  $K_v2$  teriam ações opostas na formação da memória espacial, o primeiro ajudando e o segundo prejudicando. Como a 4-AP estaria bloqueando os dois igualmente (Mathie *et al.*, 1998) é de se esperar que a consequência da inibição de um canal é compensada pela também inibição do outro e o aprendizado espacial no LAM não é alterado.

Duas estratégias podem ser empregadas para contornar as questões levantadas no parágrafo anterior sobre a administração i.p. de 4-AP. A primeira é usar um bloqueador mais específico para os subtipos de canais para  $K^+$ , como as toxinas. Por exemplo, Stackman *et al.* (2002) injetaram cronicamente apamina por via i.p. em camundongos e os testaram no LAM. A apamina é uma toxina obtida da peçonha de abelha que possui atividade bloqueadora de canais para potássio dependentes de  $Ca^{2+}$  ( $K_{Ca}$ ) subtipos 2.2 e 2.3 (Vergara *et al.*, 1998). Stackman *et al.* (2002) observaram que essa toxina foi capaz de aumentar a taxa de aquisição no início do ensaio comportamental. Para os objetivos dessa tese, teríamos de usar toxinas específicas para  $K_v1$  e  $K_v2$ , questão que será tratada no capítulo 4. A segunda estratégia, discutida nos próximos parágrafos, é fazer a administração de 4-AP diretamente na formação hipocampal.

A injeção aguda i.h. de 4-AP no primeiro dia não produziu efeito no LAM. Tendo o grupo de ratos que receberam PBS i.h. (controle) como comparação, a administração bilateral de 1mM de 4-AP (0,2  $\mu$ L/lado) na região de CA1 da formação hipocampal no início do primeiro dia de treino também não alterou a taxa de aquisição (Figura 3.11A). A permanência no quadrante crítico e a taxa de procura permaneceram inalteradas tanto nos testes de sondagem (Fig. 3.12A e 3.12B, respectivamente), quanto no teste de retenção (Fig. 3.13A), o que sugere que a 4-AP não influenciou a precisão espacial da busca da plataforma pelos animais em relação aos controles. Esses resultados fortalecem a explicação apresentada no parágrafo anterior de que a 4-AP, ao bloquear tanto  $K_v1$  quanto  $K_v2$ , acaba por anular seus efeitos sobre a aquisição da informação espacial para formar a memória. Outra questão que surge é se os animais já não estão tendo um desempenho máximo no procedimento experimental usado e, portanto, a 4-AP não poderia melhorar a resposta deles. Roozendaal *et al.* (2004), investigando o mecanismo pelo qual glicocorticoides prejudicam a recuperação da memória espacial de longo prazo,

injetaram um agonista de receptor de glicocorticoides (RU 28362) na região dorsal da formação hipocampal de ratos e os testaram no LAM. Eles destacaram a necessidade de submeter os animais a uma reduzida quantidade de sessões de treino (três de 60 s por dia durante três dias) de modo a produzir um aprendizado espacial moderado permitindo, deste modo, que o tratamento farmacológico possa melhorar ou prejudicar seus desempenhos. Diferentemente do que sugerido por Roozendaal *et al.* (2004), nossos experimentos no LAM contaram com mais sessões diárias, durante mais dias (seis sessões de 90 s por dia durante quatro dias).

Por outro lado, a injeção i.h. aguda de 4-AP no segundo dia de treino teve efeito. A administração do fármaco ocorreu imediatamente antes da sétima sessão de treino, ou seja, no início do segundo dia de aquisição. Nesse dia, podemos constatar que os animais tratados levaram menos tempo para encontrar a plataforma do que os controles (Fig. 3.11B). Entretanto, uma observação se faz pertinente: a redução da latência de escape para o grupo controle (2dPBS-i.h.) foi pequena, apenas 6,7 %. Em nossos experimentos no LAM, a intensidade dessa diminuição sempre foi maior entre o primeiro e segundo dias, sendo de 38,7 % no grupo 1dPBS-i.h. e 49,1 % no grupo salina-i.p. Portanto, pode ser que a injeção intrahipocampal no segundo dia interferiu negativamente na atividade da formação hipocampal causando um déficit de memória no segundo dia. Isso não teria ocorrido no grupo 2d4AP-i.h., que apresentou uma redução de 51,8 % na latência de escape entre o primeiro e segundo dias, por causa de um possível efeito anti-amnésico da 4-AP. Não houve diferenças entre grupo 2d4-AP-i.h. e 2dPBS-i.h. (controle) na permanência no quadrante crítico ou taxa de procura nos testes de sondagem (Fig. 3.12C e 3.12D). Porém, no teste de retenção, os ratos injetados com o fármaco na região dorsal da formação hipocampal no segundo dia passaram mais tempo no quadrante crítico e buscaram de forma mais intensa a plataforma do que os que receberam PBS. Isso sugere que o bloqueio dos canais  $K_v$  pela 4-AP contribuiu para um melhor aprendizado espacial e formação de memória de longo prazo (24 hs). Porém, devido à menor redução da latência de escape no segundo dia do grupo controle, não podemos descartar a hipótese de a injeção i.h. ter gerado um prejuízo da memória de longo prazo, que foi revertido pela 4-AP, ou seja, esse fármaco só teria uma contribuição positiva nos processos da memória em uma condição de disfunção da memória. No segundo dia, ocorre uma reexposição à situação de busca da plataforma escondida no LAM, dando lugar em seguida a uma reconsolidação da memória

espacial, processo que depende do envio de informações do córtex entorrinal para a região CA1 da formação hipocampal via projeções diretas temporo-ammônicas (Remondes e Schuman, 2004). A reconsolidação é um momento do processo de aquisição da memória de longo prazo em que essa pode ser modificada (Nadel *et al.*, 2012). Portanto, as injeções intrahipocampais no segundo dia, seja de PBS ou 4-AP, podem interferir no processo de formação da memória de longo prazo, seja para intensificar ou prejudicá-la.

O tratamento com 4-AP acelerou a aprendizagem dos animais no LR. Neste dispositivo, os ratos dos três grupos de tratamento (PBS i.h., 4-AP i.h. e escopolamina i.p.) apresentaram redução dos erros de memória de referência e operacional ao longo dos dias de treino (Fig. 3.14). Olhando para cada dia de treino separadamente, não ocorreu diferenças significativas nos dois tipos de erros entre os grupos. Porém, apenas no grupo cujos ratos receberam 4-AP i.h. a redução dos erros de memória operacional e de referência foi significativa no segundo dia de treino (o primeiro após a microinjeção). Nos outros tratamentos, essa diminuição nos dois tipos de erros só passou a ser relevante dois dias depois da injeção, terceiro dia de treino (Fig. 3.14). Portanto, a 4-AP não influenciou a intensidade do aprendizado espacial, mas aumentou a velocidade com qual ele ocorre.

Não foram encontrados trabalhos que utilizaram 4-AP em ratos submetidos ao LR, porém existem experimentos com seu derivado mais potente, a 3,4-diaminopiridina (3,4-DAP) (Kirsch e Narahashi, 1983). A administração i.p. desse fármaco em ratos com diferentes idades e testados no LR melhorou a memória operacional apenas dos idosos (Barnes *et al.*, 1989). Porém a 3,4-DAP i.p. não conseguiu reverter o aumento de erros de memória operacional e de referência de ratos nesse labirinto provocados pela escopolamina i.p. (Beninger *et al.*, 1995). De qualquer forma, a 3,4-DAP i.p. também não melhorou o desempenho de ratos que não apresentavam déficit de memória. Portanto, nosso trabalho é o primeiro a mostrar que a 4-AP, quando injetada diretamente na formação hipocampal, produz um efeito positivo, apesar de fraco, no aprendizado espacial em ratos com processos da memória em bom funcionamento. Esse efeito leve poderia ser resultado do bloqueio mútuo dos canais  $K_v1$  e  $K_v2$  pela 4-AP, como já comentado para a injeção i.p.. Outro trabalho interessante que vale comentar é o de Mpari *et al.* (2008). Eles injetaram apamina, a toxina bloqueadora de canais  $K_{Ca}$ , no ventrículo lateral de ratos e observaram que esses cometiam menos erros de memória de referência no LR, mas os

erros operacionais permaneciam inalterados. Logo, parece que os canais  $K_v$  têm um papel mais amplo que os  $K_{Ca}$  no aprendizado espacial, pois influenciam tanto a formação de memória de curto (memória operacional) quanto de longo prazo (memória de referência). Nossos achados no LR ratificam os resultados obtidos no LAM com injeção i.h., fortalecendo a interpretação que o bloqueio de canais  $K_v$  pela 4-AP no segundo dia pode ter efeito positivo sobre a formação de memória espacial em ratos jovens sem deficiência de aprendizagem.

Por que o bloqueio dos canais  $K_v$  em neurônios hipocâmpais pela 4-AP poderia melhorar o desempenho dos ratos no LR e LAM? Como já foi mencionado no capítulo 2, esse bloqueio prolonga o potencial de ação e aumenta o influxo de cálcio nos terminais pré-sinápticos, elevando a liberação neurotransmissores, em especial glutamato e acetilcolina. O resultado é que a 4-AP intensifica a indução de LTP, que também pode ser constatada nos resultados do cap. 2 (Fig.2.7). Uma vez que a LTP pode ser um dos mecanismos moleculares/celulares envolvidos na formação da memória espacial no LAM (Morris *et al.*, 1986; Davis *et al.*, 1992) e no LR (Ward *et al.*, 1990; Caramanos e Shapiro, 1994), é plausível esperar que esse fármaco também irá facilitar o aprendizado espacial nos labirintos.

