



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**CENTRO DE BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**



**MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA AÇÃO**  
**MODULATÓRIA DO RECEPTOR GRP SOBRE A**  
**CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA NA ÁREA CA1 DO**  
**HIPOCAMPO**

**Sílvia Helena Soares Oliveira**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Roesler

Porto Alegre

2006

“...são as misteriosas borboletas da alma, cujo bater de asas poderá algum dia – quem sabe? – esclarecer os segredos da vida mental”.

Santiago Ramon y Cajal (1879 – 1955)

Dedico este trabalho aos meus  
pais **JOSÉ ANTONIO E**  
**ROSAURA.**

## ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	V
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
RESUMO E ABSTRACT.....	IX
1. Resumo.....	X
2. Abstract.....	XII
I.INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Bases Neurobiológicas da Memória.....	15
1.2 Receptores de Bombesina e Memória.....	19
II.OBJETIVOS.....	24
1 Objetivo geral.....	25
2 Objetivos específicos.....	25
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1 Animais.....	28
3.2 Procedimento Cirúrgico.....	29
3.3 Drogas e procedimentos farmacológicos.....	30
3.4 Avaliação da Memória.....	30
3.5 Histologia.....	32
3.6 Análise estatística.....	32
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4. Facilitação da memória no hipocampo induzida pela Bombesina é dependente de GRPRs, PKC, PKA E MAPK.....	36
5. Conclusão.....	46
V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
VI. ANEXO.....	55

## **AGRADECIMENTOS**

- À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em especial ao Centro de Biotecnologia, por terem aberto as portas para a realização deste trabalho.
- Ao Prof. Dr. Rafael Roesler, pela orientação e paciência.
- Aos colegas do Laboratório, pelos momentos de descontração; valeu a força!
- As amigas Débora Gazzana e Aline Groff, duas pessoas mais que especiais que me agüentaram nos momentos de crise.
- Aos funcionários do Centro de Biotecnologia, em especial à Silvia e ao Luciano, sempre tão alegres e solidários.
- Ao Fabiano, Ana Lúcia, Rodrigo, Julio, Gabriela, Rafael e todos os demais amigos de Bagé, obrigada pela amizade e pelo carinho.
- Aos meus grandes amigos, o médico Marco Antonio Barcellos, o escritor Vides Jr., Gerson Voigt, Lílian Batista e Fausto Lira, pessoas muito especiais, que mesmo estando longe, me apoiaram de forma importantíssima.
- Ao meu irmão Maurício, minhas avós Dora e Justa, minha sobrinha Amanda e minha Tia Luiza.

- Finalmente gostaria de agradecer especialmente aos meus pais, José Antonio e Rosaura, que compartilharam o meu ideal e o alimentaram, me incentivando a prosseguir nesta jornada, fossem quais fossem os obstáculos. A vocês que sempre estiveram do meu lado, meu mais profundo amor e respeito!

**LISTA DE ABREVIATURAS**

---

AMPA:  $\alpha$ -amino-5-hydroxy-3-methyl-4-isoxazole propionic acid  
BB: bombesin  
DMSO: dimethylsulfoxide  
EI: esquivia inibitória  
ERK: extracellular signal-regulated protein kinase  
CREB: cAMP response element binding protein  
GRP: gastrin-releasing peptide  
GRPR: gastrin-releasing peptide receptor  
JNK: c-Jun N-terminal cinase  
LTM: long-term-memory  
MAPK: mitogen-activated protein kinase  
NMB: neuromedin B  
NMBR: neuromedin B receptor  
NMDA: N-metil-D-aspartato  
PKA: protein kinase A  
PKC: protein kinase C  
PLC: phospholipase C  
RC-3095: [D-Tpi6, Leu13 psi(CH<sub>2</sub>NH)-Leu14] bombesin (6-14)  
SAL: saline  
SNC: sistema nervoso central  
STM: short-term-memory

