

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**PROTEÍNA GLIAL S100B E PROCESSAMENTO DA
MEMÓRIA: DEPENDÊNCIA DA SÍNTESE DE ARNm
PARA A FORMAÇÃO DE UM NOVO APRENDIZADO**

Clarissa Camboim

**ORIENTADOR:
Prof. Dr. Jorge Alberto Quillfeldt**

**CO-ORIENTADOR:
Prof. Dr. Carlos Alberto Saraiva Gonçalves**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas -Neurociências

**Porto Alegre
Dezembro de 2007**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a duas pessoas que me mostraram (e mostram) o verdadeiro amor ao conhecimento, à ciência e à educação. Sem eles, talvez, não teria tido o privilégio e a oportunidade de encontrar a profissão que verdadeiramente amo.

Obrigada, minha adorada irmã, Paula e meu querido orientador Jorge. Vocês são pessoas muitíssimo especiais em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

Primeiramente aos queridos amigos e colegas de laboratório, tanto àqueles que lá ainda estão, quanto àqueles que já lá não mais se encontram. Em especial agradeço Ao Lucas Fürstenau e ao Felipe, pois sem eles com certeza este trabalho não seria possível;

À dona Zelma, por cuidar tão bem de mim e dos nossos ratinhos;

Ao meu orientador, Jorge Quillfeldt, pelas horas exaustivas destinadas a conclusão deste trabalho e a todo suporte técnico e motivação oferecidos;

Ao meu co-orientador, Carlos Alberto Gonçalves, pela disponibilidade e auxílio constante durante este período;

Ao professor Tadeu Mello e Souza, pela ajuda prestada e o incentivo fornecido para a realização dos experimentos;

À Simone, por fazer parte da minha vida e sempre estar ao meu lado, em todas as horas;

E, por último, à minha família, por todo o apoio e compreensão importantíssimo que vêm me dando em um momento tão delicado da minha vida.

SUMÁRIO

<i>Dedicatória</i>	2
Agradecimentos.....	3
<i>Sumário</i>	4
<i>Resumo</i>	6
<i>Publicações</i>	7

1. Introdução

1. 1. Memória.....	8
1. 2. Aquisição, consolidação e evocação da memória.....	8
1. 3. Síntese Protéica e Memória.....	10
1. 4. A Proteína S100B.....	12
1. 4. 1. Proteínas ligantes de cálcio.....	12
1. 4. 2. S100B e memória.....	14

2. Objetivos

2. 1. Objetivo Geral.....	16
2. 2. Objetivos Específicos.....	16

3. Material e Métodos

3. 1. Animais.....	17
3. 2. Procedimento Cirúrgico.....	17
3. 3. Tarefa Comportamental.....	17
3. 4. Fármacos Utilizados.....	18
3. 5. Infusão das Drogas / Desenho Experimental.....	19
3. 6. Análise do Posicionamento das Cânulas.....	21
3. 7. Análise Estatística.....	21

4. Resultados

4. 1. S100B e a consolidação da memória.....	22
4. 2. S100B e a evocação da memória.....	24
4. 3. DRB e a consolidação da memória.....	26
4. 4. S100B e a consolidação da memória – Mecanismo de facilitação I	28
4. 4. 1. Infusão bilateral de S100B (2 μ M) concomitantemente à de DRB (2,5 μ M).....	28
4. 4. 2. Infusão bilateral de S100B (4 μ M) concomitante à de DRB (2,5 μ M).....	30
4. 5. S100B e a consolidação da memória – Mecanismo de facilitação II....	32
5. Discussão.....	34
5. 1. S100B e a consolidação da memória.....	34
5. 2. S100B e a evocação da memória.....	34
5. 3. DRB e a consolidação da memória.....	35
5. 4. S100B e a consolidação da memória: Mecanismo de facilitação I.....	36
5. 4. 1. Infusão bilateral de S100B (2 μ M) concomitantemente à de DRB (2,5 μ M).....	37
5. 4. 2. Infusão bilateral de S100B (4 μ M) concomitante à de DRB (2,5 μ M).....	37
5. 5. S100B e a consolidação da memória – Mecanismo de facilitação II....	38
6. Conclusões.....	39
7. Bibliografia.....	40

RESUMO

A S100B é uma proteína neurotrófica ligante de cálcio sintetizada e secretada por astrócitos desempenhando funções intra e extracelulares. Estudos anteriores em nosso laboratório demonstraram que a S100B, quando infundida exogenamente no hipocampo dorsal de ratos, imediatamente após o treino na tarefa de Esquiva Inibitória, facilita a consolidação dessa memória aversiva (Mello e Souza et al., 2000). É sabido que, para que ocorram as modificações permanentes necessárias para a consolidação da memória de longa duração decorrentes de um novo aprendizado, diversos processos plásticos ocorrem no nível celular, envolvendo, por exemplo, modificações bioquímicas, entre elas, a síntese protéica. Este trabalho tem como objetivo tentar compreender o mecanismo pelo qual a proteína S100B, quando administrada no hipocampo dorsal de ratos, afeta a consolidação e a evocação de uma memória aversiva (esquiva inibitória). Para tanto, infundimos a proteína pré-teste no hipocampo dorsal de ratos, em diferentes concentrações, e verificamos seus efeitos sobre a retenção da memória daquela tarefa aversiva. Também estudamos o possível papel da síntese protéica na mediação do efeito facilitatório pós-treino já descrito, empregando um inibidor da síntese de ARN, o DRB: com a infusão de DRB em concentração sem efeito comportamental próprio, tentamos reverter o efeito facilitatório da S100B infundida imediatamente após o treino. Para saber em qual das duas fases da síntese protéica, infundimos o DRB tanto imediatamente quanto 2 h pós-treino. A S100B não teve qualquer efeito na evocação (pré-teste), apenas na consolidação (imediatamente pós-treino), sendo este efeito revertido pelo DRB infundido tanto concomitantemente (primeira fase) quanto 2 h após o treino (segunda fase da síntese protéica) na tarefa de esquiva inibitória. Nossos resultados apóiam a hipótese de mediação da ação facilitatória da S100B com base nos processos de síntese protéica, em suas duas etapas, possivelmente um ingrediente necessário à construção de um engrama de memória estável como se espera de uma memória de longa duração.

Trabalho em preparação relacionado com esta dissertação:

Camboim, C., Diehl, F., Fürstenau de Oliveira, L., Mello e Souza, T., Gonçalves, C.A.S., Quillfeldt, J.A. (2008). **S100B infusion into the rat hippocampus affects memory consolidation but not recall of an aversive memory, and depends on the two post-training phases of mRNA synthesis.** Em preparação (a ser submetida até fevereiro de 2008, possivelmente à revista *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*).

1. Introdução

1. 1. Memória

Nós somos aquilo que aprendemos a ser. Somos um conjunto de memórias adquiridas em diversos momentos de nossas vidas e apenas podemos fazer aquilo que sabemos como fazer e comunicar aquilo que conhecemos. Em nosso encéfalo estão guardadas inúmeras experiências transformadas naquilo que chamamos de memórias. Portanto, memória é a aquisição, a formação, a conservação e a evocação de informações (Izquierdo, 2002).

Para os seres humanos, a aquisição adequada de informações é de vital importância para a sobrevivência do indivíduo no meio competitivo em que vive. Da mesma forma, um animal em seu habitat natural precisa da boa formação de suas memórias para sua sobrevivência num mundo em que a percepção de onde buscar alimento é fundamental.

Nestes dois mundos diferentes observamos a necessidade e a importância deste sistema fisiológico presente evolutivamente desde muito cedo nos seres vivos. A aquisição, a conservação e a evocação de informações relevantes mostram-se uma característica primordial para o estabelecimento da vida.

1. 2. Aquisição, consolidação e evocação da memória

A memória de longa duração, aquela que pode durar alguns dias ou meses, ou até muitas décadas, costuma ser dividida em uma fase de formação e uma de evocação. Para ser evocada, ou “lembrada”, porém, a memória primeiramente deve ser formada. Esta formação pode ser dividida em duas diferentes fases, a aquisição e a consolidação.

A aquisição é o momento em que somos expostos á nova experiência. Quase simultaneamente inicia a fase de consolidação da memória que é uma fase lábil e duradoura (McGaugh, 2000). Nesta fase ocorre uma série de processos metabólicos no hipocampo e em outras estruturas cerebrais, que duram entre três e oito horas (Izquierdo & Medina, 1997). Enquanto estes processos não são concluídos a fase de consolidação também não é concluída. É nesta fase em que ocorrem modificações permanentes, ou muito duradouras, da forma e função das sinapses das redes neurais de cada memória (Izquierdo, 2002).

Estando a memória consolidada, essa pode ser evocada a qualquer momento em que, por alguma razão (uma voz, uma cor ou um odor, por exemplo), ocorre a reativação das redes sinápticas daquela memória (Izquierdo, 2002).

Para que ocorram as modificações permanentes necessárias para a consolidação de um novo aprendizado, diversas alterações no nível celular são estabelecidas (Izquierdo, 2002, ver também Izquierdo e Medina, 1997 e McGaugh, 2000):

- Células hipocampais são repetidamente excitadas através da ativação de receptores glutamatérgicos do tipo AMPA, NMDA e metabotrópicos;

- Ocorre a entrada de cálcio nas células hipocampais e uma subsequente ativação de diferentes proteínas quinases (PKA, PKC, MAPK e CaMKII);

- A ativação destas proteínas desencadeia uma cascata de reações que resultam na transcrição gênica de novas proteínas.

Estes processos têm como objetivo aumentar a plasticidade sináptica, modificando a quantidade, a forma, e a função da rede neural daquela memória formada.