O bloqueio generalizado dos canais  $K_v$  pela 4-AP parece ser mais importante para reverter ou amenizar a amnésia, do que para melhorar a memória. Evidências experimentais sugerem que, em situações nas quais o funcionamento da formação hipocâmpal está comprometido, há um aumento da expressão de canais  $K_v2$  em relação aos  $K_v1$ . Por exemplo, Zhong *et al.* (2005) encontraram aumento de mRNA de canais  $K_v2.1$ , mas não de  $K_v1.5$ , em neurônios hipocâmpais de animais tratados com escopolamina subcutânea e que apresentavam prejuízo de memória no LAM. Campolongo *et al.* (2013) constataram que a administração intracerebroventricular de peptídeo 25-35  $\beta$ -amidaloide em ratos, que produz deficiências comportamentais semelhantes as da doença de Alzheimer, também aumentou a expressão de canais  $K_v2.1$  na formação hipocâmpal, além de prejudicar o aprendizado no LAM. Shen *et al.* (2009) mostraram que neurônios hipocâmpais de ratos em processo de apoptose causado pela excitotoxicidade glutamatérgica expressavam mais canais  $K_v2.1$  e menos  $K_v1.1$ . Nessas situações patológicas, a 4-AP teria um efeito resultante maior por causa da maior proporção de canais  $K_v2$ , levando à melhora da função da memória. Em condições normais, haveria um balanço menos desproporcional entre canais  $K_v1$  e  $K_v2$ , o que reduziria a influência

do fármaco. Conclusões sobre a participação desses canais na aprendizagem e memória são limitadas pelo fato da 4-AP bloquear os dois semelhantemente (Mathie *et al.*, 1998). O capítulo 4, que relatará o uso de toxinas bloqueadoras específicas para  $K_v1$  e  $K_v2$ , poderá trazer mais evidências para elucidação dessa questão. A forte resposta positiva sobre a indução de LTP observada no capítulo 2 pode se dever a uma situação não fisiológica de apresentação da formação hipocampal a excesso de 4-AP de forma duradora, condição não reproduzida pela injeção i.h. aguda desse fármaco nos ratos submetidos a testes no LAM ou no LR.

Concluimos que os canais  $K_v$  podem influenciar o processo de aprendizagem espacial em condições normais. Esse efeito ficou mais caracterizado no LR do que no LAM. Porém os testes no LR são mais laboriosos, comparado ao outro labirinto, e as conclusões são mais frágeis em função de diferentes estratégias que podem ser utilizadas pelos animais para resolução do desafio experimental. Apesar de tanto o LR quanto o LAM serem usados para avaliarem aprendizagem e memória espacial, é imprudente dizer que a resposta dos roedores a eles envolvem a mesma gama de processos cognitivos (Hodges, 1996). Uma diferença importante entre LAM e LR é que no primeiro a estratégia dos ratos para achar a plataforma utilizaria o mapa cognitivo baseado nas pistas visuais externas ao labirinto, enquanto no segundo, os animais poderiam aproveitar outras estratégias como o aprendizado associativo (usando pistas dentro do labirinto), o egocêntrico e o guiado pelo odor, além do mapa cognitivo, para encontrar o alimento (Hodges, 1996). É importante ressaltar que a utilização da rotação do LR a cada sessão e o confinamento do rato no braço errado aumenta o uso do mapa cognitivo como estratégia de escolha de em qual braço devesse entrar para encontrar a recompensa (Hodges, 1996; Dubreuil *et al.*, 2003; Dudchenko, 2004).

Por fim, na introdução deste capítulo, duas questões práticas foram colocadas já pensando na próxima etapa do trabalho. A resposta da primeira delas é que escolhemos o LAM para realização dos testes com as toxinas bloqueadoras dos canais  $K_v$ . A segunda, ainda não está completamente respondida. A administração intrahipocampal das toxinas deverá ocorrer ao final do primeiro dia de treino, porém o protocolo experimental possuirá menos sessões com o objetivo de promover um aprendizado espacial moderado de modo destacar o efeito do tratamento. Poderemos repetir o protocolo executado por Roozendaal *et al.* (2004): três dias de treino, como três sessões diárias de 60s e deixando o animal apenas 15 s na

plataforma. Como alternativa, podemos realizar um único dia de treino com oito sessões de 60 s, deixando o animal na plataforma por 20 s e fazendo a injeção i.h ao final da última sessão (de Quervain *et al.*, 1998; Teather *et al.*, 1998; Akbari *et al.*, 2006). Nos dois procedimentos comportamentais ocorrerá o teste de retenção de 60 s no dia seguinte. Também não podemos esquecer que o emprego de um bloqueador (4-AP) com ação generalizada sobre os canais  $K_v$  pode ter dificultado a constatação do papel desses canais nos processos da memória estudados. Para resolver este problema, no próximo capítulo, utilizamos toxinas de aracnídeos com atividade específica sobre subtipos de canais  $K_v$ .

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKBARI, E., NAGHDI, N. & MOTAMEDI, F. 2006. Functional inactivation of orexin 1 receptors in CA1 region impairs acquisition, consolidation and retrieval in Morris water maze task. *Behav Brain Res*, 173, 47-52.
- BACHEVALIER, J. & NEMANIC, S. 2008. Memory for spatial location and object-place associations are differently processed by the hippocampal formation, parahippocampal areas TH/TF and perirhinal cortex. *Hippocampus*, 18, 64-80.
- BARNES, C. A., EPPICH, C. & RAO, G. 1989. Selective improvement of aged rat short-term spatial memory by 3,4-diaminopyridine. *Neurobiology of aging*, 10, 337-41.
- BENINGER, R. J., WIRSCHING, B. A., MALLET, P. E., JHAMANDAS, K. & BOEGMAN, R. J. 1995. Physostigmine, but not 3,4-diaminopyridine, improves radial maze performance in memory-impaired rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 51, 739-46.
- CAMPOLONGO, P., RATANO, P., CIOTTI, M. T., FLORENZANO, F., NORI, S. L., MAROLDA, R., PALMERY, M., RINALDI, A. M., ZONA, C., POSSENTI, R., CALISSANO, P. & SEVERINI, C. 2013. Systemic administration of substance p recovers Beta amyloid-induced cognitive deficits in rat: involvement of kv potassium channels. *PloS one*, 8, e78036.
- CAMPOS, A. & SAITO, M. I. P. 1999. Aprendizagem e memória no labirinto radial de oito braços. In: XAVIER, G. F. (ed.) *Técnicas para o estudo de sistema nervoso*. São Paulo: Editora Plêiade.
- CARAMANOS, Z. & SHAPIRO, M. L. 1994. Spatial memory and N-methyl-D-aspartate receptor antagonists APV and MK-801: memory impairments depend on familiarity with the environment, drug dose, and training duration. *Behavioral neuroscience*, 108, 30-43.
- D'HOOGE, R. & DE DEYN, P. P. 2001. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res. Brain Res reviews*, 36, 60-90.
- DAVIS, S., BUTCHER, S. P. & MORRIS, R. G. 1992. The NMDA receptor antagonist D-2-amino-5-phosphonopentanoate (D-AP5) impairs spatial learning and LTP in vivo at intracerebral concentrations comparable to those that block LTP in vitro. *J Neurosci*, 12, 21-34.

- DE QUERVAIN, D. J., ROOZENDAAL, B. & MCGAUGH, J. L. 1998. Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature*, 394, 787-90.
- DEACON, R. M., BANNERMAN, D. M., KIRBY, B. P., CROUCHER, A. & RAWLINS, J. N. 2002. Effects of cytotoxic hippocampal lesions in mice on a cognitive test battery. *Behav Brain Res*, 133, 57-68.
- DUBREUIL, D., TIXIER, C., DUTRIEUX, G. & EDELINE, J. M. 2003. Does the radial arm maze necessarily test spatial memory? *Neurobiol Learn Mem*, 79, 109-17.
- DUDCHENKO, P. A. 2004. An overview of the tasks used to test working memory in rodents. *Neurosci Biobehav Rev*, 28, 699-709.
- FINKE, C., OSTENDORF, F., BRAUN, M. & PLONER, C. J. 2011. Impaired representation of geometric relationships in humans with damage to the hippocampal formation. *PLoS one*, 6, e19507.
- GALANI, R., OBIS, S., COUTUREAU, E., JARRARD, L. & CASSEL, J. C. 2002. A comparison of the effects of fimbria-fornix, hippocampal, or entorhinal cortex lesions on spatial reference and working memory in rats: short versus long postsurgical recovery period. *Neurobiol Learn Mem*, 77, 1-16.
- HAROUTUNIAN, V., BARNES, E. & DAVIS, K. L. 1985. Cholinergic modulation of memory in rats. *Psychopharmacology*, 87, 266-71.
- HODGES, H. 1996. Maze procedures: the radial-arm and water maze compared. *Brain Res. Cognitive Brain Res*, 3, 167-81.
- HOLDSTOCK, J. S., MAYES, A. R., CEZAYIRLI, E., ISAAC, C. L., AGGLETON, J. P. & ROBERTS, N. 2000. A comparison of egocentric and allocentric spatial memory in a patient with selective hippocampal damage. *Neuropsychologia*, 38, 410-25.
- HYDE, L. A., HOPLIGHT, B. J. & DENENBERG, V. H. 1998. Water version of the radial-arm maze: learning in three inbred strains of mice. *Brain Res*, 785, 236-44.
- KEBLESH, J. P., DOU, H., GENDELMAN, H. E. & XIONG, H. 2009. 4-Aminopyridine improves spatial memory in a murine model of HIV-1 encephalitis. *J Neuroimmune Pharmacol*, 4, 317-27.

