

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E BIOFÍSICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

Thiago Luiz do Nascimento Lazaroni

NEUROMODULAÇÃO DA MEMÓRIA PELO EIXO  
ANGIOTENSINA-(1-7)/ MAS

Outubro de 2013

Thiago Luiz do Nascimento Lazaroni

NEUROMODULAÇÃO DA MEMÓRIA PELO EIXO

ANGIOTENSINA-(1-7)/ MAS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Grace Schenatto  
Pereira Moraes

Co-orientador: Prof. Dr. Robson Augusto de  
Souza Santos

Belo Horizonte

Outubro de 2013

*“If we knew what it was we were doing, it would not be called  
research, would it?”*

Albert Einstein

*“...Questions of science, science and progress  
Don't speak as loud as my heart.”*

Coldplay

## *DEDICATÓRIA*

Há cerca de oito anos eu me interessei pela neurofisiologia. Estava calouro em uma universidade pública. Muitas portas se fecharam. Houve uma pessoa com um jeito engraçado e sotaque diferente que me acolheu. Era tão jovem e cheia de sonhos quanto eu. Me viu aluno de iniciação científica, mestrando, doutorando. Me viu ficar triste, ansioso, nervoso, frustrado e não raras vezes me abraçou e me acalmou. Tantas outras vezes brigou comigo. Comemorou meus sucessos. Me ensinou a pensar cientificamente, com ética, com cuidado e parcimônia. E sem eu perceber, fui amadurecendo. E minha admiração por esta pessoa ao longo de todos estes anos foi crescendo. Nada mais justo de que dedicar este trabalho, minha obra maior até o momento, aquela que dedicou todos estes anos a me orientar.

Obrigado Grace, porque tudo que você me ensinou é maior do que você pode perceber.

## *AGRADECIMENTOS*

Ao povo brasileiro, que financiou minha educação superior pública de qualidade.

A minha mãe e ao meu avô, que me foram suportes familiares, me viram crescer, me aturaram, me respeitaram e acreditaram em mim mais do que qualquer outro. Vocês são a razão do meu sucesso, dos meus sonhos, dos meus ideais. Amo você.

A minha irmã, pela paciência com minha chatice, por me fazer lanches quando eu estava estudando, por se tornar minha amiga e por me mostrar que no fim das contas todos nós somos diferentes.

Aos meus professores, que com bons ou maus exemplos me mostraram caminhos e deles fiz minhas escolhas. Aos mestres que lutam por condições dignas de trabalho. A vocês todos, meu muito obrigado.

Aos meus amigos, em especial ao Guma, ao Leo. Pessoas ímpares que nunca deixaram de me incentivar. Que quando eu estava frustrado com a vida acadêmica me deram aquele ânimo. Aos amigos que sempre entenderam minha ausência. Vocês são demais!

Aos amigos do NNC e do laboratório de Hipertensão Bioquímica. Pessoas de boa vontade, que sempre me ajudaram quando necessário. Obrigado em especial a Cristiane, Luciana, Daniel, Flávio, Hércules, Marilene, Analina e professor Robson.

# ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS .....	8
LISTA DE FIGURAS .....	10
LISTA DE TABELAS .....	12
ABSTRACT .....	14
1.INTRODUÇÃO.....	15
1.1 APRENDIZAGEM E MEMÓRIA .....	15
1.1.1    MEMÓRIA DO TIPO EPISÓDICA .....	21
1.1.2    MEMÓRIAS DE MEDO CONDICIONADO .....	24
1.2. O EIXO ANGIOTENSINA-(1-7)/RECEPTOR MAS .....	34
1.3. SISTEMA NITRÉRGICO .....	37
2. JUSTIFICATIVA .....	44
3. OBJETIVO GERAL .....	45
4. MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS.....	46
4.1 Aprovação dos protocolos pelo comitê de ética .....	46
4.2 Animais.....	46
4.3. Análise Estatística .....	48
4.4 Western blot.....	49
4.5. Cirurgia para implantação de cânulas intra-hipocampais .....	50
4.6 Análises Farmacológicas.....	51
5. CAPÍTULO 1 - BASES MOLECULARES DO DÉFICIT DE MEMÓRIA DE RECONHECIMENTO DE OBJETOS EM ANIMAIS NOCAUTES PARA O RECEPTOR MAS .....	53
5.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	53
5.2. MATERIAS E MÉTODOS ESPECÍFICOS DO CAPÍTULO 1 .....	55
5.2.1 Radioimunoensaio.....	55
5.2.2. Tarefa de reconhecimento de objetos.....	57
5.2.3 Quantificação de nitrito .....	59
5.2.4 Curva dose-resposta de losartan intra-hipocampal .....	60

5.3 RESULTADOS .....	62
5.3.1 Expressão de ECA2 hipocampal .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.3.2 Quantificação de Angiotensina I hipocampal .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.3.3 Efeito da infusão de A-779 + Ang-(1-7) intra-hipocampal na consolidação da memória de reconhecimento de objetos.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.3.4 Curva dose-resposta de losartan intra-hipocampal ...	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.3.5 Dosagem de nitrito hipocampal.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.3.6 Efeito da infusão de L-NAME intra-hipocampal na memória de reconhecimento de objetos de animais FVB/N e de SNAP em animais MasKo .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.3.7. Expressão total de NOS3 e NOS1 .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.3.8. Expressão de NOS3 e NOS1 fosforiladas.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.3.9. Expressão de PI3K e AKT .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.3.10 Expressão de superóxido dismutase (SOD1) e de NOX2.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.4 DISCUSSÃO .....	62
5.5 CONCLUSÕES DO CAPÍTULO 1.....	73
6. CAPÍTULO 2 - MODULAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO PELO EIXO ANG-(1-7)/MAS .....	75
6.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	75
6.2. MATERIAIS E MÉTODOS ESPECÍFICOS DO CAPÍTULO 2 .....	76
6.2.1. Esquiva inibitória .....	76
6.2.2. Condicionamento ao medo .....	77
6.2.3. Condicionamento ao medo auditivo .....	77
6.2.4. Condicionamento ao medo contextual.....	78
6.2.5 Avaliação da resposta ao choque.....	79
6.2.6 Avaliação da atividade locomotora .....	79
6.2.7 Avaliação do comportamento relacionado à ansiedade.....	80
6.3. RESULTADOS .....	81
6.3.1 Extinção da memória de esquiva inibitória .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
6.3.2 Atividade locomotora e exploratória .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
6.3.3 Labirinto em Cruz elevado .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
6.3.4 Efeito do losartan sobre o comportamento do tipo ansioso medido no labirinto em cruz elevado .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
6.3.5 Condicionamento ao medo auditivo .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>

6.3.6 Condicionamento ao medo contextual .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
6.3.7. Efeito do bloqueio farmacológico do receptor Mas sobre o condicionamento ao medo contextual .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
6.3.8. Escala de resposta comportamental ao choque .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
6.3.9. Efeito do losartan sobre a extinção da memória de condicionamento ao contexto.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
6.4 DISCUSSÃO .....	81
6.5. CONCLUSÕES DO CAPÍTULO 2.....	87
.....	87
7. CONCLUSÃO GERAL.....	89
8. REFERÊNCIAS .....	90
9. ANEXOS .....	115

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<sup>125</sup>I – Iodo radioativo  
A-779 – D-Alanina-Angiotensina-(1-7)  
ACN - Acetonitrila  
ACTH – Hormônio adreno-cortico trópico  
ADH – Hormônio anti-diurético  
Akt – proteína cinase B  
AMP – adenosina monofosfato  
Ang I – Angiotensina-(1-10)  
Ang II – Angiotensina-(1-8)  
Ang IV – Angiotensina-(3-8)  
Ang-(1-7) – Angiotensina-(1-7)  
Ang-(1-7)/Mas – acoplamento angiotensina(1-7)/receptor Mas  
Ang-(1-9) – Angiotensina-(1-9)  
ANOVA – análise de variância  
AP – Antero-posterior  
AT<sub>1</sub> – Receptor do tipo 1 de Angiotensina II  
AT<sub>2</sub> – Receptor do tipo 2 de Angiotensina II  
BSA – Albumina do Soro Bovino  
C57BL/6 – Linhagem de camundongo de pelagem escura utilizado em experimentos de pesquisa laboratorial  
CA1 – Região 1 do dorso do hipocampo. A abreviatura vem do latim “Corno de Ammon”.  
CA3 - Região 3 do dorso do hipocampo  
CaMKII – Proteinocinase dependente de cálcio-calmodulina  
CE – núcleo central da amígdala  
cGMP – guanosina monofosfato ciclica  
CREB – Elemento ligador responsivo da Adenosina Monofosfato cíclico  
DNA – Ácido Desoxiribonucléico  
DV – Dorso-ventral  
EC – Estímulo condicionado  
ECA – Enzima Conversora de Angiotensina  
ECA2 – Enzima Conversora de Angiotensina 2  
EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético  
EI – Estímulo incondicionado  
ELISA – Ensaio adsortivo imunoenzimático  
EPM – Erro Padrão da Média  
ERK – Cinase reguladora de sinal extracelular  
FVB/N – Linhagem de camundongo albino utilizado em experimentos de pesquisa laboratorial  
GABA – ácido gama amino butirico  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogenio  
HFBA – ácido heptafluobutírico  
IP - Via intraperitoneal  
LA – núcleo lateral da amígdala  
LH – Hormônio Luteinizante  
LL – latero-lateral  
L-NAME – N(G)-nitro-L-arginina-metil-ester