**RESUMO E ABSTRACT**

---

**Resumo:**

O peptídeo liberador da gastrina (*gastrin-releasing peptide, GRP*), pertencente à família dos peptídeos semelhantes à bombesina, e seus receptores estão presentes em todo o sistema nervoso central, em particular em áreas límbicas cerebrais como o hipocampo e a amígdala, as quais estão envolvidas de forma importante na regulação emocional, na função cognitiva e em transtornos neuropsiquiátricos e neurodegenerativos. Há estudos sugerindo que receptores GRP podem ter um papel na regulação da plasticidade sináptica, de respostas emocionais e da formação da memória. Apesar disso, esse sistema tem sido relativamente pouco estudado quanto a seu papel na função cerebral e não são conhecidos os mecanismos celulares envolvidos na transdução de sinal ativada por receptores GRP no sistema nervoso. Estudos em outros tipos de células sugerem que a ativação de receptores GRP pode levar a uma ativação das vias de transdução de sinal mediadas por proteína cinase C (protein kinase C, PKC) e pela proteína cinase ativada por mitógeno (mitogen-activated protein kinase, MAPK).

O envolvimento da via da adenilato ciclase/AMPC/proteína cinase A (protein kinase A, PKA) é controverso. Por outro lado, já está estabelecido que as vias de sinalização da PKC, MAPK e PKA estão envolvidas de forma crucial na formação da memória emocional na área CA1 do hipocampo dorsal. Assim, é possível que a ativação de

receptores GRP module a memória através da ativação de uma ou mais dessas vias.

No presente trabalho, propomos uma abordagem farmacológica de investigação, utilizamos para isso, um modelo bem estabelecido de memória emocional em roedores, para analisar as interações entre receptores GRP e os eventos biológicos que se seguem à ativação do receptor, ou seja, a ativação de cascatas de sinalização neuronal mediadas por proteínas cinases, na região CA1 do hipocampo dorsal. Ratos Wistar machos foram tratados com uma infusão bilateral de agonista do GRPR, bombesina, no hipocampo dorsal imediatamente após o treino em esquiva inibitória. Doses intermediárias de bombesina induziram uma facilitação, enquanto doses mais altas prejudicaram a retenção da memória medida 24 horas após o treino. A facilitação da memória induzida pela bombesina foi prevenida por infusões pré-treino de um antagonista GRP ou de inibidores de PKC, MAPK ou PKA, mas não por um antagonista do receptor de neuromedina B (NMB). Os resultados indicam que a modulação da consolidação da memória por GRPRs hipocampais depende das vias da PKC, MAPK e PKA.

**Abstract:**

Gastrin-releasing peptide (GRP), a bombesin-like peptide, and their receptors are gifts in all the central nervous system, particular in cerebral limbic areas as hippocampus and amigdala, which are involved in an important way in the emotional regulation, cognitive function and neurodegenerative and neuropsychiatric disorders. Studies suggest that GRPR can act in synaptic plasticity regulation, emotional answers and memory formation. Although this, this system has been relatively little studied how much its paper in the cerebral function and the involved cellular mechanisms in the transdução of signal are not known activated for receivers GRP in the nervous system. Studies in other cell types suggest that activation of GRPR can active signal transduction pathways mediated by protein cinase C (protein kinase C, PKC) and mitogen-activated protein kinase (MAPK). The envolvimento of protein kinase A (PKA) pathways are controversial. Already it is established that PKC, MAPK and PKA signal pathways are involved of crucial form in emotional memory formation in CA1 area of dorsal hippocampus. Thus, it is possible that the activation of GRPR modulates the memory through the activation of one or more than these ways. In present study, we propose an pharmacological investigation, using an established emotional memory model in rodents, to analyze the interactions between GRPRs and the biological events following to the receptores activation in other words, the neuronal sign cascades activation mediated by proteins kinases, in CA1

hippocampus area. Male Wistar rats received bilateral infusions of the GRPR agonist bombesin into the dorsal hippocampus immediately after inhibitory avoidance training. Intermediate doses of bombesin enhanced, whereas a higher doses impaired 24-h memory retention. The bombesin-induced memory enhancement was prevented by pretraining infusions of a GRPR antagonist or inhibitors of PKC, MAPK and PKA, but not a neuromedin B (NMB) antagonist. We conclude that memory modulation by hippocampal GRPRs is mediated by the PKC, MAPK and PKA pathways.