- KESSELS, R. P., DE HAAN, E. H., KAPPELLE, L. J. & POSTMA, A. 2001. Varieties of human spatial memory: a meta-analysis on the effects of hippocampal lesions. *Brain Res. Brain Res reviews*, 35, 295-303.
- KIRSCH, G. E. & NARAHASHI, T. 1983. Site of action and active form of aminopyridines in squid axon membranes. *J Pharmacol Exp Ther*, 226, 174-9.
- LEVITA, L. & MUZZIO, I. A. 2010. Role of the hippocampus in goal-oriented tasks requiring retrieval of spatial versus non-spatial information. *Neurobiol Learn Mem*, 93, 581-8.
- LINDNER, M. D., BALCH, A. H. & VANDERMAELEN, C. P. 1992. Short forms of the "reference-" and "working-memory" Morris water maze for assessing age-related deficits. *Behav Neural Biol*, 58, 94-102.
- MATHIE, A., WOOLTORTON, J. R. & WATKINS, C. S. 1998. Voltage-activated potassium channels in mammalian neurons and their block by novel pharmacological agents. *Gen Pharmacol*, 30, 13-24.
- MORRIS, R. 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*, 11, 47-60.
- MORRIS, R. G. 1981. Spatial localization does not require the presence of local cues *Learning and Motivation*, 12, 239 - 260.
- MORRIS, R. G., ANDERSON, E., LYNCH, G. S. & BAUDRY, M. 1986. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature*, 319, 774-6.
- MORRIS, R. G., GARRUD, P., RAWLINS, J. N. & O'KEEFE, J. 1982. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, 297, 681-3.
- MPARI, B., SRENG, L., REGAYA, I. & MOURRE, C. 2008. Small-conductance Ca(2+)-activated K(+) channels: Heterogeneous affinity in rat brain structures and cognitive modulation by specific blockers. *Eur J Pharmacol*, 589, 140-8.
- MURRAY, E. A., BAXTER, M. G. & GAFFAN, D. 1998. Monkeys with rhinal cortex damage or neurotoxic hippocampal lesions are impaired on spatial scene learning and object reversals. *Behavioral neuroscience*, 112, 1291-303.
- NADEL, L., HUPBACH, A., GOMEZ, R. & NEWMAN-SMITH, K. 2012. Memory formation, consolidation and transformation. *Neurosci Biobehav Rev*, 36, 1640-5.

- OLTON, D. S. & PAPAS, B. C. 1979. Spatial memory and hippocampal function. *Neuropsychologia*, 17, 669-82.
- OLTON, D. S. & SAMUELSON, R. J. 1976. Remembrance of Places Passed - Spatial Memory in Rats. *Journal of Experimental Psychology-Animal Behavior Processes*, 2, 97-116.
- PAUL, C. M., MAGDA, G. & ABEL, S. 2009. Spatial memory: Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents. *Behav Brain Res*, 203, 151-64.
- PAXINOS, G. & WATSON, C. 2007. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 6th ed. London: Academic Press.
- POTHUIZEN, H. H., ZHANG, W. N., JONGEN-RELO, A. L., FELDON, J. & YEE, B. K. 2004. Dissociation of function between the dorsal and the ventral hippocampus in spatial learning abilities of the rat: a within-subject, within-task comparison of reference and working spatial memory. *The European Journal of Neuroscience*, 19, 705-12.
- RAMOS, J. M. 2008. Hippocampal damage impairs long-term spatial memory in rats: comparison between electrolytic and neurotoxic lesions. *Physiol Behav*, 93, 1078-85.
- REMONDES, M. & SCHUMAN, E. M. 2004. Role for a cortical input to hippocampal area CA1 in the consolidation of a long-term memory. *Nature*, 431, 699-703.
- ROOZENDAAL, B., HAHN, E. L., NATHAN, S. V., DE QUERVAIN, D. J. & MCGAUGH, J. L. 2004. Glucocorticoid effects on memory retrieval require concurrent noradrenergic activity in the hippocampus and basolateral amygdala. *J Neurosci*, 24, 8161-9.
- SCHWEIZER, T., BIRTHELMER, A., LAZARIS, A., CASSEL, J. C. & JACKISCH, R. 2003. 3,4-DAP-evoked transmitter release in hippocampal slices of aged rats with impaired memory. *Brain Res Bull*, 62, 129-36.
- SHARMA, S., RAKOCZY, S. & BROWN-BORG, H. 2010. Assessment of spatial memory in mice. *Life sciences*, 87, 521-36.
- SHEN, Q. J., ZHAO, Y. M., CAO, D. X. & WANG, X. L. 2009. Contribution of Kv channel subunits to glutamate-induced apoptosis in cultured rat hippocampal neurons. *Journal of Neurosci Res*, 87, 3153-60.
- SMITH, M. L. & MILNER, B. 1989. Right hippocampal impairment in the recall of spatial location: encoding deficit or rapid forgetting? *Neuropsychologia*, 27, 71-81.

- SOLARI, S. V. & STONER, R. 2011. Cognitive consilience: primate non-primary neuroanatomical circuits underlying cognition. *Front Neuroanat*, 5, 65.
- STACKMAN, R. W., HAMMOND, R. S., LINARDATOS, E., GERLACH, A., MAYLIE, J., ADELMAN, J. P. & TZOUNOPOULOS, T. 2002. Small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels modulate synaptic plasticity and memory encoding. *J Neurosci*, 22, 10163-71.
- TEATHER, L. A., PACKARD, M. G. & BAZAN, N. G. 1998. Effects of posttraining intrahippocampal injections of platelet-activating factor and PAF antagonists on memory. *Neurobiol Learn Mem*, 70, 349-63.
- VACHER, H., MOHAPATRA, D. P. & TRIMMER, J. S. 2008. Localization and targeting of voltage-dependent ion channels in mammalian central neurons. *Physiol Rev*, 88, 1407-47.
- VERGARA, C., LATORRE, R., MARRION, N. V. & ADELMAN, J. P. 1998. Calcium-activated potassium channels. *Curr Opin Neurobiol*, 8, 321-9.
- WANG, D., DARWISH, D. S. & SCHREURS, B. G. 2006. Effects of 4-aminopyridine on classical conditioning of the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) nictitating membrane response. *Behav Pharmacol*, 17, 319-29.
- WARD, L., MASON, S. E. & ABRAHAM, W. C. 1990. Effects of the NMDA antagonists CPP and MK-801 on radial arm maze performance in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 35, 785-90.
- ZAR, J. H. 1999. Two-Factor analysis of variance. *Biostatistical analysis*. 4th ed. New Jersey: Prentice Hall.
- ZHANG, W. N., POTHUIZEN, H. H., FELDON, J. & RAWLINS, J. N. 2004. Dissociation of function within the hippocampus: effects of dorsal, ventral and complete excitotoxic hippocampal lesions on spatial navigation. *Neuroscience*, 127, 289-300.
- ZHONG, C. B., PAN, Y. P., TONG, X. Y., XU, X. H. & WANG, X. L. 2005. Delayed rectifier potassium currents and Kv2.1 mRNA increase in hippocampal neurons of scopolamine-induced memory-deficient rats. *Neurosci Lett*, 373, 99-104.

# Capítulo 4

## **Uso das toxinas de aracnídeos HgeTx1 e ScTx1 para testar a hipótese de participação dos canais $K_v1$ e $K_v2$ na memória**

Nesta seção, o objetivo dos experimentos é testar a hipótese da ação positiva dos canais  $K_v1$  e a ação negativa dos canais  $K_v2$  na memória usando duas toxinas: a ScTx1, de aranha, e a HgeTx1, de escorpião. Porém, este é um capítulo inacabado. A influência das toxinas só foi estudada na indução de potenciação de longo prazo na formação hipocampal de fatias de cérebro de ratos, modelo de plasticidade sináptica relacionado à memória. Como não ficou completamente resolvido o procedimento experimental no labirinto aquático de Morris a ser utilizado com as toxinas e pelo fim do prazo do doutoramento, o efeito da ScTx1 e da HgeTx1 em animais submetidos ao teste de memória espacial ainda não foi verificado.

## INTRODUÇÃO

Na seção anterior, conclusões sobre a participação dos canais  $K_v1$  e  $K_v2$  na aprendizagem e memória espacial foram limitadas pelo fato da 4-aminopiridina bloquear os dois semelhantemente (Mathie *et al.*, 1998). O atual capítulo traz evidências para elucidação dessa questão, pois relata a influência das toxinas HgeTx1 e ScTx1, bloqueadoras específicas respectivamente para  $K_v1$  e  $K_v2$ , na indução de potenciação de longo prazo (*long-term potentiation*: LTP) na formação hipocampal. Como já comentado no capítulo 2, a LTP é um fenômeno de fortalecimento da transmissão sináptica dependente de atividade neuronal que é proposta como um dos componentes do mecanismo de alguns tipos de aprendizagem e memória (Bliss e Collingridge, 1993). Entretanto, pode haver relação entre a atividade de canais  $K_v$  e a LTP?

As correntes de  $K^+$  geradas pela abertura dos canais  $K_v$  podem influenciar a indução de LTP. Essas correntes podem ser classificadas em dois tipos: as transientes ( $I_A$ ); e as retificadoras tardias ( $I_K$ ) (Rogawski, 1985). Apesar de existirem outras correntes geradas pelos canais  $K_v$  (Brown *et al.*, 1990; Storm, 1990; Chen e Johnston, 2004), essas duas são as principais em neurônios piramidais corticais (Zhou e Hablitz, 1996). Correntes  $I_A$  são iniciadas pela despolarização do neurônio e apresentam tanto ativação (dentro de 10 ms), quanto inativação rápidas. O decaimento dessa última é exponencial (constante de tempo entre 15 e 50 ms), mesmo com manutenção da despolarização desencadeadora do fenômeno (Rogawski, 1985; Storm, 1990). Elas possuem limiar entre -45 e -60 mV e forte estado de inativação que não pode ser revertido antes da membrana ter se repolarizado a valores inferiores a -50 mV. As correntes  $I_A$  contribuem para o início da repolarização do potencial de ação e podem regular disparos repetitivos desses (Rogawski, 1985; Storm, 1990). As correntes  $I_K$  se ativam lentamente (constante de tempo entre 20 e 60 ms) em resposta a despolarizações para -40 mV, se inativam também lentamente (constante de tempo entre 800 e 5000 ms) e participam da repolarização do potencial de ação (Storm, 1990; Zhou e Hablitz, 1996). Vários trabalhos mostram que as  $I_A$  alteram a excitabilidade de neurônios hipocampais e participam do estabelecimento da LTP (Ramakers e Storm, 2002; Frick *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006; Jung *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2011), porém a influência das  $I_K$  nesse processo não pode ser descartada

(Kratzer *et al.*, 2013). Os canais  $K_v1.4$ ,  $K_v4.2$  e  $K_v4.3$  participam da geração das  $I_A$  em neurônios piramidais corticais (Norris e Nerbonne, 2010), enquanto os  $K_v2.1$  são os principais responsáveis pela  $I_K$  em neurônios hipocampais (Murakoshi e Trimmer, 1999; Du *et al.*, 2000).