Já a evocação da memória, é o momento em que o cérebro recria, em poucos segundos as memórias que levaram horas para serem formadas. Esta recriação nada mais é que a reativação das redes sinápticas modificadas anteriormente pela consolidação da memória.

Para reativar estas redes alguns mecanismos celulares são necessários (Izquierdo 2002):

- Ativação de receptores glutamatérgicos AMPA e metabotrópicos
- Atividade normal de diferentes proteínas quinases (PKA, PKC e MAPK).
- Não envolve síntese protéica.

As diferenças bioquímicas entre a consolidação e a evocação são evidentes. Suas semelhanças estão na ativação do mesmo sistema de neurotransmissores e dos mesmos sistemas de proteínas quinases subseqüentes, mas a diferença fundamental é que a consolidação exige uma síntese de proteínas que a evocação não exige.

1. 3. Síntese Protéica e Memória

A formação da memória de longa duração é uma fase lábil em que diversos processos bioquímicos (citados anteriormente) ocorrem como uma orquestra otimamente regida. A interferência em qualquer um destes processos pode acarretar na não formação da memória no momento processada.

Durante a consolidação da memória de longa duração, um dos processos mais importantes, o qual uma vez interrompido a memória não é formada, é a síntese protéica que se segue ao aprendizado de uma nova tarefa.

Nas últimas décadas, inúmeros estudos com infusão intracerebral de inibidores da síntese protéica têm demonstrado que o processo de consolidação da memória depende da síntese de novas proteínas (Flexner et al., 1962; Davis e Squire, 1984; Izquierdo et al., 1998; Hernandez e Abel, 2008; Gold, 2007) e de ARNm (Agranoff et al., 1967; Squire e Barondes, 1970; Igaz et al., 2002) em determinadas áreas do encéfalo. Tal dependência se observa apenas em memórias de longa duração, consolidadas em processos que se estendem além das primeiras horas pós-treino (McGaugh 1966, 2000; Davis e Squire 1984; Izquierdo et al., 1998), mas não nas de curta duração (Izquierdo et al., 2006).

Estes estudos, em conjunto, sustentam a idéia de que o substrato físico da memória consiste em algum tipo de crescimento ou remodelamento de conexões sinápticas como consequência de um aprendizado – mudança plástica esta que é dependente de síntese protéica, seja no nível da transcrição gênica, seja no da tradução (Gold, 2007; Hernandez e Abel, 2008; Radulovic e Tronson 2007). Tal concepção, porém não é universalmente aceita, pois a maioria dos fármacos nestes estudos, ou são tóxicos, ou causam diversos efeitos inespecíficos que permitem interpretações alternativas para os resultados observados (Hernandez e Abel, 2007)

Sabe-se, porém, que inibidores de síntese protéica bloqueiam a formação da memória quando administrados em diferentes momentos da formação de uma nova memória (Davis e Squire, 1984; Igaz et al, 2002). Basicamente existem dois momentos durante a consolidação da memória em que inibidores como a anisomicina, inibidores de PKA e inibidores de síntese de ARNm, como o DRB (5,6-dicloro-1-β-D-ribofuranosilbenzimidazol), podem influenciar, bloqueando a formação de uma nova memória: quando administrados imediatamente após o treino e numa janela de 3 à 6 horas após o treino (Quevedo et al, 1999, Vianna et al, 1999 e Igaz et al 2002).

Igaz e colaboradores (2002) sugerem que a primeira janela de tempo (em torno do treino) em que a síntese de proteínas é necessária, é a fase em que

fatores de transcrição estão sendo expressos, enquanto que a segunda janela (em torno de 3 à 6 horas depois do treino) é a fase em que proteínas estruturais são expressas. Estas proteínas estruturais, por fim, estariam envolvidas na remodelação sináptica requerida para a formação da memória de longa duração.

O DRB, um inibidor de síntese de ARNm é um fármaco já utilizado em estudos para verificar a influência da síntese protéica pós-aprendizado em esquivas inibitórias (Vianna et al, 1999 e Igaz et al 2002). Neste trabalho, ele é uma ferramenta fundamental na busca dos nossos resultados.

1. 4. A Proteína S100B

1. 4. 1. Proteínas ligantes de cálcio

O cálcio é um dos mais importantes segundos mensageiros intracelulares, pois tem papel fundamental na regulação de diversos processos e eventos, como a transmissão do impulso nervoso, a contração muscular, o crescimento e diferenciação celular, a expressão gênica, a apoptose e a necrose.

Devido à participação do cálcio na comunicação glia-neurônio e sua possível implicação na modulação das funções neurais, as chamadas proteínas ligantes de cálcio tornam-se alvo de vários estudos (Paukert e Bergles, 2006; Todd et al., 2006).

Existem diversas classes dessas proteínas, que atuam regulando os níveis citosólicos de Ca^{++} e /ou desencadeando sinais intracelulares dependentes desse. As proteínas denominadas S100 são uma dessas famílias de proteínas ligantes de cálcio (Heizmann e Cox, 1998).

As S100 são caracterizadas pela presença de dois motivos ligantes de cálcio do tipo *EF-hand*, conectados por uma região intermediária chamada de

região de articulação (*hinge region*) (figura 1.1). Em geral, membros desta família possuem um baixo peso molecular de até 14kDa (Donato, 2001).



Figura 1.1.: Representação esquemática da estrutura secundária de uma proteína S100. Cada região ligante de Ca^{++} (L1 e L2, na região N-terminal e C-terminal, respectivamente) é flanqueada por α -hélices (hélice I e hélice II para L1, e hélice III e IV para L2). Uma região de ligação (*hinge region*, H) conecta as hélices II e III. A hélice IV é continuada por uma extensão C-terminal.

Dentro desta família, destaca-se a S100B, proteína citosólica expressa no por astrócitos. No Sistema nervoso Central (SNC) ela pode alterar vias metabólicas dependentes de cálcio nos astrócitos ou ser secretada agindo sobre neurônios, aumentando nestes, o nível intracelular de cálcio (Barger & Van Eldik, 1992). Essa proteína é de especial interesse pelo fato de ser super-expressa em doenças como Alzheimer e a Síndrome de Down (Griffin et al., 1989).

Diversas observações demonstram um papel importante da secreção da S100B para o meio extracelular. Esta atua como fator neurotrófico, tanto no desenvolvimento neuronal, quanto na regeneração de nervos. Particularmente, podemos citar a participação da S100B no desenvolvimento de neuritos de neurônios serotoninérgicos. Na verdade, a S100B é considerada o mais potente fator trófico para estes neurônios (Nishiyama, 2002).

O sinal trófico da proteína é mediado por um receptor transmembrana multi-ligante, chamado RAGE. Este se encontra expresso tanto em células gliais como em neurônios e é sensível a toda a família das S100, mas principalmente à S100B. Entretanto este não é considerado o único receptor das S100 (Donato, 2001; Huttunen et al., 2000).

1. 4. 2. S100B e memória

Como citado anteriormente, diversos processos neurais são regulados pelo íon cálcio. Além de funcionar como segundo mensageiro na sinalização da transcrição gênica, este está relacionado com morte, crescimento e diferenciação celular e está diretamente envolvido na liberação de neurotransmissores.

Considerando-se a relação entre a S100B e processos dependentes de cálcio, podemos sugerir que esta talvez tenha um papel na função neuronal. Ao observarmos resultados obtidos em trabalhos que relacionavam a proteína e memória, temos comprovação de que tal suposição é verdadeira (Gerlai et al., 1995; O'Dowd et al., 1997; Mello e Souza et al., 2000; Nishiyama et al., 2002).

Alguns estudos de manipulação gênica, resultaram na identificação de correlação entre a expressão de proteínas ligantes de cálcio e o aprendizado e a memória. Camundongos transgênicos, super-expressando a proteína S100B exibiram aprendizagem reduzida na tarefa comportamental de Labirinto Aquático de Morris, com relação aos animais controle, além de apresentar um decréscimo da potenciação de longa duração (LTP em hipocampo, fenômeno neurofisiológico que é considerado por alguns a base fisiológica da memória (Gerlai et al., 1995).

Nishiyama et al. (2002), utilizando camundongos mutantes que não expressavam a S100B, observou que estes tinham a LTP aumentada e aprendizado facilitado no Labirinto Aquático de Morris, mas não apresentavam nenhum problema no desenvolvimento, nem na citoarquitetura do encéfalo, sugerindo que o efeito da S100B sobre a memória se dá extracelularmente e não tem relação com sua função neurotrófica.

Outro trabalho mostra que pintos tratados com S100B em diferentes tempos, após o treino na tarefa de Esquiva Inibitória, desenvolveram amnésia para tal tarefa (O'Dowd et al., 1997).

Em ratos Wistar, submetidos a tarefa de Esquiva Inibitória, com a administração pós-treino intra-hipocampal de S100B em diferentes concentrações, o resultado foi de facilitação da memória (Mello e Souza et al., 2000) nas concentrações mais altas, enquanto que o mesmo tratamento realizado 10 minutos antes do teste não demonstrou diferença significativa entre os grupos (Camboim, 2003), quando utilizada a concentração mais baixa. Estes dois últimos resultados sugerem que em ratos Wistar, o aumento da S100B hipocampal tem efeito facilitatório sobre a consolidação da memória e talvez nenhum efeito sobre a evocação da memória da tarefa aversiva de Esquiva Inibitória.

Neste trabalho iremos verificar se, na concentração mais alta da S100B também não encontramos efeito sobre a evocação da memória aversiva em ratos. Assim sendo, levantamos a hipótese que, por ser um fator neurotrófico bem reconhecido, a proteína S100B age sobre a consolidação como um, remodelando e aumentando as vias sinápticas requeridas nesta fase de formação da memória. Entretanto, durante a evocação, tal fator não seria necessário, visto que um remodelamento não mais é apropriado e sim uma reativação das vias sinápticas anteriormente estabelecidas, para que a memória seja evocada.