## **I. INTRODUÇÃO**

---

## 1.1 Bases neurobiológicas da memória

Memória é a aquisição, formação conservação e evocação de informações (Izquierdo, 2004), e proporciona aos seres vivos diversas aptidões, desde um simples reflexo condicionado até a lembrança de episódios pessoais, e o uso de regras para a antecipação de um evento, sendo um processo onde uma simples experiência de aprendizagem pode dar início a um processo de diferentes durações e específicas propostas biológicas (Quevedo *et al.*, 2004). A retenção das memórias é avaliada através de sua expressão, a expressão do traço mnemônico é iniciada freqüentemente pelo estímulo condicionado (Cammarota *et al.*, 2004)

Para o processo de consolidação de memória é necessária síntese de proteínas. Em geral um neurônio recebe informação através da membrana soma-dendrítica e a transmite por meio de sinais ao longo do axônio. O acoplamento dos neurônios entre si e de neurônios com outras células alvo faz-se por meio de um sistema de transformação da atividade elétrica em um fenômeno químico e vice-versa. Estes acoplamentos são chamados sinapses. A transmissão nestas sinapses é essencialmente um fenômeno químico, o que as distingue de outras formas de comunicação inter-neuronal, muito mais raras, em que a transmissão é diretamente elétrica. No aparelho sináptico dessas sinapses químicas podemos distinguir três componentes principais: 1) o botão pré-sináptico em que se encontram as vesículas sinápticas que contem as moléculas dos neurotransmissores químicos e, em geral, o sistema enzimático responsável pelas suas sínteses e em alguns casos

pela sua reabsorção; 2) a fenda sináptica em que se dá a difusão das moléculas dos neurotransmissores e 3) a membrana pós-sináptica que contem as moléculas dos receptores com os quais os neurotransmissores se ligam e os canais iônicos, cuja condutividade pode ser alterada por este processo de acoplamento.

Em uma sinapse química, a informação é transmitida da porção pré-sináptica à célula pós-sináptica pelo neurotransmissor sintetizado no interior do axônio e armazenado nas vesículas pré-sinápticas. O estímulo nervoso conduzido pelo axônio provoca excitação dessas vesículas na fenda sináptica, o neurotransmissor se liga aos receptores situados no neurônio pós-sináptico promovendo a despolarização ou hiperpolarização da membrana celular.

No processo de formação de memórias, uma cascata de reações é desencadeada, iniciando, pela liberação na fenda sináptica, de glutamato. Existem três famílias de receptores glutamatérgicos duas de receptores ionotrópicos, que estão diretamente acoplados e um canal da membrana que passa íons de carga positiva e uma de receptores metabotrópicos que atuam através de uma proteína G.

Os receptores ionotrópicos medeiam a transmissão glutamatérgica rápida (em milissegundos) no sistema nervoso central e estão associados com um canal que passa íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^+$ . Os receptores ionotrópicos NMDA tem o ácido N-metil-D-aspartato como agonista. Estes receptores estão ligados aos canais de  $\text{Ca}^+$  e  $\text{Na}^+$  que podem ser ativados rapidamente (10ms), mas estão submetidos a um bloqueio pelos íons  $\text{Mg}^{2+}$ , o qual depende da voltagem da membrana.

Assim, os canais estão fechados quando a membrana esta hiperpolarizada e podem ser abertos quando a membrana é despolarizada e o receptor é ativado pelo ligante natural, o glutamato.