LTD – Depressão de Longo Prazo  
LTP – Potenciação de Longo Prazo  
M - Molar  
mA – mili Amper  
MAPK – Proteinocinase ativada por Mitógeno  
MasKo – Animais nocautes para o receptor Mas  
MasR – Receptor Mas  
MCD – Memória de Curta Duração  
MLD – Memória de Longa Duração  
MT – Memória de Trabalho  
NaCl – Cloreto de Sódio  
NADPH – fosfato de dinucleotideo de nicotinamida e adenina  
NEDD - N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride  
NEP – Nepresilina  
NeuN – proteína nuclear específica de neuronios  
NMDA – n-metil-d-aspartato  
NO – Óxido Nítrico  
NOS – oxido nítrico sintases  
NOS1 - oxido nítrico sintase tipo 1, ou oxido nítrico sintase tipo neuronal  
NOS2 - oxido nítrico sintase tipo 2, ou oxido nítrico sintase tipo induzível  
NOS3 - oxido nítrico sintase tipo 3, ou oxido nítrico sintase tipo endotelial  
NOX2 – Isoforma tipo 2 de oxidase de NADPH  
O<sub>2</sub>- oxigenio  
PD123319 – Antagonista do receptor AT<sub>2</sub> de Angiotensina II  
PDK1 – piruvato desidrogenase cinase, isoforma 1  
PI3K – fosfoinositidio-3-cinase  
PI3K/Akt – acoplamento fosfoinositidio-3-cinase/ proteinocinase B  
PIP3 – fosfatidilinositol trifosfato  
PKA – Proteinocinase dependente de Adenosina mono-fosfato cíclico  
PKC – Proteinocinase C  
PKG – Proteinocinase G  
POP- Prolil oligopeptidase  
PrL – córtex pré-lobulocaudal  
RIE - Radioimunoensaio  
RNA – Ácido Ribonucléico  
RNAm – Ácido Ribonucléico mensageiro  
RO – Reconhecimento de Objetos  
ROS – Espécies reativas de oxigênio: radicais livres  
Rpm – rotações por minuto  
RPM – Rotações por minuto  
SC – Via subcutânea  
SNAP - S-nitroso-N-acetilpenicilamina  
SNC – Sistema Nervoso Central  
SNS – Sistema Nervoso Simpático  
SOD – Superóxido dismutase  
SRA – Sistema Renina-angiotensina  
SULF - sulfonilamida  
TOP - Thimet pepitidase

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Substratos neurais do medo condicionado.....	29
Figura 2: Vias de sinalização moduladas pelo NO.....	41
Figura 3: Expressão de ECA2 (ACE2) hipocampal por western blot.....	62
Figura 4: Concentração de Angiotensina I no hipocampo de animais FVB/N..	63
Figura 5: Efeito da infusão intra-hipocampal de Ang-(1-7), A-779 e as duas drogas simultaneamente sobre consolidação da memória de reconhecimento de objetos.....	64
Figura 6: Efeito da infusão intra-hipocampal de losartan sobre a atividade locomotora.....	66
Figura 7: Efeito do losartan intra-hipocampal sobre a consolidação da memória de reconhecimento de objetos.....	67
Figura 8: Concentração hipocampal de nitrito basal e em animais submetidos a 30s de exploração de objetos.....	69
Figura 9: Efeito da infusão intra-hipocampal de L-NAME na consolidação da memória de reconhecimento de objetos em animais FVB/N e do SNAP na consolidação da memória de reconhecimento de objetos em animais Masko .....	70
Figura 10: Expressão basal de NOS3 e NOS1 totais no hipocampo de animais FVB/N e Masko .....	71
Figura 11: Expressão de NOS3 ativa (fosforilada no resíduo Ser1177) e inativa (fosforilada no resíduo Thr497) no hipocampo de FVB/N e Masko.....	72
Figura 12: Expressão de NOS1 inativa (fosforilada no resíduo Ser852) no hipocampo de FVB/N e Masko.....	73
Figura 13: Expressão basal de PI3K no hipocampo de animais FVB/N e Masko.....	74
Figura 14: Expressão basal de AKT (A) e de AKT fosforilada (B) no hipocampo de animais FVB/N e Masko.....	74

Figura 15: Expressão basal de SOD1 no hipocampo de animais FVB/N e Masko.....	76
Figura 16: Expressão basal de NOX2 no hipocampo de animais FVB/N e Masko.....	76
Figura 17: Efeito do prejuízo do eixo angiotensina-(1-7)/mas sobre o sistema nitrérgico em neurônios.....	89
Figura 19: Avaliação da extinção na esQUIVA inibitória .....	97
Figura 20: Atividade locomotora de camundongos FVB/N e Masko .....	98
Figura 21: Atividade locomotora de camundongos C57 e Masko .....	99
Figura 22: Labirinto em cruz elevado. ....	100
Figura 23: Efeito do losartan sobre as entradas e tempo nos braços abertos do labirinto em cruz elevado.....	101
Figura 24: Comportamento de freezing durante condicionamento ao medo auditivo em FVB/N e Masko .....	103
Figura 25: Comportamento de freezing durante condicionamento ao medo contextual em WT e Masko .....	103
Figura 26: Condicionamento ao medo contextual com um pareamento CS/US em animais C57 e Masko.....	104
Figura 27: Efeito do A-779 sobre o condicionamento ao medo contextual imediatamente pós-condicionamento e 20 minutos pré-teste.....	105
Figura 28: Avaliação da resposta comportamental da linhagem C57 em diferentes intensidades de choque.....	106
Figura 29: Avaliação da resposta comportamental da linhagem FVB/N em diferentes intensidades de choque.....	107

Figura 30: Efeito do losartan sobre na extinção do condicionamento ao medo contextual em MasKo.....	107
Figura 31: As memórias de medo condicionado no modelo MasKo.....	115

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 : Diferenças entre as duas linhagens de camundongos (FVB/N e C57BL/6) nocautes para o receptor Mas em vários aspectos fisiológicos, cognitivos e comportamentais.....	47
Tabela 2: Animais que apresentaram letargia/hipolocomoção e morte dentro da curva estudada.....	67

## RESUMO

Nosso grupo de pesquisa demonstrou previamente que animais com deleção genética do receptor Mas (MasKo) apresentam déficit na memória de reconhecimento de objetos, que foi revertido pela administração de losartan, um antagonista dos receptores AT1 de Angiotensina II. No presente estudo, investigamos os mecanismos moleculares responsáveis pelo déficit de memória de objetos dos animais MasKo, bem como pela sua reversão pelo losartan. Em conjunto, nossos resultados sugerem que o déficit de memória de reconhecimentos de objetos observado em camundongos MasKo é devido à diminuição da modulação nitrérgica hipocampal uma vez que os níveis de nitrito basais e aprendizado-dependentes estão diminuídos no hipocampo dos MasKo e que a infusão de doador de óxido nítrico neste sítio é capaz de reverter os déficits de memória de reconhecimento de objetos. Além disso, (1) considerando que alterações cardiovasculares ocorrem paralelamente às alterações comportamentais observadas durante a formação da memória de medo e que (2) os animais MasKo são um modelo de hipertensão arterial, também avaliamos a modulação do eixo Ang-(1-7)/Mas na consolidação, evocação e extinção da memória de medo. Nossos resultados demonstraram que a deleção do Mas, dependendo da linhagem de camundongos, prejudica a formação da memória de medo e de sua extinção, o que pode ser devido a um status basal de medo e/ou ansiedade exacerbados. Além disso, verificamos que o déficit de extinção da memória condicionada, bem como os níveis elevados de ansiedade dos nocautes é revertido pelo losartan. Como conclusão geral do trabalho sugerimos que a integridade do eixo Ang-(1-7)/Mas parece essencial para a manutenção do sistema nitrérgico, que atua como importante neuromodulador da memória de reconhecimento de objetos.

Palavras-chave: Memória de reconhecimento de objetos, memória de medo condicionado, óxido nítrico, sistema renina-angiotensina cerebral, extinção de memórias, eixo Angiotensina-(1-7)/Mas

## ABSTRACT

It is well known that the peptide Angiotensin-(1-7) [Ang-(1-7)] and its receptor Mas modulate cardiovascular function and more recently it has been shown that this axis also modulate cognition. Our laboratory previously showed that mice with genetic deletion of Mas receptor (MasKo) exhibit deficits in object recognition memory, which was reversed by the administration of losartan, an antagonist of Angiotensin II receptors AT1. In the present study, we investigated the molecular mechanisms responsible for object recognition memory deficits of MasKo, as well as the effect of losartan. Taken together, our results suggest that the memory deficit observed in MasKo mice is due to a down-regulation of the hippocampal nitregeric system. In addition, (1) considering that cardiovascular changes occur parallel to behavioral expression occurred during fear conditioning memory and (2) the MasKo mice are considered an animal model of hypertension, we also evaluated the modulation of Ang-(1-7)/Mas axis on consolidation, recall and extinction of fear memories. Our results showed that the knockout of Mas, depending of the mice's background impaired the fear memory formation and extinction, which may be a consequence of an increased general fear and/or anxiety. Furthermore, we verified that the fear memory extinction deficit, as well as the increased anxiety levels was recovered by losartan. As a general conclusion we may suggest that the integrity of the Ang-(1-7)/Mas axis is essential for the maintenance of the nitregeric system which in turn is a important modulator of object memory. Furthermore, fear memories and cardiovascular functions may share at least one signaling pathway, the Ang-(1-7)/Mas axis.

key-words: Object memory; fear conditioning memory; nitric oxide, cerebral renin-angiotensin system, memory extinction, Angiotensina-(1-7)/Mas axis

## 1.INTRODUÇÃO

### 1.1 APRENDIZAGEM E MEMÓRIA

Memória é a capacidade adaptativa dos organismos vivos de adquirir informações do meio externo, processá-las e guardar aspectos relevantes sobre elas para que possam ser evocados, mesmo que de maneira não consciente, em um tempo futuro (revisado por Chun e Turk-Browne, 2007). As etapas fisiológicas de formação de memórias se iniciam na aquisição dos estímulos ambientais por receptores sensoriais. Estas informações são processadas pelo sistema nervoso central e exigem processos bioquímicos e celulares que levam a modificações plásticas nas sinapses para sua consolidação a longo prazo e eventual evocação (revisado por Dere et al., 2007; Tulving, 1972; Izquierdo, 1999; Squire e Kandel 2003; Lent 2008).