A toxina HgeTx1 é proveniente da peçonha do escorpião *Hadrurus gertschi*, encontrado em território mexicano (Schwartz *et al.*, 2006). Ela é um peptídeo com 36 resíduos de aminoácidos, quatro pontes dissulfeto e massa molecular de 3950 Da. A HgeTx1 bloqueia canais para  $K^+$  do tipo *Shaker B* de inseto, análogo aos  $K_v1$  de mamíferos, tendo Kd de 52 nM (Schwartz *et al.*, 2006).

A ScTx1 foi descrita por Escoubas *et al.* (2002). Eles purificaram essa toxina da peçonha da aranha *Stromatopelma calceata*, encontrada no continente africano. A ScTx1 é um peptídeo com 34 resíduos de aminoácidos, três pontes dissulfeto e massa molecular de 3788,62 Da. Ela bloqueia canais  $K_v2.1$ ,  $K_v2.2$  e  $K_v4.2$  tendo  $IC_{50}$  de 12,7 nM, 21,4 nM e 1,2 nM, respectivamente, e não possui efeito significativo sobre canais  $K_v1$  e nem influencia as correntes de  $Na^+$  ou  $Ca^{2+}$  presentes em células granulares cerebelares de rato (Escoubas, *et al.*, 2002). Com base em modelagem computacional, Shiau *et al.* (2003) propuseram a estrutura tridimensional da ScTx1 e realizaram estudos de interação (*docking*) com o canal  $K_v2.1$ , revelando fortes interações/ligações entre vários resíduos das duas moléculas. Essa toxina tem sido usada em pesquisas que tentam estabelecer o papel de canais  $K_v2.1$  na atividade neuronal. Guan *et al.* (2007) utilizaram a ScTx1 para investigar a ação desses canais em neurônios piramidais supraganglionares dos córtices somatossensorial e motor de ratos adultos. Guan *et al.* (2011) lançaram mão dessa toxina para estabelecer a ontogenia das correntes de  $K^+$  mediadas por canais  $K_v2.1$  em neurônios neocorticais.

Portanto, neste capítulo testamos indiretamente nossa hipótese. Segundo essa, os canais para  $K_v1$  contribuem positivamente para a aprendizagem e formação de memória espacial, enquanto os  $K_v2$  têm efeito oposto no mesmo fenômeno. Para alcançar este objetivo usamos a indução de LTP como modelo molecular/celular da memória. A intensão foi influenciar esse fenômeno bloqueando hora os canais  $K_v1$  e hora os  $K_v2$ , utilizando duas toxinas específicas para isso. Como a HgeTx1 é uma bloqueadora específica de canais  $K_v1$  predizemos que a HgeTx1, quando administrada às fatias de cérebros de ratos, irá bloquear ou

minimizar a indução da LTP. Já a ScTx1, que bloqueia canais  $K_v2$ , prevemos que o seu emprego irá potencializar a indução de LTP.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Obtenção das toxinas

#### 1.1. HgeTx1

Como já mencionado na introdução, a toxina HgeTx1 é bloqueadora de canais para  $K^+$  do tipo *Shaker B*, análogo aos  $K_v1$  de mamíferos (Schwartz *et al.*, 2006). Resultados ainda não publicados pelo nosso grupo, obtidos em colaboração com o grupo do Dr. Lourival D. Possani da Universidade Nacional Autônoma do México, mostram que essa toxina possui maior especificidade para canais  $K_v1.1$ , entre os canais  $K_v1$ , e que não age em  $K_v2$  (comunicação oral).

A peçonha bruta obtida a partir da estimulação elétrica de escorpiões *H. gertschi* foi fornecida pelo Dr. Possani. O material foi extraído com água ultrapura (milli-Q) e centrifugado a 10.000 g por 10 min e o sobrenadante, liofilizado. Em nosso laboratório, esse foi reconstituído em água ultrapura e fracionado pela cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high-performance liquid chromatography*) em fase reversa usando uma coluna  $C_{18}$  analítica (250 x 4,60 mm, 4  $\mu$ m, Phenomenex, EUA). O fracionamento ocorreu sob um fluxo de 1 mL/min e usando um gradiente que começou com 100 % da solução A (0,12 % de ácido trifluoacético - TFA em água ultrapura) e 0 % de solução B (0,10 % de TFA em acetonitrila) e aumentou linearmente (1 %/min) até 60 % da solução B em 60 min. Com o objetivo de obter a toxina pura, a fração de interesse foi submetida novamente à HPLC só que usando um gradiente linear que começou com 100 % da solução A e terminou com 40% de B em 60 min (foi usada coluna  $C_{18}$  analítica supracitada). O fracionamento foi realizado no sistema Shimadzu (Kyoto, Japão) série LC10A, equipado com um detector de arranjo de diodo SPD-M10A e acoplado a um computador. O monitoramento da eluição foi feito por leitura das absorvâncias a 216 e a 230 nm (Schwartz *et al.*, 2006). As frações cromatográficas foram manualmente coletadas, secas a vácuo e armazenadas a -20 °C. A HgeTx1 pura foi quantificada em espectrofotômetro NanoVue (GE Health care).

O peptídeo obtido pelo fracionamento em HPLC teve sua pureza e massa determinada por meio da espectrometria de massa (MS) do tipo *Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight* (MALDI-TOF) no sistema MALDI TOF/TOF UltraFlex III (Bruker Daltonics, Alemanha) operando em modo positivo refletido e linear. Neste caso, a fração de interesse foi

reconstituída em água ultrapura e, então, dissolvida em uma matriz saturada de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (acetonitrila/água/TFA 3%; 5:4:1).

Para determinação da sequência primária (sequenciamento *de novo*) parcial do peptídeo de interesse em modo MS/MS (duas etapas de MS acopladas), foi feita sua fragmentação diretamente na fonte pela técnica MALDI *in source decay* (ISD). Para isso a amostra de interesse foi dissolvida em matriz 1,5-diaminonaftaleno (acetonitrila/água/TFA 3%; 5:4:1).

As análises de espectrometria de massa e o sequenciamento MS/MS foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massa (EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia) em colaboração com o Dr. Carlos Bloch Jr. O equipamento utilizado foi calibrado com uma mistura de peptídeos de massa molecular conhecida. A análise dos dados foi realizada nos programas MassLynx 3.5 e FlexAnalysis 3.3.

## **1.2. ScTx1**

A toxina ScTx1 bloqueia  $K_v2.1$  e não possui efeito significativo sobre canais  $K_v1$  (Escoubas *et al.*, 2002). A ScTx1 utilizada neste trabalho foi comprada da Alomone Labs (Jerusalem, Israel).

## **2. Animais**

Utilizaram-se ratos Wistar machos como descrito no item 1 do material e métodos do capítulo 2. Para os experimentos deste capítulo foram utilizados 15 ratos no total.

## **3. Soluções dos testes eletrofisiológicos**

### **3.1. Solução de corte**

Preparada como descrito no item 3.2.1 do material e métodos do capítulo 2.

### **3.2. Solução de banho/registo**

Preparada como descrito no item 3.2.2 do material e métodos do capítulo 2.

#### **4. Teste eletrofisiológico (registro de potencial de campo): indução de LTP**

Os registros eletrofisiológicos foram realizados em fatias de cérebro que receberam diferentes tratamentos farmacológicos. O procedimento utilizado está descrito no item 4 do material e métodos do capítulo 2. Os dados finais para cada tratamento são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Foram constituídos os seguintes grupos com base nas soluções que banhavam os tecidos (pelo menos 20 min de banho):

- Grupo controle: banhado por LCRA;
- Grupo ScTx1: solução de 6,60 nM ScTx1 (25 ng/mL) em LCRA; e
- Grupo HgeTx1: solução de 0,32 nM HgeTx1 (1,25 ng/mL) em LCRA.

#### **5. Análise estatística**

Para a análise estatística dos resultados envolvendo diferentes tratamentos, empregou-se a análise de variância (ANOVA) de uma via. Quando a ANOVA indicou haver diferenças significativas, realizou-se o teste de Tukey para comparações múltiplas. Quando se comparou os resultados de um grupo antes e depois do tratamento, foi utilizado o teste t para observações pareadas. Foi considerado um nível de significância de 0,05. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa R, versão 2.15.0, e os gráficos gerados no programa Excel.