Os receptores metabotrópicos são essencialmente moduladores da transmissão sináptica de forma relativamente prolongada (100ms), estão associados a proteínas G, agindo através de sinalização intracelular. Alguns dos seus mecanismos efetores consistem em um aumento da atividade de fosfolipases, da atividade dos receptores AMPA e NMDA e dos canais de  $K^+$  e para o  $Cl^-$ . Estes receptores podem também situar-se pré-sinápticamente e deste modo podem modular a liberação de glutamato e do amino-ácido inibidor GABA dos botões sinápticos.

De acordo com a função e o conteúdo, as memórias podem ser classificadas em declarativas, que registram fatos ou eventos, ou proceduais, que registram capacidades ou habilidades.

As memórias declarativas ainda podem ser episódicas, referentes a eventos aos quais assistimos ou dos quais participamos, ou semânticas, as de conhecimentos gerais.

Ambos os tipos de memórias podem ser divididas em explícitas (são conscientemente adquiridas e evocadas) e implícitas (são adquiridas gradativamente e uma vez estabelecidas, são evocadas de maneira inconsciente) (Izquierdo, 2002). Outro tipo de memória que deve ser mencionado é a memória de trabalho, muitas vezes erroneamente confundida com a memória de curta duração. Trata-se de uma memória que dura o suficiente para que possamos processar

uma informação do momento, dura de poucos segundos até no máximo 1-3 minutos, não produzindo arquivos, e é processada fundamentalmente pelo córtex pré-frontal (Izquierdo, 2002)

De acordo com o tempo, durante o qual são armazenadas, as memórias podem ser memórias de curta duração (“*short-term-memory* – STM”) e de longa duração (“*long-term memory* – LTM”). As STM são aquelas retidas dentro de alguns segundos até algumas horas após o prendizado e as LTM são aquelas cuja consolidação é demorada e persistem por dias, anos, ou mesmo uma vida inteira (Izquierdo *et al.*, 1999; Bianchin *et al.*, 1999)

As memórias declarativas de longa duração, nas primeiras horas que são adquiridas, são lábeis e suscetíveis à interferência por numerosos fatores (McGough, 2000). Estudos utilizando tratamentos farmacológicos específicos capazes de cancelar a formação da STM sem afetar a LTM para a tarefa de esquiva inibitória demonstraram que memórias de curta e longa duração são processadas em paralelo, compartilhando estruturas cerebrais e mecanismos celulares, porém de maneira independente (Izquierdo *et al.*, 1998 a, b, 1999).

## 1.2 Receptores de bombesina e memória

A bombesina (BB) ocorre naturalmente na forma de um tetradecapeptídeo originalmente isolado da pele de anfíbio. O primeiro peptídeo semelhante à bombesina em mamíferos foi o peptídeo liberador de gastrina (*gastrin releasing peptide*, GRP) isolado a partir de tecido gastrointestinal expressado tanto nos tecidos cerebrais como em outros tecidos. Existe também um modelo de decapeptídeo, a neuromedina B (NMB), isolado a partir do hipotálamo, sendo expressado em tecidos cerebral e gastrointestinal (Krane *et al.*, 1988), porém, o GRP é mais amplamente expresso em relação a NMB em cérebro de rato (H. Ohki-Hamazaki *et al.*, 2005).

O peptídeo liberador da gastrina (GPR) pertencente à família dos peptídeos semelhantes à bombesina, regula várias funções neuroendócrinas em mamíferos. O GRP e seus receptores estão amplamente distribuídos no cérebro de mamíferos – em particular em áreas límbicas cerebrais como hipocampo e amígdala – e estão envolvidos em diversas funções cerebrais como regulação do apetite, saciedade, aversão, ansiedade, bem como processos de aprendizado e memória (Flood and Morley, 1988; McCoy and Avery, 1990; Morley *et al.*, 1992; Williams and Mc Gaugh, 1994; Wada *et al.*, 1998; Santo-Yamada *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 2002). Segundo Shumyatsky *et al.* (2002), o GRP é liberado juntamente com o glutamato pelos neurônios glutamatérgicos e age ligando-se aos receptores GRP nos sítios pós-sinápticos.