Para verificar tal hipótese, utilizaremos o DRB, um inibidor de síntese de ARNm. Assim, após a tarefa utilizada, não ocorrerá síntese de proteínas estruturais necessária para o remodelamento engatilhado por um fator neurotrófico.

2. Objetivos

2. 1. Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo tentar compreender um dos mecanismos possíveis pelo qual a proteína S100B, quando administrada no hipocampo dorsal de ratos, afeta a consolidação e a evocação de uma memória aversiva (Esquiva Inibitória)

2. 2. Objetivos Específicos

(a) Consolidação: Replicar o efeito facilitatório previamente encontrado (Mello e Souza et al., 2000) da proteína S100B quando administrada pós-treino no hipocampo, em diferentes concentrações, na tarefa de Esquiva Inibitória;

(b) Evocação: Verificar qual o efeito da proteína S100B quando administrada pré-teste no hipocampo, em diferentes concentrações, na tarefa de Esquiva Inibitória;

(c) Ferramenta para estudar o mecanismo da facilitação: verificar o efeito do inibidor de síntese de ARNm, o DRB, em diferentes concentrações, sobre a consolidação da memória em Esquiva Inibitória;

(d) Mecanismo da facilitação I: Verificar comportamental e farmacologicamente se o mecanismo de ação da proteína em (a), depende de um aumento na síntese proteica imediatamente após o treino, empregando um inibidor da síntese de ARNm – o DRB – infundido, em concentração sem efeito próprio, concomitantemente à S100B;

(e) Mecanismo da facilitação II: Verificar comportamental e farmacologicamente se o mecanismo de ação da proteína em (a), depende da segunda onda de síntese de ARNm (Igaz et al., 2002), infundindo o DRB, em concentração sem efeito próprio, duas horas após o treino, juntamente com a infusão da S100B imediatamente após o treino.

3. Material e Métodos

3. 1. Animais

Foram utilizados 347 ratos Wistar machos com 2 a 3 meses de idade e pesando de 250 a 300 gramas, fornecidos pelo Centro de Reprodução e Experimentação com Animais de Laboratório (CREAL) do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais foram aclimatados ao nosso ratário por um período de aproximadamente 7 a 15 dias, onde as condições ambientais de temperatura e umidade foram mantidas constantes.

Os ratos ficavam confinados em caixas acrílicas, com no máximo 6 animais. Comida e água foram oferecidas à vontade.

3. 2. Procedimento Cirúrgico

Os animais foram anestesiados intra-peritonealmente com uma combinação de Cetamina (“Dopalen”) e Xilazina (“Francotar”), numa mistura de 60% de Cetamina e 40% de Xilazina.

Após estarem anestesiados, os animais foram submetidos a uma cirurgia estereotáxica para a implantação bilateral de cânulas em hipocampo dorsal. As coordenadas utilizadas foram: antero-posterior (AP) = - 0,42; látero-lateral (LL) = +/- 0,30; dorso-ventral (DV) = - 0,15 (adaptadas de Paxinos e Watson, 1997, sendo o Bregma a referencia).

Após um período de recuperação de 3 a 4 dias, os animais estavam prontos para os procedimentos comportamentais.

3. 3. Tarefa Comportamental

A tarefa comportamental utilizada foi a Esquiva Inibitória. O experimento consiste em condicionamento clássico ou pavloviano, que funciona pareando um

estímulo condicionado (uma caixa a ser explorada pelo rato) com outro incondicionado (choque elétrico). É, basicamente, um modelo rápido e simples de criar uma memória aversiva que produz uma alteração clara de comportamento dos animais (Izquierdo, 2002).

A tarefa era dividida em uma sessão de treino e uma de teste. No treino os animais eram colocados gentilmente no interior de uma caixa acrílica de dimensões 50X25X25 cm, sobre uma plataforma de madeira (25X8 cm) localizada em uma das extremidades. Ao descerem com as quatro patas no assoalho da caixa, composto por uma grade metálica, os animais receberam um choque intermitente de 0,5 mA por 3 segundos. A latência de descida da plataforma era registrada.

O teste ocorria 24 horas após o treino, com procedimento idêntico ao treino, exceto ao choque. O tempo de descida da plataforma era novamente registrado, sendo este o índice de memória da tarefa. Os animais que aprendem e retêm a memória aversiva da tarefa, tendem a permanecer mais tempo sobre a plataforma. Em todos os grupos o teto máximo de permanência na plataforma no teste é de 180 segundos.

3. 4. Fármacos utilizados

Neste trabalho foram utilizados os seguintes fármacos, nas seguintes concentrações:

- S100B 0,02, 0,2, 2,0 e 4,0 μ M ou seu veículo Tampão Fosfato Salina (TFS);

- 5,6-dicloro-1- β -D-ribofuranosilbenzimidazol (DRB), um inibidor seletivo de síntese de ARN polimerase II, nas concentrações de 0,2, 0,8 ou 4,0 ng/ μ l ou seu veículo DMSO 20%.

3. 5. Infusão dos Fármacos / Desenho Experimental

Este trabalho foi dividido em quatro diferentes experimentos, sendo a infusão da droga similar em todos eles.

A infusão foi feita manualmente com o auxílio de microseringas Hamilton de 5 e/ou 10 µl acopladas a agulhas do tipo “mizzy”, as quais eram 1 mm mais compridas que as cânulas implantadas. Isso permitia que apenas no momento da infusão a região alvo (hipocampo dorsal) fosse atingida.

Cada fármaco era infundido bilateralmente com um fluxo 0,5 µl, injetados durante 90 s; o volume injetado de cada fármaco em todos os ratos foi de 0,5 µl/lado.

Em cada um dos quatro experimentos, as variáveis foram o momento da infusão do fármaco e o(s) fármaco(s) infundido(s), como é mostrado a seguir:

- S100B e a consolidação da memória (Exp.1):

Momento da infusão	
0 min após o treino	
Grupo 1	TFS
Grupo 2	S100B 0,02 µM
Grupo 3	S100B 0,2 µM
Grupo 4	S100B 2,0 µM

- S100B e a evocação da memória (Exp.2):

Momento da infusão	
20 min antes do teste	
Grupo 1	TFS
Grupo 2	S100B 0,2 μ M
Grupo 3	S100B 2,0 μ M

- DRB e a consolidação da memória (Exp.3):

Momento da infusão	
0 min após o treino	
Grupo 1	DMSO 20%
Grupo 2	DRB 0,6 μ M
Grupo 3	DRB 2,5 μ M
Grupo 4	DRB 12,5 μ M

- S100B e a consolidação da memória – Mecanismo da facilitação I (Exps. 4.a e b):

Momento da infusão	
0 min após o treino	
Grupo 1	TFS + DMSO 20%
Grupo 2	TFS + DRB 0,8 ng/ μ l
Grupo 3	S100B 2 μ M ou 4 μ M + DMSO 20%
Grupo 4	S100B 2 μ M ou 4 μ M + DRB 0,8 ng/ μ l

- S100B e a consolidação da memória – Mecanismo da Facilitação II (Exp.5):

	Momento da infusão	
	<i>0 min após o treino</i>	<i>2 h após o treino</i>
Grupo 1	TFS	DMSO 20%
Grupo 2	TFS	DRB 4,0 ng/μl
Grupo 3	S100B 2μM	DMSO 20%
Grupo 4	S100B 2μM	DRB 4,0 ng/μl

3. 6. Análise do Posicionamento das Cânulas

Após o término dos experimentos, todos os animais foram sacrificados por decapitação com guilhotinas e em seguida, infundidos através das cânulas com 0,5 ul de corante Azul Tripán em Solução. Após a dissecação, os encéfalos foram conservados em formol 10% e posteriormente submetidos ao corte manual e observação das fatias em lupa mesoscópica (2-10X de magnificação). O posicionamento das cânulas foi devidamente registrado e somente os animais com o correto posicionamento destas foram considerados na análise estatística, no caso, um total de 297 de um universo de 347.

3. 7. Análise Estatística

Foram utilizados testes estatísticos não-paramétricos, uma vez que a distribuição dos dados não foi Normal em nenhum dos grupos, mesmo naqueles que não atingiram o “teto” de 180s nas latências de teste (teste de Kolmogorov-Smimov).

Para a comparação entre o desempenho no treino e no teste dos animais, utilizou-se o teste de Wilcoxon, enquanto para verificar se houve diferença entre os grupos, tanto no treino, quanto no teste utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis (pois são mais de dois grupos) e, quando necessário, o teste post hoc de Dunn.

4. Resultados

4. 1. S100B e a consolidação da memória

Este experimento tem como objetivo verificar o efeito da proteína S100B sobre a consolidação da memória, quando administrada no hipocampo, em diferentes concentrações, na tarefa de esQUIVA inibitória. Para isso, utilizamos um total de 36 ratos, canulados bilateralmente no hipocampo dorsal, e, destes, 30 animais tiveram as coordenadas das infusões confirmadas como corretas mediante exame mesoscópico (ver Material e Métodos). Quatro grupos selecionados aleatoriamente entre os animais canulados receberam a infusão de S100B nas concentrações 0,02 μM (N=7), 0,2 μM (N=7), e 2,0 μM (N=7), ou de seu veículo (N=9), o tampão fosfato salino (TFS), sempre administrados imediatamente após a sessão de treino.

Os resultados estão mostrados na Figura 4.1.

Como os dados (i) não se distribuíam normalmente (Teste de Kolmogorov-Smirnov, $P < 0,05$) e também (ii) houve latências que atingiram o valor “teto” de 180 s, utilizamos estatística não-paramétrica.