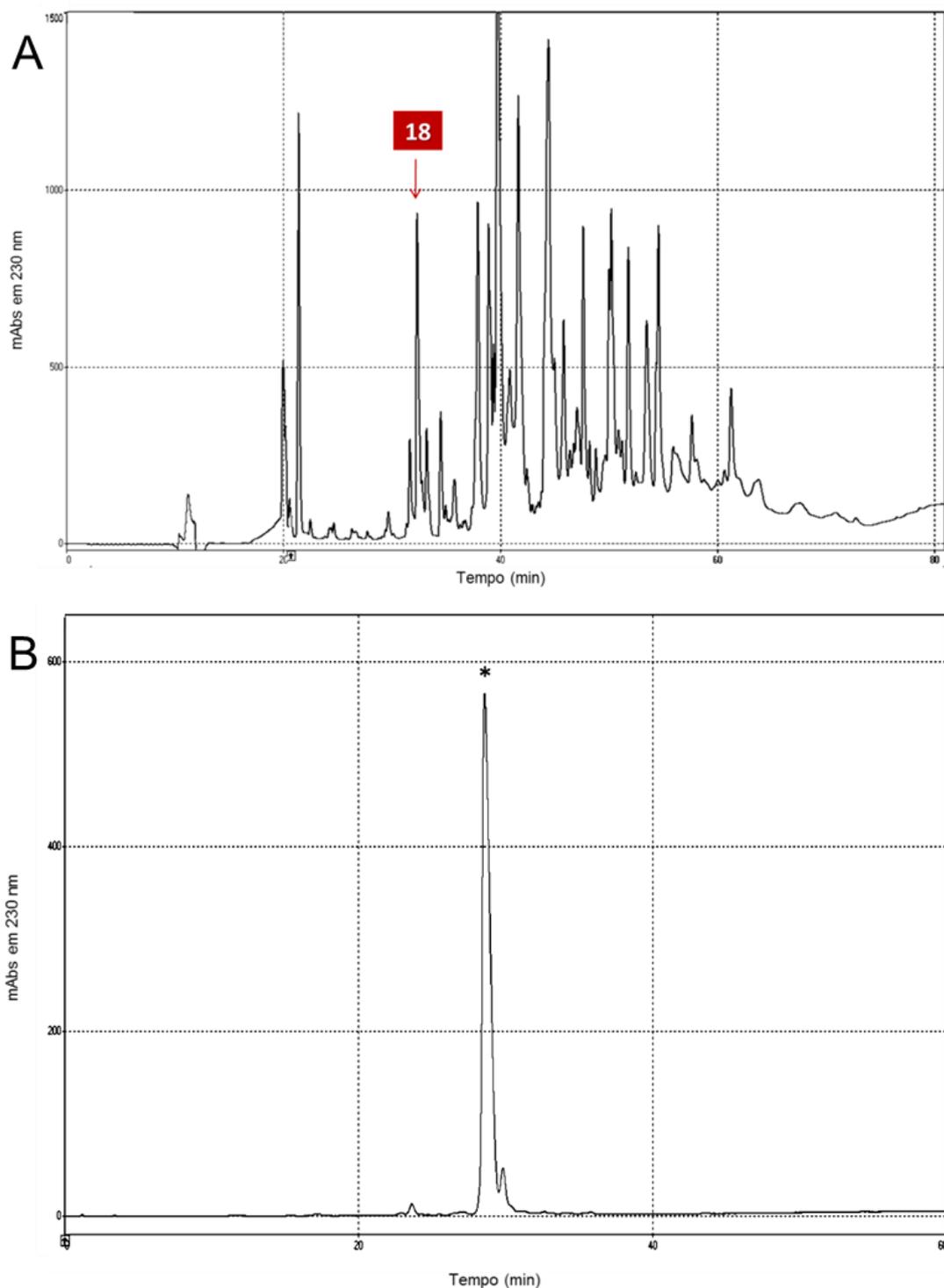
## RESULTADOS

### 1. Purificação da HgeTx1

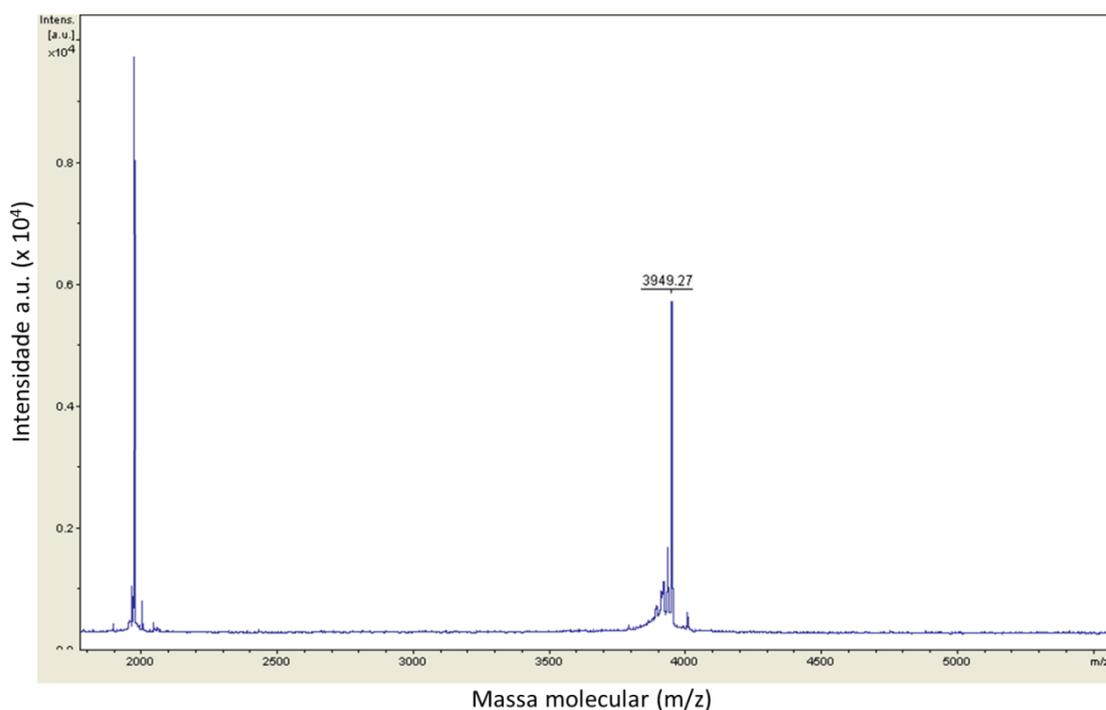
A Figura 4.1A mostra o cromatograma do fracionamento da peçonha bruta de *H. gertschi*. Foram coletadas mais de 60 frações, sendo que a de número 18 foi submetida a um segundo fracionamento em HPLC (Fig.4.1B). Essa fração eluiu aos 32,2 min e representou 3,5 % da peçonha bruta. A análise de espectrometria de massa dessa recromatografia revelou a presença de um único componente como massa molecular ((M+H)<sup>+</sup>) de 3949,27 Da (Fig.4.2), que é semelhante aos 3950 Da da HgeTx1 descrita por Schwartz *et al.* (2006). O sequenciamento parcial desse peptídeo gerou a sequência aminoácidos AKGCKHKGKCMNRKCHC, que apresenta 100% de identidade com um segmento da HgeTx1 (Schwartz *et al.*, 2006). Esses dois dados (massa molecular e sequência parcial) confirmam que o principal componente fração 18 da cromatografia da peçonha bruta de *H. gertschi* é a toxina HgeTx1.

### 2. Indução de LTP na presença das toxinas

Como mostrado na Fig. 4.3, a indução de LTP ocorreu com sucesso nas fatias dos cérebros de ratos do grupo controle (n = 6, sendo o registro de 6 fatias de 6 ratos diferentes). Podemos observar que, durante os 10 minutos anteriores à estimulação tetânica (resposta basal), o registro do potencial de campo excitatório pós-sináptico (PCEPS) evocado foi constante. Como os dados de cada fatia foram normalizados com base na resposta basal dela mesma (ver item 4 do material e métodos), o valor médio do grupo controle para a inclinação das curvas dos PCEPS durante os 10 min pré-estimulação tetânica foi de 100,00 ± 0,22 %. Essa resposta mensurada entre 50 e 60 min após a estimulação tetânica aumentou para 143,15 ± 0,21 % ( $t_{(5)} = -7,550$ ,  $p < 0,001$ ). A ANOVA mostrou que também houve diferença na indução de LTP entre os grupos controle, ScTx1 e HgeTx1 ( $F_{(5,30)} = 42,98$ ,  $p < 0,001$ ).



**Figura 4.1.** Purificação da HgeTx1. A, perfil cromatográfico da peçonha bruta (1,0 mg) de *Hadrurus gertschi* separada em coluna analítica C<sub>18</sub> por HPLC de fase reversa usando um gradiente linear de 100% de solução A (0,12 % de ácido trifluacético - TFA em água ultrapura) até 60 % da solução B (0,10 % de TFA em acetonitrila) em 60 min. B, recromatografia da fração 18 usando um gradiente linear de 100 % da solução A até 40 % da solução B em 60 min. A fração marcada com asterisco seguiu para análise de espectrometria de massa.