O estudo da memória teve início no século XIX, com o desenvolvimento da psicologia experimental. Hermann Ebbinghaus foi um dos pesquisadores pioneiros que na década de 1880 realizou uma série de estudos com memorização de sílabas. Ebbinghaus usou a si mesmo como cobaia, aprendendo uma lista de sílabas e as evocou em diferentes intervalos de tempo. O estudo avaliou a quantidade de repetições e o tempo necessário para recordar com êxito cada sílaba da lista. Este estudo foi pioneiro ao propor que as memórias têm duração diferente, sendo que enquanto algumas duram pouco tempo e são retidas por alguns minutos, outras podem persistir por tempo tão remoto como dias, meses ou anos; além disso, concluiu que a repetição faz com que as memórias persistam por mais tempo (Squire e Kandel, 2003). Em 1900 Muller e Pilzecker basearam-se nos achados de

Ebbinghaus e conduziram seus próprios estudos com protocolos que também utilizavam lista de sílabas, porém usaram dois grupos de sujeitos. No primeiro grupo a memória era testada após certo tempo e no segundo a memória era testada após ser apresentada uma nova lista de sílabas, que tinha por objetivo confundir os participantes. Com esse segundo estudo ficou demonstrado que a memória é susceptível a interferências (Lechner e Squire, 1999). Posteriormente, William James fez uma distinção entre as memórias de curta e de longa duração. As memórias de curta duração duram de segundos a horas e são essencialmente uma extensão do momento presente. Ao contrário, a memória de longa duração pode persistir durante semanas, meses ou por toda uma vida (Squire e Kandel, 2003). Essa primeira classificação das memórias com relação a sua duração levou ao pensamento que estas memórias eram continuidade uma da outra, ou seja, a memória de longa duração nada mais seria que a memória de curta duração cujas repetições, ou aquisição tivesse um traço mais forte.

Na década de 20 Lashley realizou experimentos com roedores a fim de localizar qual o substrato anatômico cerebral onde as memórias se armazenavam. Para isso, Lashley conduziu lesões no córtex cerebral antes ou depois do animal aprender uma tarefa. Em seguida avaliou o desempenho do animal tentando correlacionar a extensão das lesões com o seu desempenho. O estudo concluiu que a extensão das lesões se relacionava com o déficit de memória, mas não a localização destas. Estes resultados confrontaram a hipótese dos frenologistas, que propunham haver um sítio específico para cada função cerebral (Bear e Connors 2008). Posteriormente Donald Hebb investigou os achados de Lashley e propôs que grupamentos neuronais,

distribuídos em áreas corticais, se conectam e servem para o arquivamento das informações. Evidências adicionais mostraram que a memória está amplamente distribuída, mas que diferentes áreas armazenam diferentes aspectos da informação (Squire e Kandel, 2003; Bear, 1996).

Outro aspecto histórico importante sobre o estudo das memórias se baseou na condução do caso do paciente H.M na década de 50. O paciente H.M. sofria de epilepsia do lobo temporal medial secundário a um traumatismo crânio-encefálico. A severidade das crises levou seus médicos à realizarem ablação do lobo temporal medial bilateral, onde estão incluídos o hipocampo e a amígdala. Após a recuperação, o paciente iniciou um déficit de memória anterógrada (o paciente se tornou incapaz de formar novas memórias) e retrógrada para os últimos dois anos prévios à cirurgia (Scoville e Milner, 1957). Porém a extirpação do hipocampo não afetou todos tipos de memória, já que o paciente ainda se mostrara capaz de aprender tarefas motoras (Schmolck e Kensinger, 2002; Corkin et al, 1968). As descobertas de Scoville e Milner demonstraram que o hipocampo e outras estruturas do lobo temporal medial são fundamentais para o armazenamento de memórias declarativas (Squire e Kandel, 2003).

Atualmente, podemos classificar melhor as memórias de acordo com suas diferentes características. Um exemplo obtido pelo estudo do paciente H.M. foi a diferenciação das memórias de procedimentos, que são aquelas relacionadas às habilidades motoras ou sensoriais. Este tipo de memória é, em geral, implícita, pois depende das vias perceptivas e reflexas, assim como do núcleo caudado e do cerebelo. As memórias de procedimentos envolvem a repetição, os hábitos, e o condicionamento a respostas emocionais. Elas

podem ser adquiridas de maneira imperceptível e/ou inconsciente. Geralmente seu traço dura a vida toda. A memória de procedimentos pode ser descrita, porém a sua evocação não necessariamente pode ser declarada. Neste aspecto elas diferem das memórias declarativas, que são genuinamente humanas, onde fatos, eventos da experiência do indivíduo podem ser verbalizadas. A memória declarativa tem aprendizagem mais rápida que a de procedimentos, porém é mais instável, sujeita a modificações e interferências e depende da integridade do lobo temporal (Izquierdo e Barros, 1998; 2002). A memória declarativa tem no seu conceito aquilo que o ser humano mais assimila como sendo uma memória típica, pois se refere tanto às experiências de vida, quanto aos aprendizados teóricos e práticos que são vivenciados.

Com relação ao seu conteúdo, as memórias podem conter informações inócuas ao indivíduo, como fatos, teorias, datas ou ainda terem componentes de grande relevância emocional, como eventos agradáveis ou traumáticos. Geralmente as memórias relacionadas ao medo são consolidadas com maior facilidade por conterem elementos chaves à sobrevivência animal, como um predador em potencial ou um alimento que induz náuseas ou dor, por exemplo (Lent, 2008; Baudry, Bi, e Tocco, 1996; Bliss e Collingridge, 1993; Collingridge e Bliss, 1993; Izquierdo e Medina, 1995, 1997; Maren e Baudry, 1995; Martin e Kandel, 1996; Reymann, 1993).

Além da classificação quanto ao seu conteúdo, às memórias podem ser classificadas de acordo com a sua duração. Estudos com o paradigma da esQUIVA inibitória deram indício de que a memória de curta duração é processada de forma paralela à consolidação da memória de longa duração (Izquierdo e Barros 1998; Izquierdo e Bevilaqua, 2006; Izquierdo e Medina

1999) sem afetar a memória de longa duração (Izquierdo e Barros 1998), contradizendo teorias de continuidade baseadas nos estudos de William James do início do século 20. Por sua vez, também há memórias que duram segundos, como o ato de repetir mentalmente um número de telefone desconhecido algumas vezes antes de discá-lo. Esta memória ultra-rápida é conhecida como memória de trabalho. A memória de trabalho se baseia na reverberação do impulso elétrico neuronal, mas não envolve síntese protéica e por isso não se consolida. Esta memória, portanto, não deixa traços. O córtex pré-frontal é especialmente recrutado neste tipo de memória, porém outros substratos como córtices entorrinal, parietal superior, cíngulo anterior e hipocampo podem atuar em conjunto para este processo mnemônico (Hughes, 2004; McAfoose e Baune, 2009).

As memórias são componentes dinâmicos dentro da função do sistema nervoso central. Sua formação, evocação e até mesmo modificações ou extinção dependem da atividade sináptica presente em vários substratos neurais. As memórias podem ser divididas em fases didáticas, porém não totalmente dissociáveis, uma vez que uma fase pode se interpor à outra. Classicamente as fases são: aprendizagem, consolidação, conservação, evocação (Lent, 2008).

A aprendizagem se constitui da etapa onde estímulos, geralmente externos e adquiridos pelos órgãos sensoriais, são processados pelos córtices primários e codificados como atividade neural. A integridade sináptica e do sistema nervoso é fundamental para a consolidação das memórias. Nesta etapa apenas informações relevantes são geralmente gravadas através de processos bioquímicos sinápticos em memórias (Izquierdo et al., 2006). Além

disso, há grande importância dos aspectos emocionais desta memória para o indivíduo, onde uma memória relacionada a um evento traumático ou prazeroso pode torná-la mais robusta no futuro (McGaugh, 2011; Reisberg e Hertel, 2003). A conservação das memórias se dá através da atividade sináptica. Para que uma memória persista é importante que modificações plásticas a longo prazo ocorram no sistema nervoso como por exemplo aumento da síntese protéica. São importantes nesta fase proteínas estruturais aos neurônios, aquelas ligadas a comunicação sináptica, proteínas estruturais de canais de membrana e enzimas responsáveis pela sinalização intracelular e nuclear (Gies e Mizuno, 2013 ; Katche et al, 2013).

A evocação das memórias dá acesso às informações previamente codificadas através da re-ativação dos circuitos neurais recrutados durante sua consolidação (Pastalkova et al., 2006). Durante a evocação, uma memória pode ser modificada, agregando-se ou suprimindo-se informações àquelas preexistentes (Straube et al., 2012), fenômeno este classificado como reconsolidação.

Há ainda a possibilidade de extinção das memórias. De fato, o sistema nervoso “filtra” as informações a serem gravadas ainda na fase de aquisição e consolidação das memórias (Chun e Turk-Browne, 2007). Desta forma as redes neurais são recrutadas por informações úteis à sobrevivência do indivíduo. Por um outro lado, ao longo da vida do indivíduo, a utilidade das memórias vai se modificando. A persistência do traço mnemônico será mais forte se estiver associado a um componente emocional (McGaugh, 2013; Reisberg e Hertel, 2003). A extinção é um aprendizado que assim como a consolidação do traço original, envolve síntese protéica e plasticidade sináptica

(Maren, 2011; Quirk e Mueller, 2008). Acerca da extinção trataremos especificamente em tópico a parte devido sua importância neste estudo.