Os treinos dos grupos não diferiram significativamente entre si, permitindo a análise dos dados (Teste de ANOVA de Kruskal-Wallis, $P = 0,957$).

Todos os grupos mostraram diferença significativa entre as latências na sessão de treino e de teste (“a”, no gráfico - teste de Wilcoxon, $P < 0,05$), demonstrando terem aprendido a tarefa.

Houve diferença significativa entre os grupos nas latências das sessões de teste (Teste de ANOVA de Kruskal-Wallis, $P = 0,041$), que, posteriormente ordenadas pelo teste *post-hoc* de Dunn de comparações múltiplas, mostrou que os grupos 0,2 μM e 2 μM eram significativamente diferentes do grupo controle (veículo) com $P < 0,05$ (“b”, no gráfico).

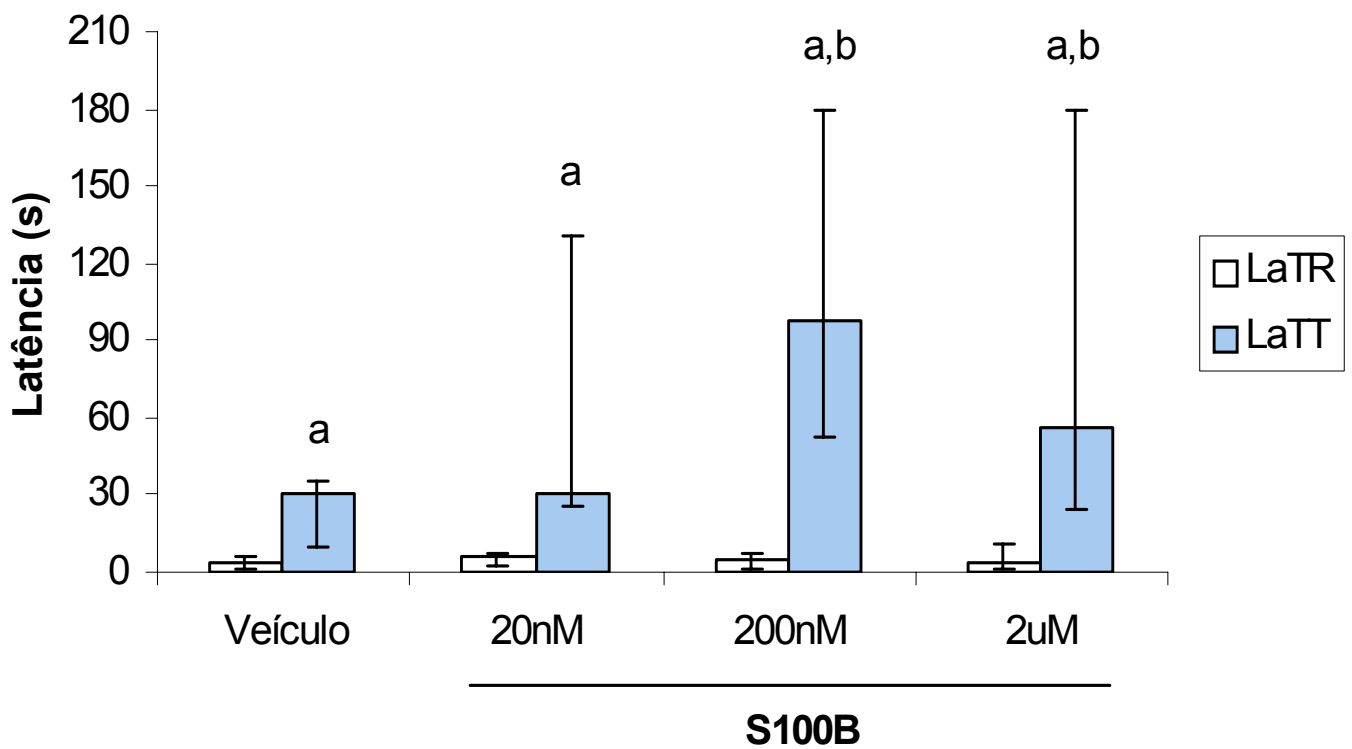


Figura 4.1

Efeito da infusão bilateral de S100B no hipocampo dorsal de ratos imediatamente após o treino na tarefa de Esquiva Inibitória. Dados expressos como mediana (intervalos interquartis) das latências de descida da plataforma. (a) Diferença significativa entre as latências do treino e do teste no grupo (teste de Wilcoxon, $P < 0,05$); (b) Diferença significativa da latência no teste com relação ao grupo controle (teste de Dunn, $P < 0,05$). $N = 9, 7, 7, 7$, respectivamente.

4. 2. S100B e a evocação da memória

Este experimento tem como objetivo verificar o efeito da proteína S100B sobre a evocação da memória, quando administrada no hipocampo, em diferentes concentrações, na tarefa de esQUIVA inibitória. Para isso, utilizamos um total de 39 ratos, canulados bilateralmente no hipocampo dorsal, e, destes, 32 animais tiveram as coordenadas das infusões confirmadas como corretas mediante exame mesoscópico (ver Material e Métodos). Três grupos selecionados aleatoriamente entre os animais canulados receberam a infusão de S100B nas concentrações 0,2 μM (N=11), e 2,0 μM (N=9), ou de seu veículo (N=12), o tampão fosfato salino (TFS), sempre administrados 20 minutos antes da sessão de teste.

Os resultados estão mostrados na Figura 4.2.

Como os dados (i) não se distribuíam normalmente (Teste de Kolmogorov-Smirnov, $P < 0,05$) e também (ii) houve latências que atingiram o valor “teto” de 180s, utilizamos estatística não-paramétrica.

Os treinos dos grupos não diferiram significativamente entre si, permitindo a análise dos dados (Teste de ANOVA de Kruskal-Wallis, $P = 0,971$).

Todos os grupos mostraram diferença significativa entre as latências na sessão de treino e de teste (“a”, no gráfico - teste de Wilcoxon, $P < 0,05$), demonstrando terem aprendido a tarefa.

Não houve diferença significativa entre os grupos nas latências das sessões de teste (Teste de ANOVA de Kruskal-Wallis, $P = 0,563$).

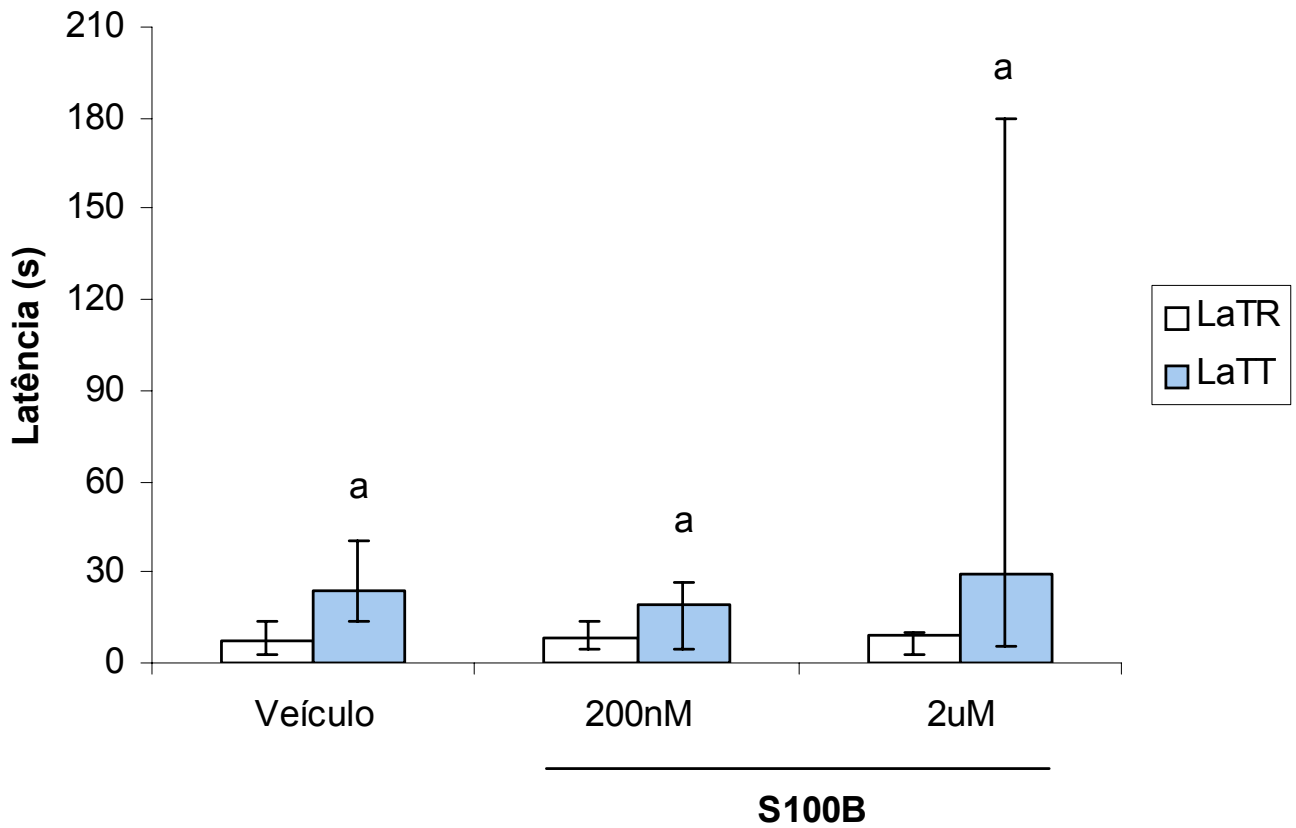


Figura 4.2

Efeito da infusão bilateral de S100B no hipocampo dorsal de ratos 20 min antes do teste na tarefa de Esquiva Inibitória. Dados expressos como mediana (intervalos interquartis) das latências de descida da plataforma. (a) Diferença significativa entre as latências do treino e do teste no grupo (teste de Wilcoxon, $P < 0,05$). Não há diferença significativa entre os grupos nas latências dos treinos ou dos testes (teste de ANOVA de Kruskal-Wallis, $P = 0,971$ e $0,563$, respectivamente). $N = 12, 11$ e 9 , respectivamente.