O hipocampo e a amígdala estão envolvidos de forma importante na regulação emocional, na função cognitiva e em transtornos neuropsiquiátricos e neurodegenerativos (Moody e Merali 2004). Há estudos sugerindo o envolvimento de GRP ou seus receptores na patofisiologia de transtornos neuropsiquiátricos e neurodegenerativos como ansiedade (Moody e Merali, 2004), esquizofrenia (Olinicy *et al.*, 1999), autismo (Ishikawa-Brush *et al.*, 1997), doença de Alzheimer (Ito *et al.*, 1994) e doença de Parkinson (Bissette *et al.*, 1985). Apesar disso, esse sistema tem sido relativamente pouco estudado quanto a seu papel na função cerebral, e não são conhecidos os mecanismos celulares envolvidos na transdução de sinal ativada por receptores GRP no sistema nervoso.

Utilizando como ferramenta farmacológica um antagonista específico de receptores GRP, desenvolvido como droga experimental antitumoral, o (D-Tpi6, Leu13 psi[CH<sub>2</sub>NH]-Leu14) bombesin (6-14) (RC-3095), nosso grupo demonstrou recentemente que a ativação desses receptores é necessária para a formação da memória emocional (Roesler *et al.*, 2003a; 2004b; 2004c) e que o hipocampo dorsal e a amígdala basolateral são duas áreas cerebrais envolvidas de forma crítica na mediação da ação de receptores GRP na memória (Roesler *et al.*, 2003a; 2004c). Além disso, o RC-3095 inibiu a indução de estereotipia por apomorfina em camundongos, um modelo animal de psicose, sugerindo de forma preliminar a possibilidade de que antagonistas de receptores GRP possuam atividade antipsicótica (Meller *et al.*, 2004). Esses dados nos levaram a propor que:

- 1) o receptor GRP em áreas límbicas cerebrais constitui um sistema neuromodulatório importante de regulação do processamento da memória e da emoção;
- 2) o receptor GRP deve ser considerado um novo alvo terapêutico na investigação de novos tratamentos para transtornos psiquiátricos (Meller *et al.*, 2004; Roesler *et al.*, 2004a; 2004c).

Os mecanismos de sinalização celular que medeiam os efeitos da ativação de receptores GRP nos neurônios não são conhecidos. Estudos em outros tipos de células sugerem que a ativação de receptores GRP pode levar a uma ativação das vias de transdução de sinal mediadas por proteína cinase C (*protein kinase C*, PKC) e pela proteína cinase ativada por mitógeno (*mitogen-activated protein kinase*, MAPK). As proteínas cinases regulam a transdução do sinal nas células e vale lembrar que a não regulação destas enzimas tem sido identificadas em muitas doenças em humanos (Hunter, 2000). A PKC é uma família de serina-threonina cinase e regula um amplo espectro de funções celulares e estão implicadas em diversas doenças (Olive e Messing, 2004, Parker e Murray- Rust, 2004). Os componentes da cascata MAPK são abundantemente expressos em neurônios pós-mitóticos e a MAPK está localizada nos dendritos bem como no corpo celular neuronal, mas não nos terminais sinápticos. Vale lembrar que estudos confirmam que a ativação da MAPK tem um importante papel na LTP na área CA1 do hipocampo (Walz *et al.*, 1999)