### **1.1.1 MEMÓRIA DO TIPO EPISÓDICA**

A memória episódica é a memória que se refere às experiências vivenciadas pelo sujeito. Ela guarda aspectos como o “quê”, “de que forma”, “onde”, “porquê” e em que ordem determinado evento aconteceu. Há evidências claras que a memória episódica pode ser representada por outros comportamentos que não envolvam somente a linguagem verbal (Menzel, 1999; Donald, 2001; Griffin e Speck, 2004; Hampton, 2001; Fortin, et al., 2004). Um roedor ou uma ave, por exemplo, pode preferir um determinado local que aprendeu ser fonte de alimento em detrimento de outro local visitado anteriormente em que a disponibilidade de alimento é escassa. Neste caso, há que se falar em memória do tipo episódica (Ennaceur e Delacour, 1988). O estudo da memória do tipo episódica é uma grande ferramenta para se entender os processos neurofisiológicos da memória declarativa classicamente humana.

A tarefa de reconhecimento de objetos pode ser utilizada para se avaliar diferentes componentes da memória do tipo episódica em roedores. Nesta tarefa, diferentes versões de preferência pela novidade são combinadas para medir a memória de reconhecimento de objetos (Dere et al, 2007; Ennaceur e Delacour, 1988), a memória para localizações nas quais os objetos são explorados (Ennaceur, et al., 1997) e a ordem temporal da apresentação dos objetos (Mitchell e Laiacina, 1998). Avaliações farmacológicas nesse modelo

também são possíveis (Dere, et al., 2005; Barbosa, et al., 2010), por exemplo, o uso de D-cicloserina, um agonista NMDA, via intra-peritoneal teve efeito promnésico nesta tarefa (Kart-Teke, et al., 2006). A tarefa clássica de exploração de objetos consiste de uma sessão de amostra, onde os roedores exploram dois objetos iguais, após um intervalo de tempo, seguido de uma sessão teste em que são apresentados um objeto familiar e um novo. Os animais gastam mais tempo explorando o objeto novo, o que indica que o objeto familiar foi reconhecido (Ennaceur e Delacour, 1988).

Uma modificação do protocolo de novidade permite avaliar a memória espacial. São apresentados na sessão de teste, dois objetos familiares, um em uma nova posição e o outro na antiga posição, como encontrado na sessão de amostra. Assim, os animais gastam mais tempo explorando o objeto na nova localização na caixa de teste (Ennaceur et al., 1997, Dere et al., 2007). Outra variante do paradigma de preferência por novidade mede a memória para ordem temporal, na qual dois diferentes objetos são apresentados. Essa versão é composta de três sessões: duas sessões de amostra, com intervalo de uma hora entre elas e, uma sessão de teste, cujo intervalo pode variar (Dere et al., 2005a, b; Kart-Teke, et al., 2006; Barbosa et al., 2010). Nas sessões de treino, duas ou quatro cópias de um mesmo objeto são apresentadas em localizações distintas em cada amostra. Em cada amostra, os objetos são os mesmos entre si, mas diferem em localização e aspecto de uma amostra para outra. Durante a fase de teste, dois ou quatro objetos são apresentados, tanto os da primeira amostra como da segunda, os quais podem ou não estar deslocados. Dessa forma, os animais exploram mais os objetos mais antigos apresentados (primeira amostra) e ainda, tendem a explorar mais o antigo deslocado em

relação ao não-deslocado. Isso indica que os animais discriminam os objetos em termos de recência relativa (Mitchell e Laiacina, 1998; Ennaceur e Delacour, 1988) e de localização (Ennaceur et al., 1997; Dere et al., 2005a, b; Kart-Teke et al., 2006; Barbosa et al., 2010).

Um elegante estudo sobre a memória do tipo episódica em animais foi conduzido por Clayton e Dickinson (1998), em pássaros submetidos a uma tarefa que avaliou se eles eram capazes de recordar onde foi escondida ração ou larva. Os pássaros preferem se alimentar de larvas, porém aprenderam que se o intervalo de tempo entre o aprendizado da localização da larva for muito longo, estas poderiam entrar em decomposição, preferindo então os pássaros pelo lugar onde aprenderam estar a ração.

Em seres humanos, déficits na memória episódica são encontrados após danos ao lobo temporal medial (Aggleton e Brown, 1999). Quanto a estudos de memória de objetos em animais, o hipocampo tem grande relevância para associações objeto-lugar (Gilbert e Kesner, 2004; Mumby et al., 2002), mas possivelmente, não está implicado em memória de reconhecimento do objeto em si, o qual depende do córtex perirrinal (Winters & Bussey, 2005). Já a ordem temporal para objetos é mediada pelo córtex pré-frontal medial (Chiba, et al., 1994; Hannesson et al., 2004).

O lobo temporal medial incluindo a formação hipocampal (córtex entorrinal, giro denteado, áreas CA1 à 4 e subículo), amígdala e córtices perirrinal e pós-rinal, servem como substrato para a memória declarativa (Buffalo et al., 1999; Squire et al., 2004). O hipocampo está envolvido na evocação da memória episódica, enquanto outras estruturas do lobo temporal

medial, como córtex perirrinal sustentam a memória baseada em familiaridade e memória semântica (Tulving e Markowitsch, 1998; Aggleton e Brown, 1999; 2006; Brown e Aggleton, 2001). Lesões hipocâmpais em seres humanos, como no caso H.M. corroboram a ideia de que o hipocampo e o lobo temporal medial são necessários para aquisição e consolidação de memória episódica.

O hipocampo processa as informações espacial (células de lugar) e temporal independentemente (Kesner, 1998; O'Keefe e Nadel, 1978). Nesse sentido, sub-regiões hipocâmpais têm sido associadas a diferentes componentes da memória episódica: o componente “o quê” tem sido associado com a função do giro denteado; “onde” tem sido associado a CA3 (Kesner e Hunsaker, 2010; Morris e McNaughton, 1987; Rolls e Treves, 1998; Rolls e Kesner, 2006) e “quando” a CA1 (Estes, 1985). Já o giro denteado não está envolvido na formação de memória episódica per se, mas é responsável pela separação de contextos espaciais similares, sendo essencial para a recordação e discriminação entre episódios.

### **1.1.2 MEMÓRIAS DE MEDO CONDICIONADO**

Além da memória do tipo episódica, outras memórias, como aquelas que se relacionam ao medo, são de vital importância à sobrevivência e seu estudo fornece grandes evidências sobre como o sistema nervoso e seus processos bioquímicos atuam sobre a função mnemônica.

O medo é fundamental para a sobrevivência dos vertebrados superiores uma vez que ativa respostas comportamentais defensivas que protegem os

animais e os humanos contra ameaças ambientais (Fendt e Fanselow, 1999). Tal ameaça pode ser representada por um estímulo inato, como a presença de um predador ou um agressor da mesma espécie (Blanchard e Blanchard, 1971), ou por estímulos neutros, que por associação com estímulos dolorosos ou outras sensações igualmente desagradáveis adquirem propriedades aversivas condicionadas (Blanchard e Blanchard, 1972; Graeff e Brandão, 1999).

Quando um animal é confrontado com uma ameaça à sua integridade física ou à própria sobrevivência, seja esta representada por um predador, um agressor da mesma espécie ou por uma simples mudança no ambiente, ele apresenta um conjunto de respostas comportamentais e neurovegetativas que caracterizam a reação de medo. Esse conjunto de respostas, características da espécie, foi chamado de reações de defesa espécie-específica uma vez que foi previamente determinado em seu código genético (Bolles, 1970). Estas respostas compõem as respostas inatas ao medo.

Os roedores, por exemplo, apresentam três tipos de respostas defensivas inatas: congelamento, fuga ou luta (Bolles e Uhl, 1975). O congelamento, ou freezing, é uma postura onde talvez o animal não seja percebido pelo predador (Breão e Troncoso, 2003). Além disso, os predadores estão mais propensos ao ataque quando o animal está em movimento (Takahashi et al., 2005). Portanto, o movimento pode atuar como um estímulo ao ataque do predador. Por isso, provavelmente, o congelamento é observado mesmo em situações que o animal tem oportunidade para outros comportamentos como a fuga (Fanselow e Lester, 1988). Porém, à medida que o predador se aproxima, ou aumenta a intensidade dos sinais que indicam a

sua presença, o animal altera o seu o comportamento de um congelamento intenso para um comportamento de luta ou fuga, quando esta é possível (Brandão e Troncoso, 2003; Frenkel et al., 2012).

Além do comportamento de congelamento, luta ou fuga, as respostas defensivas são acompanhadas de intensas alterações neuroendócrinas e autonômicas. No sistema nervoso central, há liberação de neurotransmissores como norepinefrina, acetilcolina, serotonina e dopamina. Esses neurotransmissores promovem um aumento do estado de alerta, e em geral, favorecem o processamento dos estímulos externos (Aston-Jones e Cohen, 2005; LeDoux, 2007; Rodrigues e LeDoux, 2009). A liberação de epinefrina e norepinefrina pela medula adrenal e norepinefrina nos terminais de nervos simpáticos desencadeiam uma série de efeitos como aumento da pressão arterial, aumento da frequência cardíaca e respiratória, aumento da irrigação sanguínea dos músculos esqueléticos e inibição da digestão (Rodrigues e LeDoux, 2009), o que em suma trata-se de aumento da atividade simpática.