4.3. DRB e a consolidação da memória

Este experimento tem como objetivo verificar o efeito próprio do DRB, inibidor da síntese de ARN (necessária à síntese proteica), sobre a consolidação da memória quando administrada no hipocampo, em diferentes concentrações, na tarefa de esQUIVA inibitória. Para isso, utilizamos um total de 60 ratos, canulados bilateralmente no hipocampo dorsal, e, destes, 51 animais tiveram as coordenadas das infusões confirmadas como corretas mediante exame mesoscópico (ver Material e Métodos). Quatro grupos selecionados aleatoriamente entre os animais canulados receberam a infusão de DRB nas concentrações 0,6 μM (N=12), 2,5 μM (N=12) e 12,5 μM (N=14), ou de seu veículo (N=13), o tampão fosfato salino (TFS), sempre administrados imediatamente após a sessão de treino.

Os resultados estão mostrados na Figura 4.3.

Como os dados (i) não se distribuíam normalmente (Teste de Kolmogorov-Smirnov, $P < 0,05$) e também (ii) houve latências que atingiram o valor “teto” de 180s, utilizamos estatística não-paramétrica.

Os treinos dos grupos não diferiram significativamente entre si, permitindo a análise dos dados (Teste de ANOVA de Kruskal-Wallis, $P = 0,119$).

Todos os grupos mostraram diferença significativa entre as latências na sessão de treino e de teste (“a”, no gráfico - teste de Wilcoxon, $P < 0,05$), demonstrando terem aprendido a tarefa.

Houve diferença significativa entre os grupos nas latências das sessões de teste (Teste de ANOVA de Kruskal-Wallis, $P = 0,003$), que, posteriormente ordenadas pelo teste *post-hoc* de Dunn de comparações múltiplas, mostrou que o grupo 12,5 μM era significativamente diferente do grupo controle (veículo) com $P < 0,05$ (“b”, no gráfico).

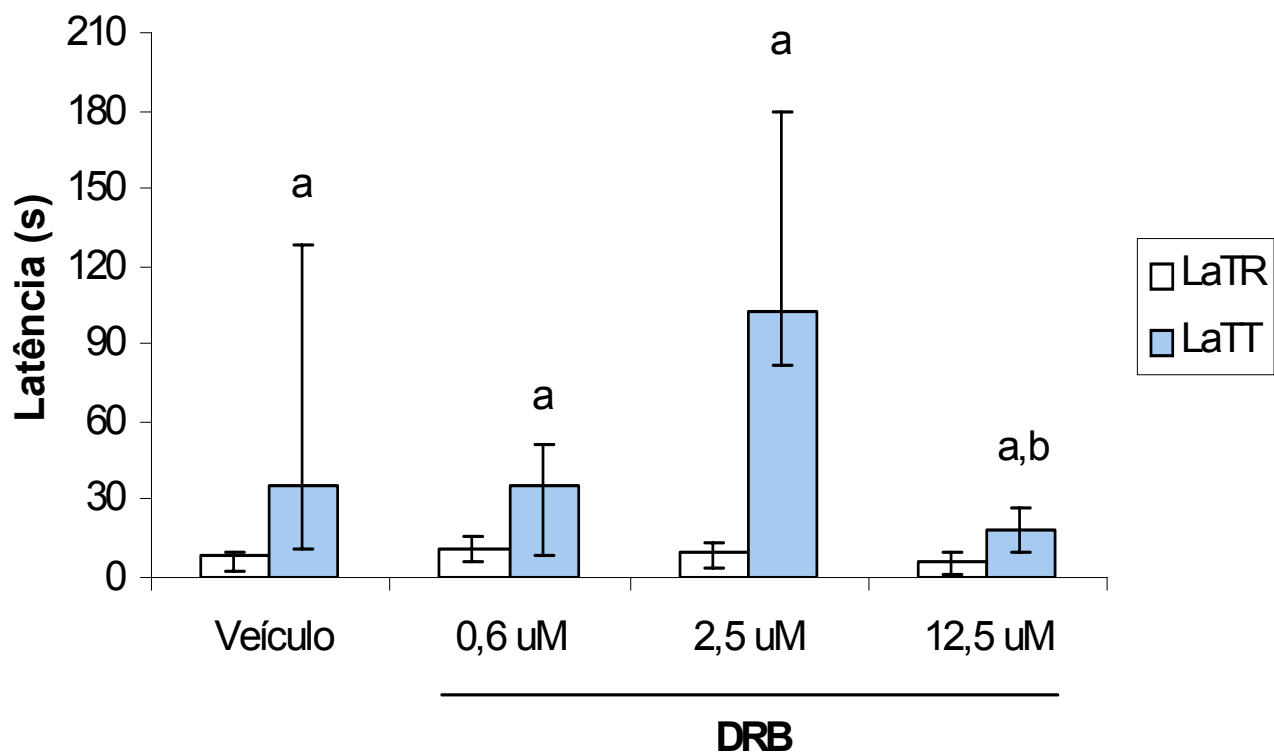


Figura 4.3

Efeito da infusão bilateral de DRB no hipocampo dorsal de ratos imediatamente após o treino na tarefa de Esquiva Inibitória. Dados expressos como mediana (intervalos interquartis) das latências de descida da plataforma. (a) Diferença significativa entre as latências do treino e do teste no grupo (teste de Wilcoxon, $P < 0,05$); (b) Diferença significativa da latência no teste com relação ao grupo controle (teste de Dunn, $P < 0,05$). $N = 13, 12, 12$ e 14 , respectivamente.

4. 4. S100B e a consolidação da memória – Mecanismo de facilitação I

4. 4. 1. Infusão bilateral de S100B (2 μ M) concomitantemente à de DRB (2,5 μ M)

Este experimento tem como objetivo verificar se a infusão concomitante de DRB em concentração sem efeito próprio (2,5 μ M - ver experimento anterior) reverte o efeito facilitatório da proteína S100B (2 μ M) administrada no hipocampo imediatamente após o treino, na tarefa de esquiva inibitória. Para isso, utilizamos um total de 92 ratos, canulados bilateralmente no hipocampo dorsal, e, destes, 85 animais tiveram as coordenadas das infusões confirmadas como corretas mediante exame mesoscópico (ver Material e Métodos). Quatro grupos selecionados aleatoriamente entre os animais canulados foram assim divididos: TFS + DMSO 20% (N=23), TFS + S100B (N=16), S100B + DMSO 20% (N=20) e S100B + S100B (N=23)

Os resultados estão mostrados na Figura 4.4.1.

Como os dados (i) não se distribuíam normalmente (Teste de Kolmogorov-Smirnov, $P < 0,05$) e também (ii) houve latências que atingiram o valor “teto” de 180s, utilizamos estatística não-paramétrica.

Os treinos dos grupos não diferiram significativamente entre si, permitindo a análise dos dados (Teste de ANOVA de Kruskal-Wallis, $P = 0,349$).

Todos os grupos mostraram diferença significativa entre as latências na sessão de treino e de teste (“a”, no gráfico - teste de Wilcoxon, $P < 0,05$), demonstrando terem aprendido a tarefa.

Não houve diferença significativa entre os grupos nas latências das sessões de teste (Teste de ANOVA de Kruskal-Wallis, $P = 0,314$).

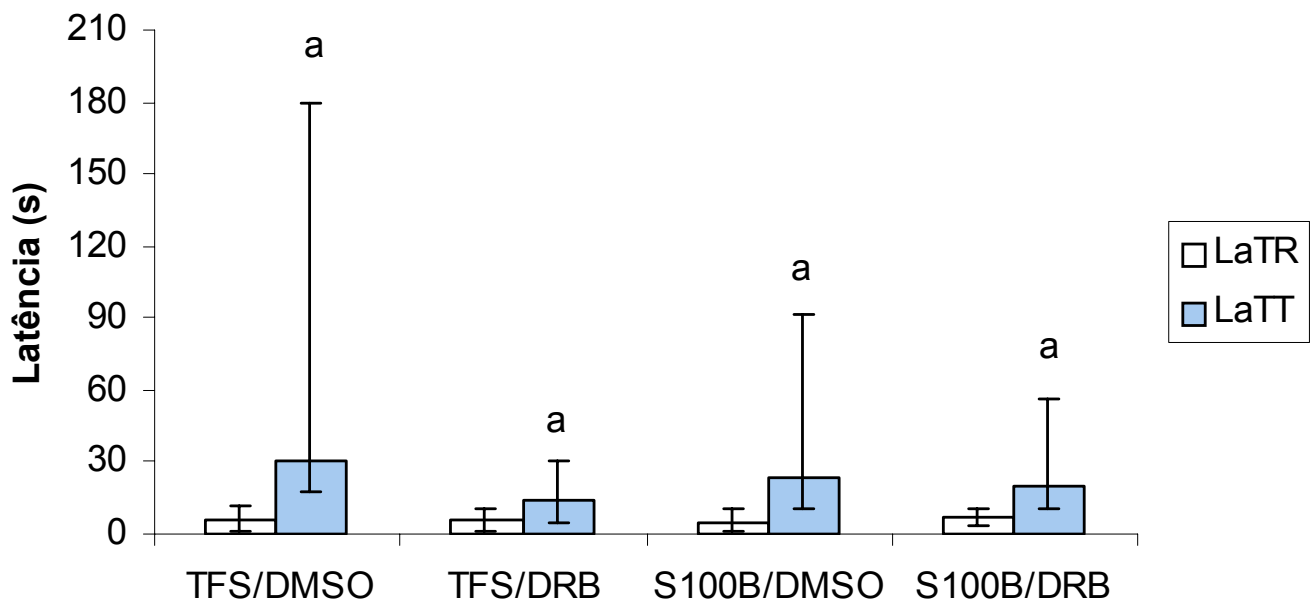


Figura 4.4.1.