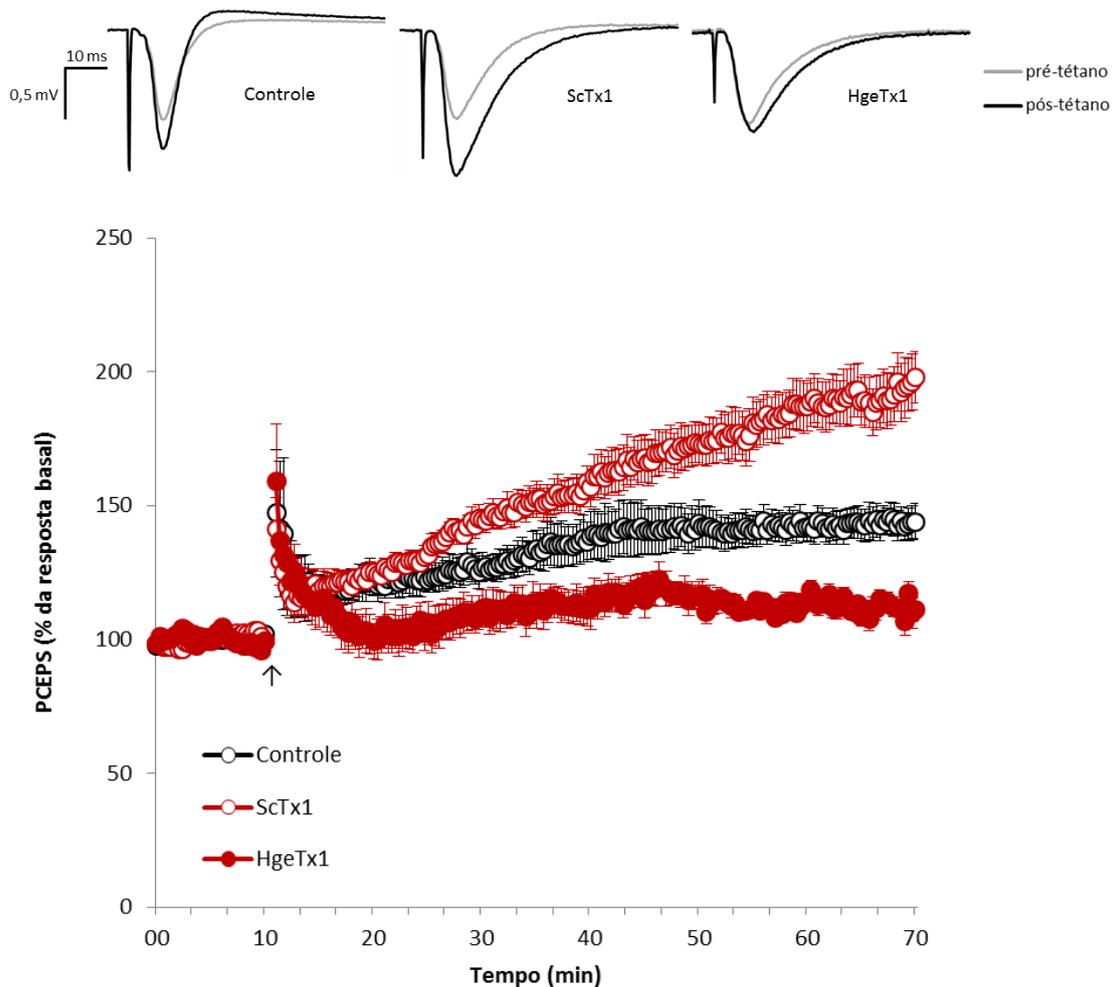


**Figura 4.2.** Espectro de massa da principal fração da recromatografia da fração 18 da peçonha de *Hadrurus gertschi*. Massa molecular  $(M+H)^+$  de 3949,27 m/z obtida por sistema MALDI TOF/TOF MS. O primeiro pico  $((M+H)^+)$  de 1974,635 m/z corresponde ao mesmo componente com dois prótons.

No grupo HgeTx1 (n = 6, sendo o registro de 6 fatias de 4 ratos diferentes), a toxina de escorpião bloqueadora de canais  $K_v1$  reduziu a magnitude da LTP (Fig. 4.3). Nos dez minutos antes da estimulação tetânica, a resposta foi de  $100,00 \pm 0,39$  % e, entre 50 e 60 min depois, ela estava elevada para  $112,71 \pm 0,50$  % ( $t(5) = -3,971$ ,  $p < 0,05$ ). Apesar do aumento, esse resultado foi significativamente menor quando comparado ao do grupo controle ( $143,15 \pm 0,21$  %, teste Tukey,  $p < 0,05$ ), sugerindo que o bloqueio dos canais  $K_v1$  de neurônios hipocâmpais de CA1 mitigou a indução de LTP.

A administração de ScTx1 na solução de banho das fatias de cérebros do grupo ScTx1 (n = 6, sendo o registro de 6 fatias de 4 ratos diferentes) intensificou o aumento da inclinação das curvas dos potenciais de campos evocados depois da estimulação tetânica (Fig 4.3). Como já esperado, a resposta nos 10 min pré-estimulação tetânica foi de  $100,00 \pm 0,35$  %. Porém, o valor da inclinação das curvas (50-60 min) após a estimulação foi  $190,45 \pm 0,55$  % ( $t(5) = -7.946$ ,  $p < 0,001$ ), um aumento significativamente maior que o observado no grupo controle ( $143,15 \pm$

0,21 %, teste Tukey,  $p < 0,001$ ). Portanto, o bloqueio dos canais  $K_v2$  de neurônios hipocâmpais de CA1 pela ScTx1 potencializou a indução de LTP.



**Figura 4.3.** Influência das toxinas ScTx1 e HgeTx1 na indução de LTP. As médias ( $\pm$  EPM) da inclinação da curva dos potenciais de campo excitatórios pós-sinápticos (PCEPS) são apresentadas como porcentagem da resposta basal (obtida durante 10 minutos anteriores à estimulação tetânica) ao longo do tempo. O momento dessa estimulação é indicado pela seta. Os círculos pretos abertos representam o grupo controle (sem toxina,  $n = 6$ ); os vermelhos abertos, o grupo ScTx1 (recebeu 6,60 nM ScTx1,  $n = 6$ ); e os vermelhos fechados, o grupo HgeTx1 (recebeu 0,32 nM HgeTx1,  $n = 6$ ). Os traçados acima da figura são exemplos de curvas obtidas para cada um dos tratamentos e apresentam os valores sobrepostos dos potenciais de campos evocados antes (cinza) e 60 min após a estimulação tetânica (cada traçado é a média de 10 sweeps)

## DISCUSSÃO

A HgeTx1 foi purificada com sucesso. No trabalho de Schwartz *et al.* (2006), essa toxina estava presente na fração que eluiu com 25 minutos de corrida e, portanto, com 25 % de acetonitrila, pois a separação começou com 0 % desse reagente que aumentou 1 %/min. Em nossos experimentos, a HgeTx1 estava contida na fração que teve tempo de retenção de 32 min, logo sua eluição foi com 32 % de acetonitrila. Estas diferenças podem ser explicadas por termos usado uma coluna analítica e fluxo de soluções de 1 mL/min, enquanto Schwartz *et al.* (2006) utilizaram uma coluna semi-preparativa e fluxo de 2 mL/min. Entretanto, a porcentagem de toxina obtida em relação ao total da peçonha bruta obtida por nós (3,5 %) foi semelhante a deles (4 %).

O bloqueio de canais  $K_v$  pela ScTx1 promoveu a potencialização da indução de LTP (Fig. 4.3). Essa toxina age sobre canais  $K_v2.1$  (Escoubas *et al.*, 2002) que são os principais responsáveis pela corrente  $I_K$  de neurônios hipocámpais de ratos (Murakoshi e Trimmer, 1999). Além disso, esses canais são encontrados no corpo celular e na região proximal dos dendritos de neurônios piramidais neocorticais e hipocámpais onde formam agrupamentos (Du *et al.*, 1998; Murakoshi e Trimmer, 1999; Lim *et al.*, 2000). O bloqueio da expressão de canais  $K_v2.1$  por oligonucleotídeos antisense contra seu mRNA, em neurônios hipocámpais de CA1 de ratos em cultura, levou à redução seletiva de correntes de efluxo de  $K^+$  (Du *et al.*, 2000). Isso resultou não só no aumento da fase de repolarização de potenciais de ação ativados pela estimulação pré-sináptica (colaterais de Schaffer) de frequência mais elevada (1,0 Hz) em fatias da formação hipocámpal, mas também no prolongamento da elevação da concentração intracelular de  $Ca^{2+}$  em neurônios de CA1 (Du *et al.*, 2000). Interessantemente, Misonou *et al.* (2005) propuseram que os canais  $K_v2.1$  fariam parte de um sistema de controle intrínseco dos neurônios hipocámpais que regularia a excitabilidade e concentração intracelular de  $Ca^{2+}$ , protegendo-os dos efeitos excitotóxicos da transmissão glutamatérgica. Confirmando parcialmente isso, Mohapatra *et al.* (2009) conseguiram abolir essa regulação intrínseca da excitabilidade neuronal bloqueando farmacologicamente os canais  $K_v2.1$ . Eles mostraram que neurônios hipocámpais de ratos em cultura geram potenciais de ação em resposta a infusão de glutamato. Com a administração contínua desse neurotransmissor, as células neuronais

diminuem gradativamente seus disparos. Esse fenômeno foi revertido pela administração de HaTx1 (Mohapatra *et al.*, 2009), uma toxina da peçonha da aranha *Grammostola spatulata* bloqueadora de canais  $K_v2.1$  (Swartz e MacKinnon, 1995). Portanto, em nossos experimentos com fatias da formação hipocampal de cérebros de rato, o bloqueio de canais  $K_v2.1$  pela ScTx1 pode ter permitido um aumento acima do normal da concentração do íon cálcio nos neurônios de CA1. Isso poderia ser responsável pela potenciação da indução de LTP, processo que é mediado pelo aumento intracelular de  $Ca^{2+}$  nos neurônios pós-sinápticos (Lynch, 2004).

O bloqueio de canais  $K_v1$  pela HgeTx1 diminuiu a magnitude da LTP em neurônios hipocampais de CA1 induzida pela estimulação tetânica dos colaterais de Schaffer (Fig. 4.3). Os canais  $K_v1$  ( $K_v1.1$ ,  $K_v1.2$  e  $K_v1.4$ ) se localizam predominantemente nos axônios e terminais axonais de neurônios hipocampais (Rhodes *et al.*, 1997; Monaghan *et al.*, 2001). Os canais  $K_v1.1$  parecem ser particularmente encontrados nos colaterais de Schaffer em associação com a subunidade auxiliar  $K_v\beta1$  (Rhodes *et al.*, 1997; Monaghan *et al.*, 2001). Os canais  $K_v1.1$ , quando expressos sozinhos em oócitos de *Xenopus*, produzem correntes de  $K^+$  do tipo  $I_K$ , porém, quando co-expressos com as subunidades  $K_v\beta1$ , passam a gerar correntes transientes de íons potássio ( $I_A$ ) com rápida ativação e inativação (Rettig *et al.*, 1994; Lu *et al.*, 2008). Esses canais  $K_v1/K_v\beta1$  se inativam rapidamente, mas demoram para se recuperar dessa inativação o que os fariam responsáveis pelo alargamento dos potenciais de ação causado pela estimulação de alta frequência (*activity-dependent spike broadening*) pré-sinápticos nas fibras musgosas de fatias da formação hipocampal de ratos (Geiger e Jonas, 2000). Esse fenômeno seria importante para o aumento intracelular de  $Ca^{2+}$  no terminal axonal e liberação de neurotransmissores e, portanto, para a eficiência da transmissão sináptica em condições de alta atividade neuronal (Geiger e Jonas, 2000). O bloqueio dessas correntes de  $K^+$  em fatias da formação hipocampal de camundongos pela DTX, toxina da peçonha da serpente *Dendroaspis angusticeps* bloqueadora de canais  $K_v1.1$  e  $K_v1.2$  (Grissmer *et al.*, 1994), produz uma perturbação do padrão temporal de geração de potenciais de ação (*spike timing precision*) do circuito tri-sináptico hipocampal (Simeone *et al.*, 2013). O produto desse bloqueio é uma desorganização da atividade oscilatória circuito córtex entorrinal → giro denteado → CA3 → CA1, resultando em comportamento oscilatório patológico (Simeone *et al.*, 2013). Essas evidências sugerem, então, que o efeito da frequência de estimulação sobre a transmissão

sináptica na formação hipocampal é modulada pelos canais  $K_v1.1$ , localizados nos axônios dos neurônios desse circuito neuronal. Interessantemente, Yeckel e Berger (1998) mostraram que a indução *in vivo* de LTP de neurônios do giro denteado e de CA3 em coelhos pela estimulação da via perfurante é dependente tanto da frequência de estimulação, quanto de características moleculares e celulares intrínsecas de cada ponto da rede tri-sináptica hipocampal. Portanto, propomos que o bloqueio dos canais  $K_v1.1/K_v\beta1$  nas fatias da formação hipocampal pela HgeTx1 leva à perda do alargamento dos potenciais de ação (*activity-dependent spike broadening*) nos colaterais de Schaffer, resultando em uma desestabilização da transmissão sináptica, o que explicaria a minimização da indução de LTP. Interessantemente, Giese *et al.* (1998) observaram que camundongos, modificados geneticamente para não expressarem a subunidade  $K_v\beta1$ , apresentavam  $I_A$  e *activity-dependent spike broadening* reduzidos e prejuízo de memória espacial no labirinto aquático de Morris.