Além disso, outras alterações comportamentais também caracterizam respostas de medo. Por exemplo, os ratos apresentam vocalização ultra-sônica (Kaltwasser, 1991; Miczek e Weerts, 1995), cuja amplitude, duração e número estão diretamente relacionados à intensidade do estímulo não-condicionado (choque) (Naito et al., 2003). As respostas comportamentais diante do medo e de situações que a ele desencadearam são úteis para avaliação das memórias.

O condicionamento ao medo foi primeiramente descrito por Ivan Pavlov no início do século XX e também é conhecido como condicionamento clássico ou pavloviano. Esta tarefa consiste na apresentação de um estímulo

condicionado (CS, do inglês *conditioned stimulus*), inicialmente neutro (luz, som ou contexto, por exemplo) pareado a um estímulo incondicionado (US, do inglês *unconditioned stimulus*) de natureza aversiva, como um choque elétrico nas patas. Após esse pareamento, a apresentação do estímulo, que inicialmente era neutro, prediz a ocorrência do choque e então passa a atuar como um estímulo condicionado, desencadeando uma resposta condicionada, o congelamento (“freezing”). E este pode ser definido como a imobilidade total acompanhado de postura tensa, ou seja, ausência total de movimentos exceto aqueles associados com os movimentos respiratórios (Bolles e Collier, 1976; Griffith, 1920; Small, 1899; Darwin, 1960).

Os substratos neurais responsáveis pelo medo condicionado (Vide figura 1) envolvem a porção basolateral da amígdala que recebe aferências sensoriais via projeções diretas provenientes do hipocampo, substância cinzenta periaquedutal, córtices sensoriais primários, núcleo geniculado medial, tálamo, etc. A amígdala desempenha um importante papel na regulação do comportamento defensivo. Lesões ocasionam inibição das reações de medo em resposta a apresentação de um estímulo aversivo ou um estímulo previamente pareado com o choque elétrico nas patas (Blanchard e Blanchard, 1972; Kim e Rison, 1993). Outras respostas condicionadas como hipertensão, taquicardia e analgesia também são bloqueadas após a lesão da amígdala (Kapp e Frysinger, 1979; LeDoux e Iwata, 1988; Helmstetter e Bellgowan, 1993). Desta forma, a amígdala é crucial nas reações de defesa típicas em mamíferos (Blanchard e Blanchard, 1972).

A amígdala contém uma grande gama de núcleos que diferem em função do tipo celular, densidade, composição química e conectividade

(LeDoux, 2007; Swanson, 2003; Pitkänen e Pikkarainen, 2000). Eles podem ser divididos em três grandes grupos: os núcleos profundos ou basolateral (BLA) da amígdala, que incluem o núcleo lateral, o núcleo basal e o núcleo basal acessório; os núcleos superficiais ou corticais, que incluem os núcleos do trato olfatório lateral e o núcleo cortical; e os núcleos do grupo centromedial, composto pelos núcleos medial e central. Há ainda os núcleos intercalados e a área amígdalo-hipocampal (revisado por Fanselow et al., 2009).

O núcleo lateral (LA) é considerado a via de entrada sensorial para a amígdala porque recebe aferências auditiva, visual, gustatória, olfatória e somatossensorial (incluindo dor) do tálamo e do córtex. A via tálamo-amígdalóide transmite a informação sobre o estímulo aversivo de forma rápida e sem o controle consciente do indivíduo (LeDoux, 1996; LeDoux, 1995). Por outro lado, a via cortico-amígdalóide provê lenta e mais detalhada informação sensorial. Neurônios da LA respondem tanto ao estímulo condicionado como ao estímulo não-condicionado, e o bloqueio farmacológico ou lesões deste núcleo, impossibilitam o condicionamento de medo (LeDoux, 1996).

O núcleo central (CE) é considerado a maior via de saída da amígdala. O CE é responsável pelo controle da reação de medo que inclui respostas comportamentais, autonômicas e endócrinas via projeções para o hipotálamo, a substância cinzenta central e o núcleo motor dorsal do vago (LeDoux, 2007; LeDoux, 1996; LeDoux, 1995; Fanselow e Poulos, 2005; Lang e Davis, 2006; Maren, 2001; Paré e Quirk, 2004; Rodrigues e Schafe, 2004). Assim, projeções para o hipotálamo lateral e o bulbo medeiam as respostas autonômicas. O núcleo paraventricular do hipotálamo medeia respostas neuroendócrinas, o núcleo reticulopontino caudal está relacionado à resposta de sobressalto e as



integram, projetando para a BA, massa de células intercaladas (ITC), porção lateral e medial da amígdala central (CEI e CEm respectivamente. A CEm é a principal via de saída da amígdala e recebe além das citadas, aferências da CEI, ITC, do núcleo intralaminar posterior talâmico (PIN) e MGm. Da CEm há projeções para substratos envolvidos com as respostas comportamentais e fisiológicas do medo como a porção ventral da substância cinzenta periaquedutal (vPAG), Hipotálamo lateral (LH), núcleo paraventricular (PVN) e BNST.

Evidências indicam que os córtices pré-límbico (PrL) e infra-límbico (IL) são necessários para a produção das respostas de medo e extinção do condicionamento.. Os neurônios da LA são responsáveis por desencadear as respostas de medo, porém essas respostas duram apenas alguns milésimos de segundo (Maren e Quirk, 2004; Quirk e Reppas, 1995; Paré e Collins, 2000), e, portanto, não são responsáveis pela continuidade das respostas de congelamento. Os neurônios do PrL, ao contrário, mostram um duradouro aumento em sua atividade que reflete a evolução temporal do medo (Burgos-Robles e Vidal-Gonzalez 2009). Outra questão importante reside no fato que PrL pode influenciar a extinção do medo. A atividade dos neurônios do PrL é maior em ratos que não conseguem extinguir a memória (Burgos-Robles e Vidal-Gonzalez, 2009; Knapska e Maren, 2009), e diminui após a administração de bloqueadores da expressão de medo como o propranolol (Rodriguez-Romaguera e Sotres-Bayon, 2009) e o canabidiol (Lemos e Resstel 2010). Evidências indicam que déficits na extinção do medo também podem ocorrer após estimulação elétrica do PrL (Burgos-Robles e Vidal-Gonzalez 2009). Isto

ocorre porque o PrL projeta para a ITC, inibindo os interneurônios gabaérgicos (inibitórios). Já o IL tem projeções excitatórias sobre a ITC, fundamental para a aquisição e consolidação da extinção das memórias condicionadas (Maren et al, 2011).

Diversos autores sugerem o envolvimento do hipocampo na aquisição do aprendizado de medo condicionado, uma vez que lesões desta estrutura diminuem o desempenho do animal em tarefas que requerem a aprendizagem de relações espaciais como durante o condicionamento de medo ao contexto (Anagnostaras e Gale, 2001; Rudy e Barrientos, 2002; Rudy e Matus-Amat, 2005). O condicionamento ao medo contextual é induzido pela exposição do animal a um evento aversivo (um choque) em um determinado contexto. Evidências indicam que esta associação não pode ser formada se o roedor não explora suficientemente o contexto antes de receber o choque (Fanselow et al., 1990). Lesões (eletrolítica, neuroquímica, administração de lidocaína ou antagonistas colinérgicos) no hipocampo antes ou após o treinamento prejudicam a resposta de congelamento no condicionamento ao medo contextual e na esQUIVA INIBITÓRIA (O'Keefe e Nadel, 1978; Kim e Rison, 1993; Phillips e LeDoux, 1992; Kim e Fanselow, 1992; McIntyre e Miyashita, 2005; Ammassari-Teule e Pavone, 1991; Maren e Fanselow, 1997; Rogers e Kesner, 2004; Sacchetti e Lorenzini, 1999; Roozendaal e McGaugh, 1997; Roozendaal e Nguyen, 1999). Entretanto, quando outro estímulo é aplicado, como um tom, a administração de antagonistas glutamatérgicos diminui o aprendizado ao contexto, mas não ao tom (Rogers e Kesner, 2004; Frohardt e Guarraci, 1999). Esses resultados sugerem que o hipocampo pode estar seletivamente envolvido no aprendizado contextual e não é necessário para a subsequente

associação do contexto ao estímulo aversivo (Kim e Rison, 1993; Rudy e Huff, 2004). Por outro lado, experimentos realizados recentemente por Chang et al. (2007) mostraram resultados opostos. O hipocampo está envolvido na aquisição da memória ao contexto (O'Keefe e Nadel, 1978; Phillips e LeDoux, 1992; Kim e Fanselow, 1992; Rogers e Kesner, 2004). Entretanto, se ele também está envolvido na associação do contexto ao estímulo aversivo ainda é controverso. Alguns autores têm sugerido que o papel do hipocampo no medo condicionado seria o de promover a transferência de uma configuração espacial do contexto para a amígdala, onde ocorreria então, a sua associação com os choques, determinando o processo de condicionamento (Fendt e Fanselow, 1999; Sutherle e McDonald, 1990).

A formação da memória de medo condicionada depende da contingência entre CS e o US. De fato, a apresentação repetida do CS, na ausência de US, desencadeia um novo aprendizado denominado extinção. Pavlov foi o primeiro a demonstrar experimentalmente a extinção de memórias (Pavlov, 1927) e seus achados mostraram que nas primeiras apresentações do CS a resposta condicionada era preservada, mas sem pareamento com o US esta resposta decaía ao longo do tempo. A extinção tem grande importância nas memórias de medo já que é um componente importante nas intervenções comportamentais para pacientes com memórias de medo patológico. Por exemplo, a terapia de exposição envolve a apresentação aos estímulos ligados ao medo traumático em um ambiente seguro (Craske et al, 2008;. Powers et al, 2010;. Rothbaum e Davis , 2003).