Efeito da infusão bilateral concomitante de DRB, em concentração sem efeito próprio (2,5 μ M), e de S100B (2 μ M) no hipocampo dorsal de ratos, ambas imediatamente após o treino na tarefa de Esquiva Inibitória. Dados expressos como mediana (intervalos interquartis) das latências de descida da plataforma. (a) Diferença significativa entre as latências do treino e do teste no grupo (teste de Wilcoxon, $P < 0,05$). Não há diferença significativa entre os grupos nas latências dos treinos ou dos testes (teste de ANOVA de Kruskal-Wallis, $P = 0,349$ e $0,314$, respectivamente). $N = 23, 16, 20, 23$, respectivamente.

4. 4. 2. Infusão bilateral de S100B (4 μ M) concomitantemente à de DRB (2,5 μ M)

Este experimento complementa o anterior e visa testar a hipótese de que a infusão concomitante da proteína junto com igual volume (0,5 μ l) de veículo DMSO 20% pode tê-la diluído excessivamente (ou afetado sua estrutura), o que explicaria por que não conseguimos replicar o efeito facilitatório da S100B no experimento 4.4.1. Deseja-se, portanto, verificar se a infusão concomitante de DRB em concentração sem efeito próprio (2,5 μ M) reverte o efeito facilitatório da proteína S100B (agora em 4 μ M) administrada no hipocampo imediatamente após o treino, na tarefa de esquiva inibitória. Para isso, utilizamos um total de 45 ratos, canulados bilateralmente no hipocampo dorsal, e, destes, 38 animais tiveram as coordenadas das infusões confirmadas como corretas mediante exame mesoscópico (ver Material e Métodos). Quatro grupos selecionados aleatoriamente entre os animais canulados foram assim divididos: TFS + DMSO 20% (N=13), TFS + S100B (N=8), S100B + DMSO 20% (N=9) e S100B + S100B (N=8). Os resultados estão mostrados na Figura 4.4.2.

Como os dados (i) não se distribuíam normalmente (Teste de Kolmogorov-Smirnov, $P < 0,05$) e também (ii) houve latências que atingiram o valor “teto” de 180s, utilizamos estatística não-paramétrica.

Os treinos dos grupos não diferiram significativamente entre si, permitindo a análise dos dados (Teste de ANOVA de Kruskal-Wallis, $P = 0,275$). Todos os grupos mostraram diferença significativa entre as latências na sessão de treino e de teste (“a”, no gráfico - teste de Wilcoxon, $P < 0,05$), demonstrando terem aprendido a tarefa.

Houve diferença significativa entre os grupos nas latências das sessões de teste (Teste de ANOVA de Kruskal-Wallis, $P = 0,021$), que, posteriormente ordenadas pelo teste *post-hoc* de Dunn de comparações múltiplas, mostrou que o grupo S100B/DMSO era significativamente diferente do grupo controle (veículo) com $P < 0,05$ (“b”, no gráfico).

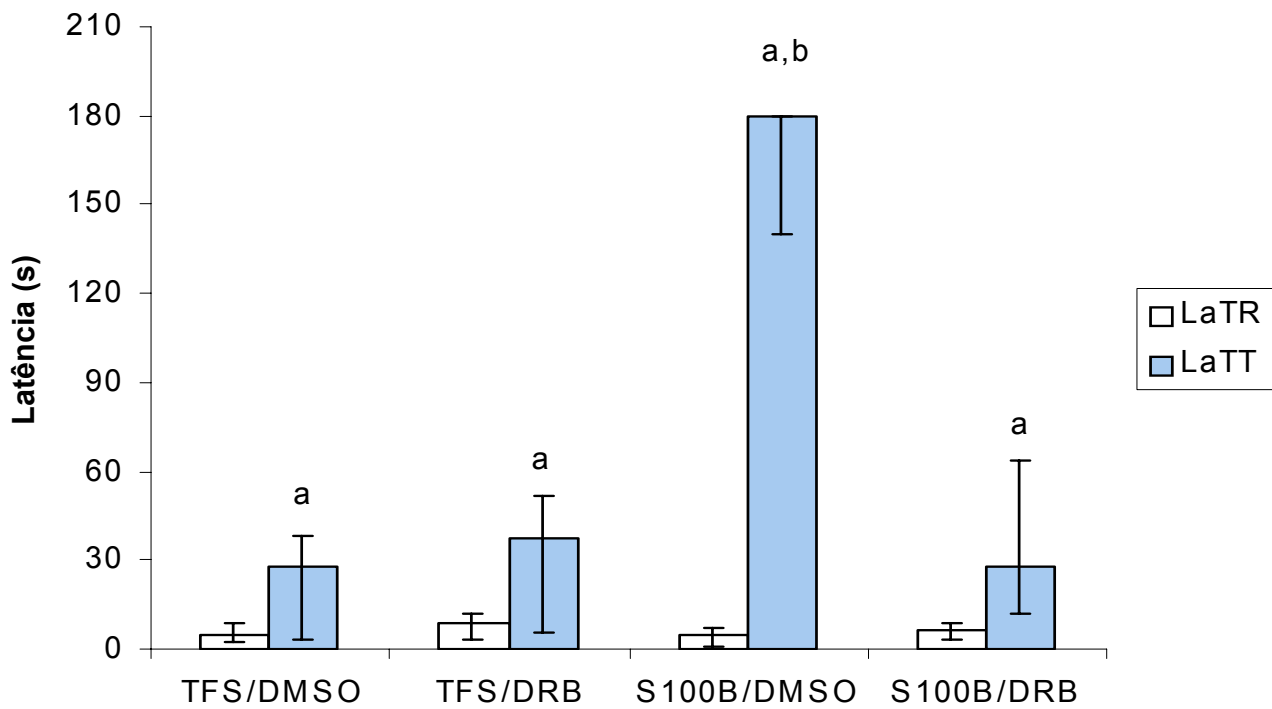


Figura 4.4.2.

Efeito da infusão bilateral concomitante de DRB, em concentração sem efeito próprio (2,5 μ M), e de S100B (4 μ M) no hipocampo dorsal de ratos, ambas imediatamente após o treino na tarefa de Esquiva Inibitória. Dados expressos como mediana (intervalos interquartis) das latências de descida da plataforma. (a) Diferença significativa entre as latências do treino e do teste no grupo (teste de Wilcoxon, $P < 0,05$); (b) Diferença significativa da latência no teste com relação ao grupo controle (teste de Dunn, $P < 0,05$). $N = 13, 8, 9, 8$, respectivamente

4. 5. S100B e a consolidação da memória – Mecanismo de facilitação II

Este experimento tem como objetivo verificar se a infusão intra-hipocampal de DRB em concentração sem efeito próprio (12,5 μ M) 2 h após o treino reverte o efeito facilitatório da proteína S100B (2 μ M) imediatamente após o treino, na tarefa de esquiva inibitória. Para isso, utilizamos um total de 92 ratos, canulados bilateralmente no hipocampo dorsal, e, destes, 85 animais tiveram as coordenadas das infusões confirmadas como corretas mediante exame mesoscópico (ver Material e Métodos). Quatro grupos selecionados aleatoriamente entre os animais canulados foram assim divididos: TFS + DMSO 20% (N=20), TFS + S100B (N=19), S100B + DMSO 20% (N=14) e S100B + S100B (N=11)

Os resultados estão mostrados na Figura 4.5.

Como os dados (a) não se distribuíam normalmente (Teste de Kolmogorov-Smirnov, $P < 0,05$) e também (b) houve latências que atingiram o valor “teto” de 180s, utilizamos estatística não-paramétrica.

Os treinos dos grupos não diferiram significativamente entre si, permitindo a análise dos dados (Teste de ANOVA de Kruskal-Wallis, $P = 0,711$).

Todos os grupos mostraram diferença significativa entre as latências na sessão de treino e de teste (“a”, no gráfico - teste de Wilcoxon, $P < 0,05$), demonstrando terem aprendido a tarefa.

Houve diferença significativa entre os grupos nas latências das sessões de teste (Teste de ANOVA de Kruskal-Wallis, $P = 0,013$), que, posteriormente ordenadas pelo teste *post-hoc* de Dunn de comparações múltiplas, mostrou que o grupo S100B/DMSO era significativamente diferente do grupo controle (veículo) com $P < 0,05$ (“b”, no gráfico).