O envolvimento da via da adenilato ciclase/AMPC/proteína cinase A (*protein kinase A*, PKA) é controverso (Hellmich *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2000). Por outro lado, já está estabelecido que as vias de sinalização da PKC, MAPK e PKA estão envolvidas de forma crucial na formação da memória emocional em ratos (Izquierdo *et al.*, 2000; McGaugh, 2000; McGaugh e Izquierdo, 2000; Walz *et al.*, 2000; Quevedo *et al.*, 2004). Assim, é possível que a ativação de receptores GRP module a memória através da ativação de uma ou mais dessas vias. Também não está esclarecido de que forma o sistema de receptores GRP está relacionado a outros sistemas de neurotransmissores e receptores (por exemplo, os sistemas glutamatérgico, GABAérgico e dopaminérgico) que sabidamente estão envolvidos na consolidação da memória (Izquierdo *et al.*, 2000; McGaugh, 2000; McGaugh e Izquierdo, 2000; Roesler *et al.*, 2003b). Alguns dados sugerem a existência de interações funcionais importantes entre o sistema GRP e sinapses glutamatérgicas, GABAérgicas e dopaminérgicas (Shumyatsky *et al.*, 2002; Meller *et al.*, 2004).

No presente trabalho, propomos uma abordagem farmacológica de investigação, utilizando um modelo bem estabelecido de memória emocional em roedores para analisar as interações entre os receptores GRP e os eventos biológicos que se seguem à ativação do receptor, ou seja, a ativação das cascatas de sinalização neuronal mediadas por proteínas cinases. Entendemos que essas informações são

fundamentais para aprofundar o entendimento do papel do receptor GRP na função cerebral e seu potencial como alvo terapêutico.

## **II. OBJETIVOS**

---

**Objetivo Geral:**

Avaliar os mecanismos de sinalização celular que medeiam a ação da BB na consolidação da memória.

**Objetivos Específicos:**

1. Avaliar os efeitos de micro-infusões intracerebrais de um agonista de receptores GRP (bombesina) no hipocampo dorsal sobre a consolidação da memória aversiva em ratos.
2. Avaliar se os efeitos de micro-infusões intracerebrais de bombesina sobre a consolidação da memória são prevenidos pela administração de um antagonista seletivo de receptores GRP, o RC-3095.
3. Avaliar se os efeitos de micro-infusões intracerebrais de bombesina sobre a consolidação da memória são prevenidos pela administração de um antagonista seletivo de receptores NMB, o BIM-23127.
4. Avaliar se os efeitos de micro-infusões intracerebrais de bombesina sobre a consolidação da memória são prevenidos pela administração de um inibidor da proteína cinase C (PKC), o Go7874;
5. Avaliar se os efeitos de micro-infusões intracerebrais de bombesina sobre a consolidação da memória são prevenidas pela co-

administração de um inibidor da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK), o PD098059;

- 6.** Avaliar se os efeitos de micro-infusões intracerebrais de bombesina sobre a consolidação da memória são prevenidas pela co-administração de um inibidor de proteína cinase A (PKA), o Rp-cAMP.

### **III. MATERIAIS E MÉTODOS**

---

### **3.1. Animais:**

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos (220-315g) provenientes da Fundação Estadual de Pesquisa em Saúde (FEPPS/LACEN, RS).

Os animais foram divididos em grupos de cinco por caixa, mantidos em uma sala com temperatura controlada, ciclo claro-escuro de 12 horas (com luzes sendo acesas 7:00 AM), com água e comida disponíveis *ad libitum*.

Todos os procedimentos envolvendo animais foram realizados de acordo com o *NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NIH publicação N° 80-23, revisado 1996) e as recomendações de cuidado animal na Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNeC).