A extinção não é o mero apagamento ou a reversão da memória do medo inicial, uma vez que as respostas de medo condicionado podem

reaparecer (1) com o passar do tempo (recuperação espontânea), (2) se o CS for apresentado em um contexto diferente do qual a extinção ocorreu (renovação ou *renewal*), ou (3) se o US for reapresentado de maneira inesperada (reintegração ou *reinstatement*).

Pelo menos três substratos neurais estão envolvidos na extinção: amígdala, córtex pré-frontal medial e formação hipocampal. A amígdala é o local crítico de plasticidade em que extinção das memórias se processa. A BLA é fundamental neste quesito, uma vez que a infusão de antagonistas do receptor de NMDA interrompe a aquisição da extinção (Queda et al, 1992; Laurent et al, 2008; Zimmerman e Maren, 2010), enquanto que o bloqueio dos receptores NMDA na CE não a afeta (Zimmerman e Maren, 2010). Já o córtex infra-límbico é crítico para a consolidação e de evocação da extinção (Quirk et al, 1997) e o hipocampo está envolvido na extinção relacionada ao contexto (Ji e Maren, 1997).

Estudos prévios do nosso grupos (Lazaroni et al, 2012) mostraram que a especificamente em um animal com deleção genética do receptor Mas, ligante endógeno para a Ang-(1-7), não há prejuízo de memória de medo na esquiva inibitória e na memória de trabalho. Porém estes animais apresentaram déficit da memória do tipo episódica. Este achados discutem que não são todas memórias hipocampo-dependentes que são sensíveis a prejuízos. A memória testada na esquiva inibitória depende além do hipocampo de amígdala e septo medial (Chen et al, 2013). A memória de trabalho testada no labirinto em Y baseia-se na atividade exploratória do animal e a memória do tipo episódica envolve pouca participação da amígdala. Além disso, estes achado mostram

que a integridade do eixo em questão é importante para a consolidação da memória do tipo episódica.

## **1.2. O EIXO ANGIOTENSINA-(1-7)/RECEPTOR MAS**

O estudo da fisiologia cardiovascular demonstrou há cerca de um século que órgãos como rins, adrenais e pulmões são capazes de secretar peptídeos e hormônios vasoativos que atuam regulando as pressões dos fluidos corporais (revisado por Ferrario, 2006). Um dos sistemas clássicos responsáveis por tal controle pressor é o sistema renina-angiotensina. A renina é uma aspartil-protease que é secretada pelo rim em resposta a quedas na perfusão renal. Uma vez secretada, a renina atua sobre receptores de (pro)renina que causam aumento da resistência vascular periférica a fim de aumentar o débito cardíaco e assim restaurar a pressão arterial e perfusão sistêmica, gerando uma alça de retroalimentação sobre a perfusão renal. Além disso, a renina também cliva o angiotensinogênio em angiotensina I, que apesar de baixo poder vasoconstritor, serve como substrato para a formação de angiotensina II pela enzima conversora de angiotensina (ECA) presente no plasma (Nguyen et al. 2002). A angiotensina II, que é considerado o mais potente peptídeo desse sistema (Peach, 1977; Saavedra, 1992; Wright e Harding, 1992), restabelece a pressão arterial, permitindo que a perfusão tecidual aumente.

A angiotensina II age através de dois tipos de receptores metabotrópicos, AT1 e AT2. O receptor AT2 é expresso em menor quantidade no organismo adulto e tem efeitos por vezes antagônicos à ativação de AT1

(revisado por Ferrario, 2006). O efeito vasoconstritor da angiotensina II se dá principalmente pela ativação do receptor AT1. O receptor AT1 é largamente expresso nos tecidos, inclusive no cérebro. A angiotensina II atua sobre o sistema nervoso simpático causando facilitação adrenérgica (Abdulla et al. 2011). Além disso, exerce inibição lateral sobre os reflexos comandados pelos barorreceptores e tem ação regulatória sobre o mecanismo da sede, elevando a ingestão hídrica (McMullan et al. 2007; Fitzsimons e Simons, 1969). A angiotensina II pode ainda modular a ação dos hormônios hipofisários ACTH, prolactina e LH (Macova et al. 2010).

A cascata de eventos vasomotores continua quando a angiotensina II é clivada pela enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) em angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] Este último peptídeo costuma ter efeitos antagônicos ao da angiotensina II. O receptor preferencialmente ativado pela Ang-(1-7) é o receptor Mas (Santos et al. 2003), cuja ativação causa vasodilatação (Peiro et al. 2013). Além disso, dependendo da concentração a Ang-(1-7) (2uM a 104uM) é capaz de se ligar inespecificamente aos receptores AT1 e AT2 (150 vezes menos específico no primeiro e 6000 vezes menos no segundo que a AngII), agindo como um agonista fraco (Rowe et al. 1994).

Sabe-se atualmente que o sistema renina-angiotensina está envolvido em funções além das cardiovasculares, como por exemplo funções cognitivas como ansiedade, depressão, aprendizagem e memória (Passos-Silva et al. 2013). De fato, componentes do sistema renina angiotensina são expresso no cérebro de maneira não homogênea. Os receptores AT1 e Mas são largamente expressos no hipocampo e amígdala. Os receptores AT2 no hipocampo e hipotálamo. Os receptores de renina são encontrados no hipocampo e cerebelo

(Lavoie et al. 2004 ; Barnes et al. 1993; Benarroch and Schmeichel 1998; Chai et al. 2000; Harding et al. 1992; von Bohlen und Halbach and Albrecht 2000; Wright et al. 1993; Zhuo et al. 1998).

A angiotensina II no hipocampo é capaz de impedir a consolidação da memória condicionada ao medo em ratos através da ativação de receptores AT2 (Kerr et al., 2005). O peptídeo em questão é capaz de inibir a LTP e a LTD, que são fenômenos eletrofisiológicos relacionados à aprendizagem e memória (Denny et al. 1991 ; Whitlock et al 2006).

Além disso, os componentes do sistema renina angiotensina cerebral agem de maneira muito mais intrincada do que o modelo linear que vigorava décadas atrás. É sabido que há outras enzimas capazes de clivar as angiotensinas, como a NEP, TOP, POP. Já a ECA é capaz de converter a Ang I diretamente em angiotensina-(1-7) (Xia e Lazartigues, 2008). Pereira e colaboradores (2013) mostraram recentemente que no hipocampo de ratos a produção de Ang-(1-7) diretamente de Ang I se dá via TOP.

A ativação do eixo angiotensina-(1-7)/receptor Mas não só contrabalança a ativação dos receptores AT1 pela Ang II, como o próprio receptor Mas é capaz de diminuir a expressão celular do receptor AT1 por um mecanismo de heterodimerização (Kostenis et al. 2005). A ação de drogas que inibem a ação da ECA (captopril) ou que bloqueiam o receptor de AT1 (losartan) são capazes de melhorar a memória e diminuir o comportamento ansioso (Raghavendra et al. 2001 ; Hajjar et al., 2008).

O eixo angiotensina-(1-7)/receptor Mas, faz parte dos componentes de recente estudo/elucidação do sistema renina angiotensina. Vários modelos

foram desenvolvidos para sua melhor compreensão. O bloqueio farmacológico do receptor Mas e a deleção genética deste receptor tem fornecido valiosas informações sobre sua função fisiológica, inclusive no sistema nervoso central. Já foi demonstrado que a angiotensina-(1-7) é capaz de potencializar a LTP (Hellner et al. 2005). Além disso, é capaz de melhorar o desempenho de roedores em tarefas de memória, diminuir o comportamento do tipo ansioso e inibir a formação de memórias do tipo aversivas (Hellner et al, 2005 ; Bild e Ciobica, 2012).

Nosso grupo demonstrou recentemente que a integridade do eixo angiotensina-(1-7)/receptor Mas é fundamental para formação das memórias do tipo declarativas em roedores, uma vez que animais MasKo apresentam prejuízo nas memórias do tipo episódica (Lazaroni et al. 2011).

### **1.3. SISTEMA NITRÉRGICO**

O sistema nitrérgico é uma das vias de saída efetoras do sistema renina angiotensina (Forstermann e Sessa, 2012). O óxido nítrico é um gás produzido pela clivagem de L-arginina em L-citrulina. Sua meia vida é curta, cerca de 5 segundos (Paul e Ekambaran, 2011). Se difunde por cerca de 200uM e pode cobrir até dois milhões de sinapses (revisado por Steinert et al, 2008).

As enzimas produtoras de óxido nítrico são chamadas de óxido nítrico sintases (NOS) e existem em três isoformas principais nos mamíferos. A óxido nítrico endotelial, a induzível e a neuronal. A óxido nítrico endotelial, também chamada de NOS3, é encontrada em células endoteliais e é a principal enzima

constitucional produtora de óxido nítrico. Além disso, é encontrada também em células neuronais (Biancardi et al. 2011). A óxido nítrico sintase induzível, ou NOS2, é sintetizada em resposta a processos inflamatórios. E a óxido nítrico neuronal, ou NOS1, é encontrada em células neuronais e gliais, principalmente nas espinhas dendríticas, ou seja, em terminais pós-sinápticos. A NOS1 pode estar presente também em células do músculo estriado esquelético e cardíaco e no músculo liso. A NOS1 e a NOS3 são constitutivamente expressas e suas atividades são dependentes de cálcio (Bredt et al. 1999 ; Calabrese et al. 2007; Schwartz et al.1999 ; Xu et al. 1999 ; Rothe et al. 2005 ; McConell et al.2007).

No tecido nervoso a NOS1 tem ativação fásica e a NOS3 tem ativação tônica. Além disso a NOS1 tem taxa de hemerredução menor, o que implica em maior liberação de NO ao ser ativada. A diferença molecular dessas duas principais enzimas produtoras de NO no tecido nervoso torna a biossíntese de NO cerca de 30 vezes maior pela NOS1 quando comparada com a NOS3 (Stuehr et al, 2004). Além disso a atividade da NOS1 é cerca de quatro vezes maior no neurônio que a NOS3 (Stuehr et al, 2004).