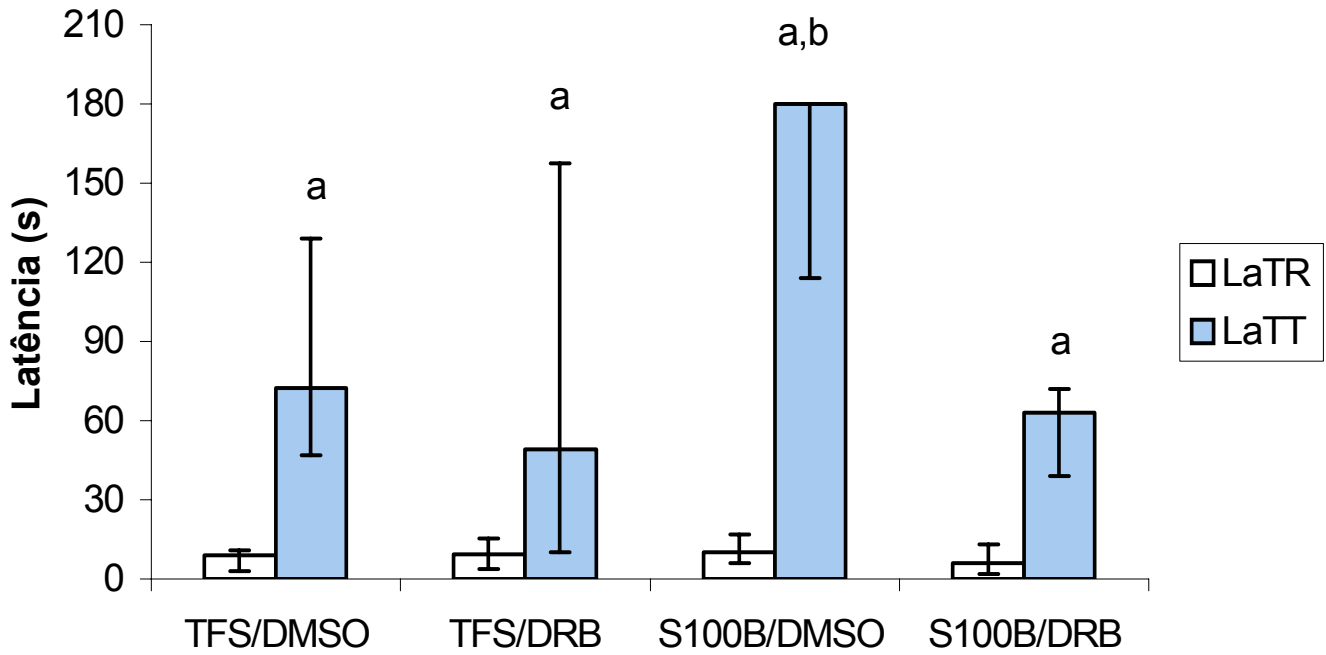


Figura 4.5.

Efeito da infusão bilateral intra-hipocampal de S100B (2 μ M) imediatamente após o treino, e de DRB (12,5 μ M), 2 h após o treino, na tarefa de Esquiva Inibitória. Dados expressos como mediana (intervalos interquartis) das latências de descida da plataforma. (a) Diferença significativa entre as latências do treino e do teste no grupo (teste de Wilcoxon, $P < 0,05$); (b) Diferença significativa da latência no teste com relação ao grupo controle (teste de Dunn, $P < 0,05$). N= 20, 19, 14, 11 respectivamente

5. Discussão

5. 1. S100B e a consolidação da memória

Foi encontrado efeito facilitatório da consolidação da memória em Esquiva Inibitória da proteína S100B quando infundida nas concentrações de 0,2 μ M e 2 μ M.

Este resultado confirma o dado da literatura encontrado por Mello e Souza e colaboradores (2000), confirmando o efeito da proteína na formação da memória aversiva em ratos Wistar.

5. 2. S100B e a evocação da memória

Não foi observado nenhum efeito da proteína S100B sobre a evocação da memória, nas condições já descritas anteriormente.

Entretanto, Mello e Souza e colaboradores (2000) e nós neste trabalho observamos um efeito facilitatório da proteína sobre a consolidação da memória, nas mesmas concentrações, tarefa comportamental e local de infusão utilizados neste experimento. Podemos, portanto, nos perguntar a que se deve esta diferença nos resultados obtidos nos dois diferentes períodos da memória.

Como a S100B é uma proteína amplamente distribuída no SNC e, em especial no hipocampo (Gelai et al., 1995) e as suas funções até então determinadas são muitas, podemos levantar várias hipóteses para resolver tal questão. Uma destas hipóteses é a qual nos baseamos para justificar os outros experimentos deste trabalho: sendo a proteína em questão um importantíssimo fator neurotrófico, esta, quando aumentada, poderia estar envolvida no prolongamento de terminações sinápticas durante a fase de consolidação da memória, facilitando-a desta maneira.

Sabe-se que o aumento e o rearranjo de terminações sinápticas só são necessários durante a fase da consolidação da memória, nunca na da evocação (Izquierdo, 2002). Portanto, segundo nossa hipótese, a resposta facilitatória encontrada nos experimentos durante a fase de consolidação, e dariam devido a este papel neurotrófico da proteína, o que é confirmado pela ausência de efeito na fase de evocação.

Um passo importantíssimo para que ocorra esse aumento e rearranjo de terminações sinápticas durante a fase de consolidação da memória, é a síntese de proteínas estruturais (Izquierdo, 2002). Para verificar a hipótese aqui sugerida, executamos os demais experimentos deste trabalho, interferindo farmacologicamente nesta etapa fundamental para a formação de novas memórias.

5. 3. DRB e a consolidação da memória

O agente inibidor escolhido foi o DRB, um inibidor da caseína cinase II (CKII, $IC_{50} \sim 6 \mu M$) bastante empregado como inibidor da transcrição mediada pela ARN polimerase II, que depende da CKII, entre outros fatores (Zandomeni et al., 1986); ou seja, o DRB inibe a síntese de ARN, e, deste modo, também a síntese protéica, necessária aos eventos de plasticidade sináptica envolvidos na consolidação da memória.

Igaz e colaboradores (2002) estão entre aqueles que empregaram o DRB como inibidor da síntese protéica, contornando, assim, as desvantagens dos efeitos inespecíficos que outros agentes muito usados (como, por exemplo, a anisomicina ou a cicloheximida) geralmente causavam (Gold, 2007; Radulovic & Tronson, 2007; Hernandez & Abel, 2007). Entre outros efeitos interessantes, estes autores demonstraram, usando o DRB, a existência de pelo menos duas janelas temporais críticas para a expressão gênica no hipocampo, uma próxima ao momento do treino e outra ocorrendo entre 3 e 6 h após o treino, uma

atividade bifásica similar àquela observada por outros autores com a anisomicina (Grecksch e Matthies, 1980; Freeman et al., 1995; Bourtchuladze et al., 1998).

A Figura 4.3 mostra uma curva dose-resposta para o DRB infundido no hipocampo dorsal imediatamente após o treino na tarefa de esquiva inibitória, mostrando que o efeito amnésico já se observa na concentração de 12,5 μM (para este tempo): consistente com isso, Igaz e colaboradores (2002) encontraram o mesmo efeito com uma concentração parecida (10 μM , ou 3,2 ng/ μl), mas somente quando infundida imediatamente após o treino, pois quando aplicado 2 h mais tarde, apenas uma concentração mais alta (50 μM , ou 8,0 ng/ μl) é amnésica. Não tivemos tempo de fazer uma curva dose-resposta para o DRB 2 h pós-treino, e, assim, estarmos mais tranquilos com relação a quais concentrações de DRB poderíamos considerar como “sem efeito” a cada tempo.

5. 4. S100B e a consolidação da memória – Mecanismo de facilitação I

Nesta parte do trabalho, o objetivo foi a replicação do resultado do efeito facilitatório da proteína S100B, obtido no trabalho de Mello e Souza e colaboradores (2000) e, obtendo este efeito, observar a reversão ou não deste utilizando-se um inibidor de síntese de ARNm (DRB), que tem como efeito geral inibir a síntese protéica. Se o DRB for infundido imediatamente após o treino em esquiva inibitória, seu efeito terá início logo no início da consolidação da memória, bloqueando a primeira fase da síntese protéica (Igaz, et al., 2002). Além disso, aplicando o DRB juntamente com a S100B, em uma concentração em que ele, por si só não demonstre estatisticamente efeito próprio, podemos observar uma reversão ou não do efeito facilitatório da proteína em questão (de Oliveira et al., 2007).

5. 4. 1. Infusão bilateral de S100B (2 μ M) concomitantemente à de DRB (2,5 μ M)

O efeito facilitatório sobre a consolidação da memória da proteína S100B, nas condições descritas anteriormente, não foi observado neste experimento, tornando-o inconclusivo.

A não replicação do efeito encontrado no trabalho de Mello e Souza e colaboradores (2000) neste estudo pode se dar por inúmeros fatores, mas sugerimos uma hipótese que achamos a mais importante dentre muitas. Por a S100B estar sendo infundida simultaneamente com o veículo do DRB, o DMSO 20%, ela estaria sendo diluída e acabaria tendo uma efetividade no local da infusão diminuída, não replicando a mesma concentração utilizada no trabalho anterior. Devido a isso, utilizando o dobro da concentração aqui utilizada, eliminamos a variável da diluição. Isso foi testado no experimento seguinte.

5. 4. 2. Infusão bilateral de S100B (4 μ M) concomitantemente à de DRB (2,5 μ M)

O efeito facilitatório da proteína S100B sobre a consolidação da memória encontrado anteriormente neste trabalho no estudo de Mello e Souza e colaboradores (2000) foi replicado, nas mesmas condições, e o DRB infundido concomitantemente reverteu seu efeito.

Esta reversão de efeito indica a influência da proteína na transcrição gênica que ocorre imediatamente após o treino dos animais em Esquiva inibitória (Igaz et al., 2002).

O papel da S100B sobre a transcrição gênica está cada vez mais sendo estudado (Donato, 2001, Ikura et al., 2002). A regulação da transcrição gênica está acoplada com muitos processos intracelulares mediados por segundos mensageiros. A S100B, uma proteína ligante de Ca^{++} , está diretamente ligada a

esta sinalização, devido a sua influência sobre este íon, um dos mais importantes segundos mensageiros intracelulares (Ikura, 2002). Tendo, então, a S100B um papel sobre a transcrição gênica e este papel estar envolvido com a regulação da quantidade de Ca^{++} intracelular, o resultado aqui encontrado pode estar relacionado a este fato, hipótese a ser verificada em estudos posteriores.