Os resultados deste capítulo nos permitem avaliar nossa hipótese. As respostas da indução de LTP foram influenciadas pela presença de toxinas de aracnídeos que agem especificamente em canais iônicos para  $K^+$  voltagem-dependentes. O bloqueio de  $K_v1.1$  pela HgeTx1 dificultou, enquanto a repressão de  $K_v2.1$  pela ScTx1 potencializou o fenômeno. Assumindo que a LTP é responsável, pelo menos em parte, pela formação da memória espacial, esses resultados corroboram nossa hipótese que os  $K_v1.1$  contribuem positivamente, e os  $K_v2.2$ , negativamente, nos processos da memória. Porém, vale fazer duas ressalvas. Primeiramente, esses resultados com indução de LTP na presença das toxinas devem ser confirmados em ensaios comportamentais que avaliam formação de memória espacial. Segundo, a hipótese deste trabalho e os resultados experimentais passam uma falsa ideia de dualidade, bom e ruim, para o papel dos canais  $K_v$  na atividade da formação hipocampal saudável. É importante lembrar que ambos fazem parte de mecanismos regulatórios (Wickenden, 2002; Misonou *et al.*, 2005) e que a atuação conjunta e complementar dos canais  $K_v1$  e  $K_v2$  contribuem para um adequado funcionamento hipocampal.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLISS, T. V. & COLLINGRIDGE, G. L. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361, 31-9.
- BROWN, D. A., GAHWILER, B. H., GRIFFITH, W. H. & HALLIWELL, J. V. 1990. Membrane currents in hippocampal neurons. *Prog Brain Res*, 83, 141-60.
- CHEN, X. & JOHNSTON, D. 2004. Properties of single voltage-dependent K<sup>+</sup> channels in dendrites of CA1 pyramidal neurones of rat hippocampus. *J Physiol*, 559, 187-203.
- CHEN, X., YUAN, L. L., ZHAO, C., BIRNBAUM, S. G., FRICK, A., JUNG, W. E., SCHWARZ, T. L., SWEATT, J. D. & JOHNSTON, D. 2006. Deletion of Kv4.2 gene eliminates dendritic A-type K<sup>+</sup> current and enhances induction of long-term potentiation in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci*, 26, 12143-51.
- DU, J., HAAK, L. L., PHILLIPS-TANSEY, E., RUSSELL, J. T. & MCBAIN, C. J. 2000. Frequency-dependent regulation of rat hippocampal somato-dendritic excitability by the K<sup>+</sup> channel subunit Kv2.1. *J Physiol*, 522 Pt 1, 19-31.
- DU, J., TAO-CHENG, J. H., ZERFAS, P. & MCBAIN, C. J. 1998. The K<sup>+</sup> channel, Kv2.1, is apposed to astrocytic processes and is associated with inhibitory postsynaptic membranes in hippocampal and cortical principal neurons and inhibitory interneurons. *Neuroscience*, 84, 37-48.
- ESCOUBAS, P., DIOCHOT, S., CELERIER, M. L., NAKAJIMA, T. & LAZDUNSKI, M. 2002. Novel tarantula toxins for subtypes of voltage-dependent potassium channels in the Kv2 and Kv4 subfamilies. *Mol Pharmacol*, 62, 48-57.
- FRICK, A., MAGEE, J. & JOHNSTON, D. 2004. LTP is accompanied by an enhanced local excitability of pyramidal neuron dendrites. *Nat Neurosci*, 7, 126-35.
- GEIGER, J. R. & JONAS, P. 2000. Dynamic control of presynaptic Ca<sup>2+</sup> inflow by fast-inactivating K<sup>+</sup> channels in hippocampal mossy fiber boutons. *Neuron*, 28, 927-39.
- GIESE, K. P., STORM, J. F., REUTER, D., FEDOROV, N. B., SHAO, L. R., LEICHER, T., PONGS, O. & SILVA, A. J. 1998. Reduced K<sup>+</sup> channel inactivation, spike broadening, and after-hyperpolarization in Kvbeta1.1-deficient mice with impaired learning. *Learn Mem*, 5, 257-73.

- GRISSEMER, S., NGUYEN, A. N., AIYAR, J., HANSON, D. C., MATHER, R. J., GUTMAN, G. A., KARMILOWICZ, M. J., AUPERIN, D. D. & CHANDY, K. G. 1994. Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K<sup>+</sup> channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Mol Pharmacol*, 45, 1227-34.
- GUAN, D., HORTON, L. R., ARMSTRONG, W. E. & FOEHRING, R. C. 2011. Postnatal development of A-type and Kv1- and Kv2-mediated potassium channel currents in neocortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol*, 105, 2976-88.
- GUAN, D., TKATCH, T., SURMEIER, D. J., ARMSTRONG, W. E. & FOEHRING, R. C. 2007. Kv2 subunits underlie slowly inactivating potassium current in rat neocortical pyramidal neurons. *J Physiol*, 581, 941-60.
- JUNG, S. C., KIM, J. & HOFFMAN, D. A. 2008. Rapid, bidirectional remodeling of synaptic NMDA receptor subunit composition by A-type K<sup>+</sup> channel activity in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Neuron*, 60, 657-71.
- KRATZER, S., MATTUSCH, C., METZGER, M. W., DEDIC, N., NOLL-HUSSONG, M., KAFITZ, K. W., EDER, M., DEUSSING, J. M., HOLSBOER, F., KOCHS, E. & RAMMES, G. 2013. Activation of CRH receptor type 1 expressed on glutamatergic neurons increases excitability of CA1 pyramidal neurons by the modulation of voltage-gated ion channels. *Front Cell Neurosci*, 7, 91.
- LIM, S. T., ANTONUCCI, D. E., SCANNEVIN, R. H. & TRIMMER, J. S. 2000. A novel targeting signal for proximal clustering of the Kv2.1 K<sup>+</sup> channel in hippocampal neurons. *Neuron*, 25, 385-97.
- LU, Q., PEEVEY, J., JOW, F., MONAGHAN, M. M., MENDOZA, G., ZHANG, H., WU, J., KIM, C. Y., BICKSLER, J., GREENBLATT, L., LIN, S. S., CHILDERS, W. & BOWLBY, M. R. 2008. Disruption of Kv1.1 N-type inactivation by novel small molecule inhibitors (disinactivators). *Bioorg Med Chem*, 16, 3067-75.
- LYNCH, M. A. 2004. Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev*, 84, 87-136.
- MATHIE, A., WOOLTORTON, J. R. & WATKINS, C. S. 1998. Voltage-activated potassium channels in mammalian neurons and their block by novel pharmacological agents. *Gen Pharmacol*, 30, 13-24.

- MISONOU, H., MOHAPATRA, D. P. & TRIMMER, J. S. 2005. Kv2.1: a voltage-gated k<sup>+</sup> channel critical to dynamic control of neuronal excitability. *Neurotoxicology*, 26, 743-52.
- MOHAPATRA, D. P., MISONOU, H., PAN, S. J., HELD, J. E., SURMEIER, D. J. & TRIMMER, J. S. 2009. Regulation of intrinsic excitability in hippocampal neurons by activity-dependent modulation of the KV2.1 potassium channel. *Channels*, 3, 46-56.
- MONAGHAN, M. M., TRIMMER, J. S. & RHODES, K. J. 2001. Experimental localization of Kv1 family voltage-gated K<sup>+</sup> channel alpha and beta subunits in rat hippocampal formation. *J Neurosci*, 21, 5973-83.
- MURAKOSHI, H. & TRIMMER, J. S. 1999. Identification of the Kv2.1 K<sup>+</sup> channel as a major component of the delayed rectifier K<sup>+</sup> current in rat hippocampal neurons. *J Neurosci*, 19, 1728-35.
- NORRIS, A. J. & NERBONNE, J. M. 2010. Molecular dissection of I(A) in cortical pyramidal neurons reveals three distinct components encoded by Kv4.2, Kv4.3, and Kv1.4 alpha-subunits. *J Neurosci*, 30, 5092-101.
- RAMAKERS, G. M. & STORM, J. F. 2002. A postsynaptic transient K(+) current modulated by arachidonic acid regulates synaptic integration and threshold for LTP induction in hippocampal pyramidal cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 10144-9.
- RETTIG, J., HEINEMANN, S. H., WUNDER, F., LORRA, C., PARCEJ, D. N., DOLLY, J. O. & PONGS, O. 1994. Inactivation properties of voltage-gated K<sup>+</sup> channels altered by presence of beta-subunit. *Nature*, 369, 289-94.
- RHODES, K. J., STRASSLE, B. W., MONAGHAN, M. M., BEKELE-ARCURI, Z., MATOS, M. F. & TRIMMER, J. S. 1997. Association and colocalization of the Kvbeta1 and Kvbeta2 beta-subunits with Kv1 alpha-subunits in mammalian brain K<sup>+</sup> channel complexes. *J Neurosci*, 17, 8246-58.
- ROGAWSKI, M. A. 1985. The a-Current - How ubiquitous a feature of excitable cells is it. *Trends Neurosci*, 8, 214-219.
- SCHWARTZ, E. F., SCHWARTZ, C. A., GOMEZ-LAGUNAS, F., ZAMUDIO, F. Z. & POSSANI, L. D. 2006. HgeTx1, the first K<sup>+</sup>-channel specific toxin characterized from the venom of the scorpion *Hadrurus gertschi* Soleglad. *Toxicon*, 48, 1046-53.