A atividade das NOS é modulada, além de co-fatores como o cálcio, por fosforilação. Quando fosforiladas podem apresentar-se na forma ativa ou inativa. Os sítios de ativação da NOS3 são Ser633 (pela PKA) e Ser1177 (pelas AMPK, AKT, PKA, CAMKII, PKG, FOSFATASE 2), já o sítio de inativação (pela PKC) desta mesma enzima é Thr495 (Chen et al. 1999; Fulton et al. 1999; Bauer et al. 2003; Matsubara et al. 2003). Os sítios de ativação da NOS1 são Ser847 (CAMK II gera inativação enquanto a FOSFATASE 1 ativa a enzima quando o fosforila) e Ser1412 (AKT), e os de inativação são Ser852 (PKA e PKG) e Ser741 (CAMKII) (Yoshitomi et al. 2010). (Fulton et al. 1999;

Dimmeler et al. 1999; Michell et al. 1999 e 2002 ; Boo et al. 2002 ; Butt et al. 2000).

A Ang-(1-7) é capaz de estimular a fosforilação da AKT via PI3K (Giani et al. 2007). Receptores de membrana, como o Mas, são capazes de alterar a conformação da PI3K, que por sua vez medeia a conversão de PIP2 (fosfatidilinositol bifosfato) em PIP3 na membrana. A AKT, que é uma proteína cinase de serina/treonina se liga ao PIP3 na membrana, o que permite sua fosforilação pela PDK1. A ativação da AKT é dependente de PI3K e a via PI3K/AKT pode ser ativada pelo eixo Ang-(1-7)/Mas (McManus et al. 2004; Shiojima e Walsh, 2006; Brazil e Hammings, 2001), o que pode culminar com a ativação de NOS.

O sistema nitrérgico pode também ser ativado via CaMKII (Shah et al. 2010 ; Muthalif et al. 1998 ; Ronkainen et al. 2007, Mouna et al. 2007). A cinase cálcio-calmodulina dependente II (CaMKII) é a proteína mais abundante na pós-sinapse (Cheng et al. 2006), e é necessária para a LTP (Silva et al. 1992; Giese et al. 1998 ; Lisman et al. 2002), plasticidade sináptica (Matsuzaki et al. 2004 ; Lee et al. 2009; Pi et al. 2010) e algumas formas de aprendizagem e memória (Giese et al. 1998; Glazewski et al. 2000; Frankland et al. 2001 ; Silva, 2003). A CaMKII é uma enzima que consiste em 12 subunidades e cada uma delas atua como uma cinase de serina/treonina (Rosenberg et al. 2006). Quando a concentração de cálcio se eleva, a cálcio-calmodulina se liga a uma das subunidades da CaMKII, o que muda a conformação estrutural da CaMKII, expondo seu domínio cinase (Lisman et al. 2002 ; Rosenberg et al. 2006 ; Chao et al. 2010). A ativação de duas subunidades adjacentes causa uma autofosforilação na Trh286 da CaMKII. A CaMKII pode permanecer ativada

independentemente da interação cálcio-calmodulina através de sua autofosforilação, permanecendo assim mesmo após a dissociação do cálcio (Saitoh e Schwartz 1985; Lou et al. 1986; Miller e Kennedy 1986; Yang e Schulman 1999).

A ativação de NMDA, leva a abertura de canais de cálcio e o aporte iônico atua na fosforilação da CAMKII ou AKT neuronais. Estas são vias importantes na fosforilação das NOS, atuando na sua ativação. Após este evento o óxido nítrico (NO) atravessa a membrana do terminal pós-sináptico e se difunde retrogradamente para agir nas células pré-sinápticas, onde pode modular a liberação de neurotransmissores (Hawkins et al., 1998 e O'Dell et al., 1991). Na pré-sinapse o principal alvo do NO é a guanilato ciclase solúvel (GCs), que após ser ativada contribui na síntese do segundo mensageiro monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) (Bredt e Snyder, 1989). O GMPc ativa a proteína cinase dependente de GMPc (PKG), que por sua vez pode fosforilar uma série de substratos. O GMPc também pode ativar canais iônicos em neurônios hipocámpais, no cerebelo, bulbo olfatório e hipófise (Bradley et al., 1995; El Husseini et al., 1995; Finn et al., 1996; Biel et al., 1998) modulando, então, a liberação de neurotransmissores como glutamato e GABA (Ferrendelli et al.1974 ; Miki et al.1977 ; Baratti 1996 e 2009 ; Izquierdo et al., 2006). No hipocampo, por exemplo, o aumento da liberação de glutamato induzido pelo aumento de NO parece ser fundamental para LTP hipocámpal, já que doadores de NO aumentam a LTP (Lange et al. 2012), enquanto antagonistas das NOS inibem (Johnstone e Raymond, 2011 ; Li et al. 2012). Vide figura 2 onde as vias descritas acima estão ilustradas sumariamente.

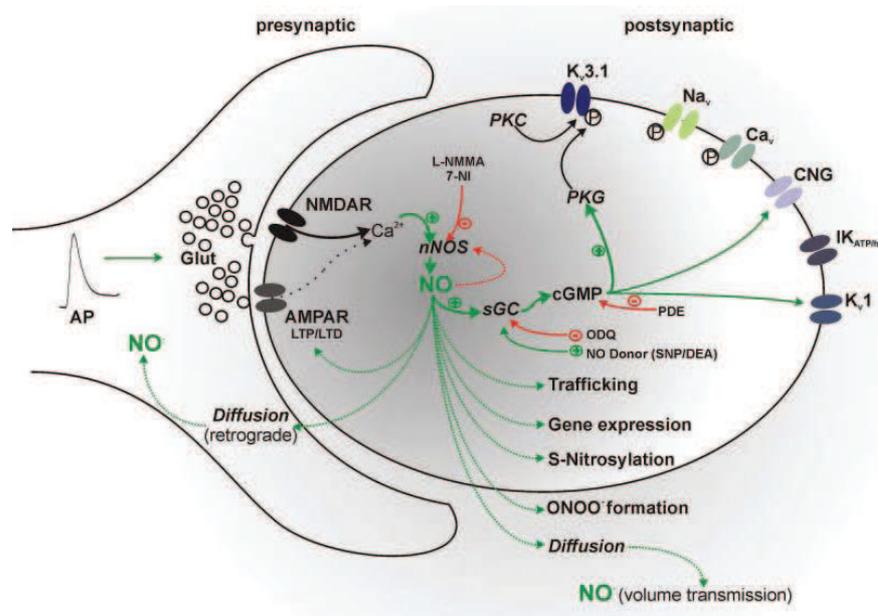


Figura 2 – Vias de sinalização moduladas pelo NO, retirado de Steinert, 2010. A liberação de glutamato (Glut) na fenda sináptica ativa receptores NMDA (NMDAR) e AMPA (AMPA) que culminam com a liberação de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) que ativa as óxido nítrico sintases (nNOS) que culminam com a liberação de óxido nítrico (NO). A liberação de NO estimula as vias de cGMP, expressão genica, s-nitrosilação e formação de peroxinitrito. O óxido nítrico também é capaz de se difundir para o neurônio pré-sináptico onde atua como neuromodulador. Já o cGMP estimula as vias de sinalização de PKG e também na ativação de canais de potássio.

A síntese de NO é um processo altamente regulado. Entretanto, o consumo ou decaimento do NO depende quase que exclusivamente da disponibilidade de alvos potenciais. Entre estes alvos está o  $\text{O}_2^-$ , cujo produto desta reação é o peroxinitrito. Em contrapartida, a superóxido dismutase (SOD) também reage com  $\text{O}_2^-$  competindo com o NO. Portanto a SOD é capaz de

atenuar altas concentrações de espécies reativas de oxigênio (ROS). Por outro lado a NOX2 é uma enzima diretamente envolvida na produção destes radicais. De forma esquemática: a ativação das NOS por ação da Ang-(1-7) aumenta a liberação de NO. Já a Ang II ativa as NOX2 que levam a síntese de NADPH e com isso elevação de superóxido. A SOD catalisa o superóxido culminando na liberação de peróxido de hidrogênio e oxigênio. O NO também reage com o superóxido e produz o peroxinitrito. (Stuehr et al, 2004).

As enzimas produtoras de ROS podem ser moduladas pela concentração de NO presente no tecido (Jin et al. 2012). As ROS incluem o superóxido ( $O_2^-$ ) o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e os radicais hidroxilas, que são produtos tóxicos da respiração celular. Entretanto, o superóxido e o peróxido de hidrogênio também são capazes de atuar na sinalização celular, estimulando receptores de membrana (Clempus e Griending, 2006).

A SOD e as catalases são as principais enzimas envolvidas na degradação das ROS (Sies 1997). A SOD catalisa a dismutação do  $O_2^-$  para  $H_2O$  e oxigênio, e é expressa constitutivamente em três formas: a SOD1 que se localiza principalmente no citoplasma, mas também está presente na mitocôndria, a SOD2 que é expressa somente na matriz mitocondrial e a SOD3 que é encontrada no compartimento extracelular (Zimmerman, 2011). Portanto, a atividade da SOD é um mecanismo de defesa celular importante em processos de oxidação (Sies, 1997).

O NO tem papel crucial em várias formas de aprendizado, como a memória espacial, olfatória, esquiva inibitória e medo condicionado (Baratti e Boccia, 1999; Böhme et al. 1993; Chapman et al. 1992; Schafe et al. 2005; Yildiz Akar et al. 2007; Brenman e Bredt, 1997 ; Prast e Philippu, 2001).