### **3.2. Procedimentos Cirúrgicos**

Para o procedimento cirúrgico, primeiramente os animais foram anestesiados com tionembutal (30mg/kg, i.p.) e implantados bilateralmente com cânulas de 9.0mm, 23 que permitem a microinfusão de drogas na área cerebral de interesse (hipocampo dorsal), através de uma cânula guia como descrito anteriormente de forma detalhada em vários estudos de nosso grupo (Walz et al., 2000; Quevedo et al., 2004; Roesler et al., 2003a; 2003b; 2004c) usando as coordenadas (anteroposterior, -4.3mm from bregma, mediolateral, +3.0mm from

bregma, ventral, - 1.4 mm from dura) obtidos do Atlas Paxinos and Watson (1997).

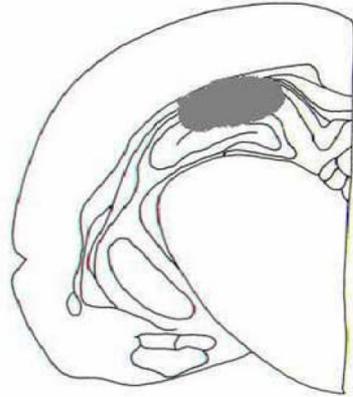


Figura 1 – Área de infusão considerada correta para o procedimento.

(Modificado de Paxinos and Watson, 1997).

### 3.3. Drogas e procedimentos farmacológicos

As drogas foram dissolvidas em veículo adequado e administradas antes e após o treinamento de esquiva inibitória, através das cânulas implantadas cirurgicamente sendo que cada cânula recebeu 0,5  $\mu$ l de infusão. No primeiro experimento, os animais receberam infusão de solução salina (NaCl 0,9%) ou bombesina (0,002; 0,01; 0,05 ou 0,25 mg) imediatamente após o treino em esquiva inibitória. No segundo experimento, os animais receberam a primeira infusão 10 minutos pré-treino e a segunda infusão imediatamente após o treino de esquiva inibitória. Os animais dos grupos controle receberam infusões de veículo (DMSO 2%). Os animais receberam a infusão pré-treino, que variou de acordo com seu grupo em: veículo

(DMSO 2%), antagonista de receptores GRP (RC-3095 0,2µg), antagonista de receptores NMB (BIM23127 0,1µg) inibidor de PKC (Go 7874 0,5pg), inibidor de MAPK (PD 098059 5,0ng) ou inibir de PKA (RpcAMPS, 0,02µg). Imediatamente após o treinamento, os animais receberam uma nova infusão, do agonista de receptores GRP, bombesina (0,01µg), ou salina (0,01µg). As doses utilizadas foram baseadas em estudos anteriores (Izquierdo *et al.*, 2000; Walz *et al.*, 2000; Quevedo *et al.*, 2004; Roesler *et al.*, 2003a; 2003b; 2004c) e experimentos piloto.

### **3.4. Avaliação da memória**

Os animais foram submetidos, entre 3 -7 dias após os procedimentos cirurgicos, ao treino e após 24h, ao teste de retenção na tarefa de esquivia inibitória, um modelo animal de memória motivada emocionalmente de caráter aversivo (Izquierdo *et al.*, 2000; McGaugh, 2000; McGaugh e Izquierdo, 2000), conforme descrito em vários estudos anteriores (Walz *et al.*, 2000; Quevedo *et al.*, 2004; Roesler *et al.*, 2003a; 2003b; 2004a; 2004c). Esse teste envolve a formação de uma memória declarativa, no qual o animal aprende a inibir uma resposta (Izquierdo, 2004) O aparato de treino em esquivia inibitória consiste de uma caixa de acrílico de 50 x 25 x 25-cm (Albarsch, Porto Alegre) com uma grade de barras de aço paralelas de 1 mm de diâmetro. Uma plataforma de 7 cm de largura e 2,5 cm de altura é colocada junto à parede esquerda da caixa.

Na sessão de treino, os animais foram colocados na plataforma e sua latência de descida para o assoalho com a quatro patas foi medida com um dispositivo automático, imediatamente após descer a plataforma, cada animal recebeu um choque de 0.4-mA nas patas. Em sessões de teste, realizadas 24 h após o treino, os animais foram recolocados na plataforma e suas latências de descida foram registradas e usadas como uma medida de retenção (memória) da tarefa (Walz *et al.*, 2000; Quevedo *et al.*, 2004; Roesler *et al.*, 2003a; 2003b; 2004c).