- SHIAU, Y. S., HUANG, P. T., LIOU, H. H., LIAW, Y. C., SHIAU, Y. Y. & LOU, K. L. 2003. Structural basis of binding and inhibition of novel tarantula toxins in mammalian voltage-dependent potassium channels. *Chem Res Toxicol*, 16, 1217-25.
- SIMEONE, T. A., SIMEONE, K. A., SAMSON, K. K., KIM DO, Y. & RHO, J. M. 2013. Loss of the Kv1.1 potassium channel promotes pathologic sharp waves and high frequency oscillations in in vitro hippocampal slices. *Neurobiol Dis*, 54, 68-81.
- STORM, J. F. 1990. Potassium currents in hippocampal pyramidal cells. *Prog Brain Res*, 83, 161-87.
- SWARTZ, K. J. & MACKINNON, R. 1995. An inhibitor of the Kv2.1 potassium channel isolated from the venom of a Chilean tarantula. *Neuron*, 15, 941-9.
- WICKENDEN, A. D. 2002. Potassium channels as anti-epileptic drug targets. *Neuropharmacology*, 43, 1055-60.
- YECKEL, M. F. & BERGER, T. W. 1998. Spatial distribution of potentiated synapses in hippocampus: dependence on cellular mechanisms and network properties. *J Neurosci*, 18, 438-50.
- ZHAO, C., WANG, L., NETOFF, T. & YUAN, L. L. 2011. Dendritic mechanisms controlling the threshold and timing requirement of synaptic plasticity. *Hippocampus*, 21, 288-97.
- ZHOU, F. M. & HABLITZ, J. J. 1996. Layer I neurons of the rat neocortex. II. Voltage-dependent outward currents. *J Neurophysiol*, 76, 668-82.

# Conclusões

O objetivo desta sessão é apresentar as conclusões da tese, além de sugerir uma explicação para o papel dos canais  $K_v1.1$  e  $K_v2.1$  nos processos de aprendizagem e memória.

## CONCLUSÕES

As conclusões do trabalho são:

1. O bloqueio dos canais  $K_v$  de neurônios hipocâmpais é capaz de reverter o déficit de memória espacial e a supressão da indução da potenciação de longo prazo (LTP) causados pela escopolamina.

A escopolamina é uma antagonista do receptor muscarínico, portanto tem ação anti-colinérgica. É sabido que esse fármaco tem efeito amnésico, o que foi confirmado pela administração intraperitoneal em ratos submetidos repetidamente ao campo aberto (capítulo 2). Esse procedimento leva à habituação espacial que é uma forma menos complexa de aprendizagem e memória espacial. Além disso, a escopolamina impediu a indução de LTP na formação hipocâmpal de fatias de cérebros de ratos, considerado um dos mecanismos responsáveis pela memória espacial, entre outras (capítulo 2). Esses efeitos negativos foram abolidos, pelo menos em parte, pelo bloqueio dos canais  $K_v$  por meio da administração de 4-aminopiridina (4-AP) na formação hipocâmpal (capítulo 2).

2. Os canais  $K_v$  participam dos processos normalmente responsáveis pelo aprendizado e memória espacial.

Não foram encontrados relatos na literatura de experimentos que demonstram que os canais  $K_v$  participavam dos processos de aprendizagem e memória espacial em condições normais, isto é, sem comprometimento da formação hipocâmpal por lesão ou manipulação química. No capítulo 3, ficou evidenciado que o bloqueio dos canais  $K_v$  pela 4-AP intrahipocâmpal em ratos normais melhorou o desempenho desses em testes comportamentais de memória espacial (labirinto aquático de Morris e labirinto radial de oito braços).

3. Entre os canais  $K_v$ , os subtipos  $K_v1.1$  e  $K_v2.1$  não só influenciam a os mecanismos relacionados a formação de memória espacial, mais também possuem ações distintas nesse processo.

No capítulo 4, o bloqueio de canais  $K_v1.1$  ou  $K_v2.1$  por meio das toxinas de aracnídeos HgeTx1 e ScTx1, respectivamente, influenciou a indução de LTP na formação hipocampal de fatias de cérebro de ratos. Interessantemente, os efeitos foram opostos o que sugere que os canais  $K_v1.1$  e  $K_v2.1$  possuem funções distintas e regulatórias na formação da memória espacial.

### **SUGESTÃO DO PAPEL DOS CANAIS $K_v$ NA FORMAÇÃO DA MEMÓRIA**

Com base os resultados obtidos nesta tese e nas poucas evidências coletadas na literatura científica, nós fazemos a seguinte consideração sobre um eventual papel dos canais  $K_v$  em processos da memória.

Os canais  $K_v$  participam sim do estabelecimento da aprendizagem e formação de memória dependente da formação hipocampal. Particularmente, dois subtipos deles, os  $K_v1.1$  e  $K_v2.1$ , influenciam esses processos como coadjuvantes, e não como responsáveis principais. Eles agiriam de forma integrada e complementar promovendo ação regulatória e protetora da atividade hipocampal relacionada à memória. Em uma situação na qual o indivíduo deve aprender uma nova informação factual, episódica ou espacial, a formação hipocampal é recrutada como um dos atores críticos nesse processo. Essa estrutura do lobo temporal medial é tomada por um aumento da entrada de informação proveniente do neocórtex, via córtices do giro parahipocampal (PH – córtices entorrinal e perirrinal) (Solari e Stoner, 2011). Essa informação é codificada pela frequência de disparo dos potenciais de ação (PA) e pela população de neurônios ativados (Wilson e McNaughton, 1993; Yeckel e Berger, 1998). O resultado é uma exacerbação da atividade do circuito tri-sináptico da formação hipocampal: PH → giro denteado → CA3 → CA1. Nesta situação, os canais  $K_v1.1$  participariam de mecanismos pré-sinápticos modulatórios que assegurariam o padrão de frequência de disparos de PA e a eficiência da transmissão sináptica (Grissmer *et al.*, 1994; Geiger e Jonas, 2000) para a promoção do fenômeno de aprendizagem. Por outro lado, se esse aumento de atividade

ultrapassar certo limite pode elevar perigosamente a concentração intracelular pós-sináptica de  $\text{Ca}^{2+}$ , acarretando consequências danosas para os neurônios como a excitotoxicidade (Mehta *et al.*, 2013). Nesta situação, entra em ação um mecanismo pós-sináptico de proteção, cujos canais  $\text{K}_v2.1$  são um dos componentes (Misonou *et al.*, 2005), que controlaria a excitabilidade neuronal evitando os efeitos deletérios do aumento excessivo intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (Misonou *et al.*, 2005; Mohapatra *et al.*, 2009). O resultado final é um adequado funcionamento hipocampal e formação de memória declarativa e espacial de longo prazo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GEIGER, J. R. & JONAS, P. 2000. Dynamic control of presynaptic  $\text{Ca}^{2+}$  inflow by fast-inactivating  $\text{K}^{+}$  channels in hippocampal mossy fiber boutons. *Neuron*, 28, 927-39.
- GRISSEMER, S., NGUYEN, A. N., AIYAR, J., HANSON, D. C., MATHER, R. J., GUTMAN, G. A., KARMILOWICZ, M. J., AUPERIN, D. D. & CHANDY, K. G. 1994. Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated  $\text{K}^{+}$  channels, types  $\text{Kv}1.1$ , 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Mol Pharmacol*, 45, 1227-34.
- MEHTA, A., PRABHAKAR, M., KUMAR, P., DESHMUKH, R. & SHARMA, P. L. 2013. Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *Eur J Pharmacol*, 698, 6-18.
- MISONOU, H., MOHAPATRA, D. P. & TRIMMER, J. S. 2005.  $\text{Kv}2.1$ : a voltage-gated  $\text{k}^{+}$  channel critical to dynamic control of neuronal excitability. *Neurotoxicology*, 26, 743-52.
- MOHAPATRA, D. P., MISONOU, H., PAN, S. J., HELD, J. E., SURMEIER, D. J. & TRIMMER, J. S. 2009. Regulation of intrinsic excitability in hippocampal neurons by activity-dependent modulation of the  $\text{KV}2.1$  potassium channel. *Channels*, 3, 46-56.
- SOLARI, S. V. & STONER, R. 2011. Cognitive consilience: primate non-primary neuroanatomical circuits underlying cognition. *Front Neuroanat*, 5, 65.
- WILSON, M. A. & MCNAUGHTON, B. L. 1993. Dynamics of the hippocampal ensemble code for space. *Science*, 261, 1055-8.
- YECKEL, M. F. & BERGER, T. W. 1998. Spatial distribution of potentiated synapses in hippocampus: dependence on cellular mechanisms and network properties. *J Neurosci*, 18, 438-50.



**Universidade de Brasília**  
Instituto de Ciências Biológicas  
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 19 de setembro de 2011.



### DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado “**UTILIZAÇÃO DE TOXINAS DE ESCORPIÃO NA INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE CANAIS PARA POTÁSSIO NOS PROCESSOS DE APRENDIZADO E MEMÓRIA.**”, UnBDOC n.º 52449/2011, sob responsabilidade da Profa. Elisabeth N. F. Schwartz, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.



*Aline Pic-Taylor*  
Profa. Aline Pic-Taylor  
Coordenadora do CEUA