5. 5. S100B e a consolidação da memória – Mecanismo de facilitação II

Foi observado o efeito facilitatório da proteína S100B sobre a consolidação da memória em esquia inibitória, quando infundida intra-hipocampalmente e, quando em concentração sem efeito próprio, o DRB infundido concomitantemente duas horas após a proteína, reverteu seu efeito.

Tendo o DRB revertido o efeito da S100B, podemos dizer que também um dos mecanismos pelo qual a proteína desempenha seu papel facilitatório sobre a consolidação da memória está envolvido com o aumento na transcrição gênica que ocorre durante o segundo pico de síntese protéica necessária para a formação de uma nova memória.

Como já descrito anteriormente, é sugerido na literatura (Igaz et al., 2002) que a segunda janela de síntese protéica é a fase onde são expressas proteínas estruturais, as quais são fundamentais para a remodelação sináptica requerida para a formação da memória de longa duração. Sendo a proteína S100B um conhecido fator neurotrófico (Nishiyama, 2002), podemos sugerir que ela age neste caso também como um, aumentando o número de terminações sinápticas, tendo como etapa limitante a segunda fase de síntese protéica após o aprendizado da tarefa, o que influencia de maneira positiva a formação da memória.

6. Conclusões

(a) A infusão bilateral intra-hipocampal ***pré-treino*** da S100B não teve **qualquer efeito estatisticamente significativo na tarefa de Esquiva Inibitória**, permitindo-nos concluir que essa proteína, em duas concentrações efetivas pós-treino (ver 6.2), não afeta a evocação dessa memória aversiva;

(b) A infusão bilateral intra-hipocampal ***pós-treino*** da S100B foi ***facilitatória nas concentrações 0,2 μ M e 2 μ M***, mas sem qualquer efeito em 2 μ M, na tarefa de Esquiva Inibitória, replicando achado anterior de nosso laboratório (Mello e Souza et al., 2000);

(c) A infusão bilateral intra-hipocampal ***pós-treino do DRB*** não teve qualquer efeito estatisticamente significativo na tarefa de Esquiva Inibitória nas concentrações de 0,6 e 2,5 μ M, mas **foi *amnésica na concentração de 12,5 μ M***;

(d) A infusão bilateral intra-hipocampal ***pós-treino*** de DRB, em concentração sem efeito próprio (2,5 μ M), concomitantemente à de S100B foi capaz de reverter o efeito facilitatório desta sobre a memória da tarefa de Esquiva Inibitória, **demonstrando que a ação da S100B depende da primeira fase da síntese protéica no hipocampo**; essa reversão só foi conclusiva no experimento 4.4.b em que a concentração da S100B era de 4 μ M, pois com o mesmo desenho experimental, não conseguimos replicar o efeito facilitatório da S100B 2 μ M, provavelmente por um efeito “diluidor” do 0,5 μ l adicional de veículo DMSO 20% que foi infundido concomitantemente;

(e) A infusão bilateral intra-hipocampal ***pós-treino*** de DRB (12,5 μ M) 2 h após o treino e da infusão de S100B (2 μ M), foi também capaz de reverter o efeito facilitatório desta sobre a memória da tarefa de Esquiva Inibitória, **demonstrando que a ação da S100B também depende da segunda fase da síntese proteica no hipocampo**.

7. Bibliografia

- Agranoff, B.W., Davis, R.E., Casola, L., Lim, R. (1967). Anisomycin D blocks formation of memory of shock-avoidance in goldfish. *Science* **158**:1600-1.
- Barger, S.W., Van Eldik, L.J. (1992). S100 beta stimulates calcium fluxes in glial and neuronal cells. *J Biol Chem.* **267**:9689-94.
- Bourtchuladze R, Abel T, Berman N, Gordon R, Lapidus K, Kandel ER (1998) Different training procedures recruit either one or two critical periods for contextual memory consolidation, each of which requires protein synthesis and PKA. *Learn Mem* **5**:365–374.
- Camboim, C. (2003) Efeitos da Administração da proteína cálcio-ligante S100B sobre a evocação da memória e comportamento alimentar. Porto Alegre: UFRGS. Dissertação de Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio grande do Sul.
- deOliveira, L. F., Camboim, C., Dhíel, F., Consiglio, A. R., Quillfeldt, J. A. (2007) Glucocorticoid-mediated effects of systemic oxytocin upon memory retrieval. *Neurobiology of Learning and Memory* **87**: 67–71
- Davis, H.P., Squire, L.R. (1984). Protein synthesis and memory: a review. *Psychol Bull.* **96**:518-59.
- Donato, R. (2001). S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol.* **33**:637-68. Review.
- Flexner, J.B., Flexner L.B., Stellar, E., De la Haba, G., Roberts, R.B. (1962). Inhibition of protein synthesis in brain and learning and memory following puromycin. *J Neurochem.* **9**:595-605.
- Freeman F, Rose SPR, Sholey A (1995) Two time windows of anisomycin-induced amnesia for passive avoidance training in the dayold chick. *Neurobiol Learn Mem* **63**:291–295.
- Gerlai, R., Wojtowicz, J.M., Marks, A., Roder, J. (1995). Overexpression of a calcium-binding protein, S100 beta, in astrocytes alters synaptic plasticity and impairs spatial learning in transgenic mice. *Learn Mem.* **2**:26-39.

- Gold, P. E. (2007). Protein synthesis inhibition and memory: Formation vs amnesia. *Neurobiology of Learning and Memory*. **In press**
- Grecksch G, Matthies M (1980) Two sensitive periods for the amnesic effect of anisomycin. *Pharmacology Biochem Behave* **13**:663–665.
- Griffin, W.S., Stanley, L.C., Ling, C., White, L., MacLeod, V., Perrot, L.J., White, C.L. 3rd, Arnos, C. (1989). Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **86**:7611-5.
- Heizmann, C. W., Cox, J. A. (1998). New perspectives on S100 proteins: a multi-functional Ca(2+)-, Zn(2+)- and Cu(2+)-binding protein family. *Biometals*. **11**:383-97.
- Hernandez, P. J., & Abel, T. (2008). The role of protein synthesis in memory consolidation: Progress amid decades of debate. *Neurobiology of Learning and Memory*. **In press**
- Huttunen, H.J., Kuja-Panula, J., Sorci, G., Agneletti, A.L., Donato, R., Rauvala, H. (2000). Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphoterin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J Biol Chem*. **275**:40096-105.
- Igaz, L.M., Vianna, M.R., Medina, J.H., Izquierdo, I. (2002). Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. *J Neurosci*. **22**:6781-9.
- Ikura, M., Osawa, M., Ames, J. B. (2002) The role of calcium-binding proteins in the control of transcription: structure to function. *Bioessays* **24**: 625-36
- 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. *Neurobiology of Learning and Memory* **68**: 287-316.
- Izquierdo, I., Barros, D.M., Mello e Souza, T., de Souza, M.M., Izquierdo, L.A., Medina, J.H. (1998). Mechanisms for memory types differ. *Nature* **393**:635-6.
- Izquierdo, I. Memória, Porto Alegre/ RS, ArtMed Editora, 2002.

- Izquierdo, I., Bevilaqua, L. R. M., Rossato, J. I., Bonini, J. S., Medina, J. H., Cammarota, M. (2006). Different molecular cascades in different sites of brain control memory consolidation. *Trends in Neuroscience*, **29**: 496-505.
- Mello e Souza, T., Rohden, A., Meinhardt, M., Gonçalves, C.A., Quillfeldt, J.A. (2000). S100B infusion into the rat hippocampus facilitates memory for the inhibitory avoidance task but not for the open-field habituation. *Physiol Behav.* **71**:29-33.
- McGaugh, J.L. (1966) Time-dependent processes in memory storage. *Science* **153**:1351-8.
- McGaugh, J. L. (2000) Memory – A Century of Consolidation. *Science* **287**: 248-51.
- Nishiyama, H., Knopfel, T., Endo, S., Itohara, S. (2002). Glial protein S100B modulates long-term neuronal synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**:4037-42.
- O'Dowd, B.S., Zhao, W.Q., Ng, K.T., Robinson, S.R. (1997). Chicks injected with antisera to either S-100 alpha or S-100 beta protein develop amnesia for a passive avoidance task. *Neurobiol Learn Mem.* **67**:197-206.
- Paukert, M., Bergles, D.E. (2006) Synaptic communication between neurons and NG2+ cells. *Curr Opin Neurobiol.* **16**:515-21.
- Quevedo, J., Vianna M. R., Roesler, R., de Paris, F., Izquierdo, I., Rose, S. P. (1999) Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: protection from amnesia by pretraining but not pre-exposure to the task apparatus. *Learning Memory* **6**:600-7
- Radulovic, J., & Tronson, N. C. (2007). Protein synthesis inhibitors, gene superinduction and memory: Too little or too much protein? *Neurobiol Learn Mem.* **In press**
- Squire, L.R., Barondes, S.H. (1970). Actinomycin-D: effects on memory at different times after training. *Nature.* **225**:649-50.

- Todd, K. J., Serrano, A., Lacaille, J. C., Robitaille, R. (2006) Glial cells in synaptic plasticity. *J Physiol Paris*. **99**(2-3):75-83.
- Vianna, M. R., Izquierdo, L. A., Barros, D. M., Medina, J.H., Izquierdo, I. (1999) Intrahippocampal infusion of an inhibitor of protein kinase A separates short- from long-term memory. *Behav Pharmacol*. **10**(2):223-7.
- Zandomeni R, Zandomeni MC, Shugar D, Weinmann R (1986). Casein kinase type II is involved in the inhibition by 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole of specific RNA polymerase II transcription. *J Biol Chem*. **261**(7):3414-9.