Dias-Peixoto et al.(2008) e Rabelo et al.(2008) demonstraram que o sistema nitrégico está prejudicado nos camundongos MasKo em órgãos periféricos, o que seria plausível ocorrer também no sistema nervoso central. Interessantemente, estudos prévios mostraram que nos camundongos MasKo há maior oxidação celular (Rabelo et al. 2008).

No presente estudo investigamos se o déficit de memória do tipo episódica observado em animais com o eixo Ang-(1-7)/Mas prejudicado é devido a um déficit na neuromodulação nitrégica. Além disso, investigamos o papel deste mesmo eixo na memória de medo.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS**

### **4.1 Aprovação dos protocolos pelo comitê de ética**

Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal – CETEA - desta Universidade (protocolo 167/2008) e pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – também desta Universidade (protocolo 136/2011).

### **4.2 Animais**

Os camundongos nocautes para o receptor Mas, bem como seus respectivos controles, camundongos de mesmo background genético, FVB/N ou C57BL/6, foram fornecidos pelo biotério do laboratório de Hipertensão Bioquímica do Departamento de Fisiologia e Biofísica da UFMG. Os animais C57BL/6 utilizados apenas para investigação farmacológica foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo do ICB/UFMG. Foi necessário no presente trabalho o uso de duas linhagens de camundongos uma vez que há um dimorfismo em testes comportamentais entre elas (vide tabela 2 e suas referências). A linhagem FVB/N foi utilizada na maior parte dos experimentos, porém nos teste de medo condicionado contextual foi necessário o uso da linhagem C57BL/6 uma vez que os FVB/N apresentam prejuízos em tarefas espaciais. Além disso, outras diferenças entre as duas linhagens quanto a deleção do receptor Mas estão demonstradas na tabela 1 a seguir.

<b>Critério</b>	<b>FVB/N</b>	<b>C57</b>
Disfunção endotelial	presente	menor
Pressão arterial	hipertensos	Normotensos
Síndrome metabólica	presente	Não avaliada
Ansiedade	Não ansiosos	Ansiosos
Memória espacial	Prejudicada (TRO)	Prejudicada
Memória do tipo episódica	prejudicada	Não avaliada
Tônus simpático	alterado	alterado

Tabela 1 – Diferenças entre as duas linhagens de camundongos (FVB/N e C57BL/6) nocautes para o receptor Mas em vários aspectos fisiológicos, cognitivos e comportamentais. (Whalter et al, 1998 ; Lazaroni et al, 2012 ; Rabelo et al, 2008 ; Whalter et al, 2000 ; Moura et al, 2007 ; Santos et al, 2007).

Todos os animais foram mantidos em estante ventilada, própria para animais de laboratório, com temperatura constante de  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$  e umidade entre 40-70%. A sala onde se localiza esta estante possuiu controle do ciclo claro-escuro, 12/12 horas. Em cada gaiola foram mantidos de 3 a 5 camundongos com alimento e água *ad libitum*.

Todos os protocolos foram realizados observando-se as normas internacionais contidas no, "Guide For The Care And Use Of Laboratory Animals" Editado pelo "US National Institutes Of Health (NIH publication nº 85 – 23 revisado em 1996).

### **4.3. Análise Estatística**

Os resultados de western blot, concentração de nitrito, labirinto em cruz elevado, radioimunoensaio e reconhecimento de objetos foram expressos como Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM) e utilizou-se o Teste-*t* de Student não pareado para analisar os dados.

Os resultados da curva dose-resposta de losartan intra-hipocampal e concentração de nitrito em animais expostos a objetos foram expressos como Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM) e utilizou-se ANOVA de uma via com post-hoc de Bonferroni para analisar os dados.

Os resultados de esQUIVA inibitória foram inicialmente submetidos ao teste de normalidade de D'Agostino e Pearson e apesar dos dados provenientes do grupo FVB/N apresentarem distribuição normal, os dados dos

animais MasKo não apresentaram distribuição normal. Sendo assim, analisamos os dados com estatística não paramétrica, Kruskal-Wallis com Dunn's Multiple Comparison Test.

Os resultados da atividade locomotora, condicionamento ao som e ao contexto foram analisados utilizando-se ANOVA de duas vias repetida, já a escala de resposta ao choque foi analisada com ANOVA de duas vias não repetida.

#### **4.4 Western blot**

O protocolo de Western Blot foi utilizado para análise da expressão de proteínas hipocâmpais, a saber: ECA2 (FVB/N n= 8, MasKo n=8) (Alpha Diagnostic, 786465A1), NOS1 total (Santa Cruz, sc-8309), NOS1 fosforilada no resíduo Ser 852 (Santa Cruz, sc-19826), NOS3 total (Santa Cruz, sc-654), NOS3 fosforilada no resíduo Ser1177 (Santa Cruz, sc-12972), NOS3 fosforilada no resíduo Thr495 (Cell Signaling, 9574S), SOD1 (Upstate, 06984), NOX2 (AbCam, ab43801), AKT (Cell Signaling, 9272S), AKT fosforilada no resíduo Ser473 (Cell Signaling 9271S) e PI3K (Cell Signaling, 5569s)..

Os animais foram eutanasiados e os cérebros dissecados para isolamento de córtex e hipocampo. Os tecidos foram congelados em freezer - 80°C e posteriormente homogeneizados em tampão de lise. A concentração de proteínas de cada amostra foi determinada utilizando o método de Bradford. Em gel de eletroforese que variou de 8 a 12% dependendo do tamanho da proteína estudada, foi pipetado de 25 a 50 ug de proteína de cada amostra,

previamente marcada com SDS 5x e desnaturadas em banho-maria a 95°C por 5 minutos. As amostras passaram pela etapa de corrida à 100 volts durante cerca de 120 minutos. Após a corrida das amostras em gel, o processo de transferência para membrana de nitrocelulose ou PVDF foi feito também a 100 volts.

Após as proteínas terem sido transferidas para a membrana, esta foi incubada com solução de bloqueio (BSA a 5% em TBS) por 60 minutos e posteriormente com solução contendo um anticorpo primário destinado à proteína de interesse onde permaneceu em agitação overnight à 4°C. No dia seguinte, as membranas foram lavadas e depois incubadas com anticorpo secundário fluorescente por 60 minutos. Após a lavagem com anticorpo secundário as membranas foram lavadas novamente e colocadas em scanner de fluorescência ODYSSEY®. As bandas foram identificadas segundo um padrão fluorescente de peso molecular. As imagens foram então analisadas e as bandas foram quantificadas de acordo com sua intensidade, o que é um correspondente indireto da quantidade da proteína. Além disso, utilizou-se como normalizador da quantidade de proteína pipetada, a expressão de  $\beta$ -actina presentes na mesma membrana.

#### **4.5. Cirurgia para implantação de cânulas intra-hipocampus**

Sob anestesia (cetamina a 70mg/kg e xilazina a 10mg/kg) os animais foram colocados no aparelho estereotáxico, foi feita uma incisão de aproximadamente 5mm no topo da cabeça do animal, o perióstio removido

mecanicamente e feito três orifícios de 1.1 mm na superfície óssea do crânio. Duas cânulas de 26G foram implantadas obedecendo às coordenadas da região CA1 do hipocampo dorsal (DV 1.0mm, LL 1.6mm, AP 1.94mm). As cânulas foram fixadas à cabeça do animal com cimento dental de zinco e uma cânula oclusora permaneceu no interior da cânula guia para evitar entupimento. Um pequeno parafuso (2mm) foi ancorado no osso frontal para manter o capacete mais estável. As drogas foram administradas no volume de 0.5  $\mu$ L/lado em velocidade aproximada de 5 $\mu$ L/h através de uma cânula injetora de 33G que foi acoplada a um tubo de polietileno unido a uma seringa de Hamilton de 1ul (Lazaroni et al., 2012).

Na ocasião da histologia, os cérebros foram transferidos para solução de paraformaldeído a 10% durante 24 horas e sacarose a 20% durante 48 horas, posteriormente fatiados em micrótomo criostato a fim de se preparar lâminas histológicas que foram coradas em vermelho neutro. O principal objetivo desta etapa foi a verificação do local exato onde a cânula foi implantada. Somente animais com cânulas na região de interesse foram incluídos nas análises dos dados.

#### **4.6 Análises Farmacológicas**

As drogas utilizadas foram:

1. Losartan Potássico (Sigma®), antagonista de receptores AT<sub>1</sub>, na concentração de 10mg/kg, via intraperitoneal, administrado imediatamente após cada sessão de teste no condicionamento ao medo (Polidori et al., 1996; Raghavendra et al., 2001; Wang et al.,

2003). Além disso, uma curva de losartan intra-hipocampal foi realizada nas concentrações de 0.2 , 2 , 20 e 200 uM. A droga foi injetada imediatamente após o treino da tarefa de reconhecimento de objetos.

2. Angiotensina-(1-7), obtida do laboratório de hipertensão bioquímica e injetada intra-hipocampal nas concentrações de 1mg/ml e 2mg/ml.
3. A-779, bloqueador do receptor Mas, obtida do laboratório de Hipertensão Bioquímica e injetada intra-hipocampal nas concentrações de 1 e 5 mg/ml.
4. L-NAME, inibidor de óxido nítrico sintases, (SIGMA®), injetado intra-hipocampal na concentração de 1 µg/µl (Rezayof et al. 2010).
5. SNAP, doador de óxido nítrico, (SIGMA®), injetado intra-hipocampal na concentração 10µg/µl e diluído em DMSO 30% (Furini et al. 2010).

Além disso, os grupos controle receberam mesmo volume de salina pela mesma via de administração da droga de interesse, exceto os controle do grupo SNAP que receberam solução de DMSO 30%, respeitando-se o mesmo intervalo de aplicação das drogas.