A esquiva inibitória é um tipo de condicionamento aversivo e que depende do contexto (Roesler *et al.*, 1998; 1999 Izquierdo *et al.* 1998; 1999). Nessa tarefa, o animal aprende a relacionar a descida de uma plataforma com um leve choque nas patas (Izquierdo, 1989; Roesler *et al.*, 1998; 2000). Com isso, em uma segunda exposição à caixa de esquiva inibitória ele evita um comportamento inato de descer da plataforma para explorar a caixa. O aprendizado de esquiva inibitória envolve vários estímulos, incluindo percepção espacial e visual, sensibilidade à dor (Izquierdo, 1989; Izquierdo e Medina, 1997; Walz *et al.*, 2000).

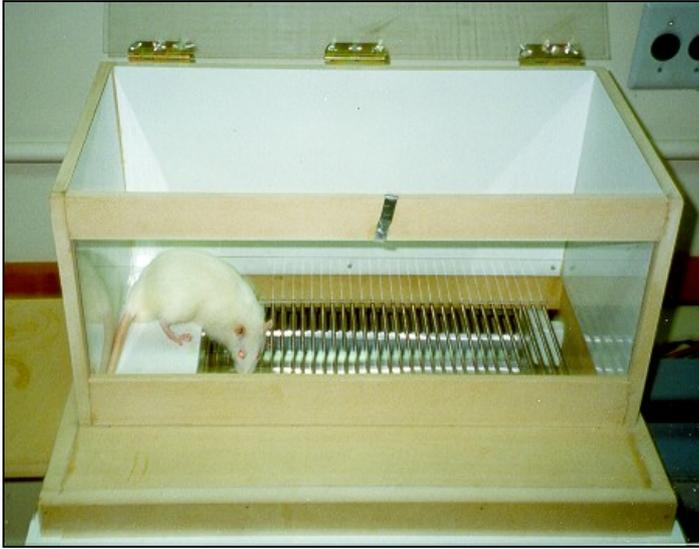


Figura 2 – Aparelho de treino e teste em esquiva inibitória.

### 3.5. Histologia

Os ratos foram sacrificados após a conclusão dos experimentos comportamentais, os cérebros foram retirados, armazenados em uma solução de formalina por pelo menos 72 h e após este período foram seccionados e submetidos à verificação da correta posição das cânulas, como descrito em vários estudos anteriores (Walz *et al.*, 2000; Quevedo *et al.*, 2004; Roesler *et al.*, 2003a; 2003b; 2004c). Quando na verificação, foi observada a posição incorreta, o animal foi descartado.

### 3.5. Análise estatística

Os resultados estão expressos como media (intervalos interquartis). As comparações entre o treino e o teste de retenção entre os grupos foi foram feitas a partir da análise de variância de Kruskal-Wallis seguidas por teste de Mann-Whitney U (Bevilaqua *et al.*,

1997; Walz *et al.*, 2000; Quevedo *et al.*, 1999; Roesler *et al.*, 2003; Quevedo *et al.*, 2004; Venturella *et al.*, 2005). Comparações dentro do mesmo grupo foram feitas com testes de Wilcoxon. Em todas as comparações, valores de  $P$  menores que 0,05 indicaram diferenças significativas.

#### **IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

#### 4. Resultados e Discussão

No primeiro experimento 36 ratos foram utilizados para a identificação da dosagem mais adequada de BB para os experimentos posteriores através da infusão intrahipocampal da mesma. Para este teste, as doses de BB utilizadas foram de 0.002, 0.01, 0.05 e 0.25 $\mu$ g, foram obtidos os seguintes resultados:

A dose mais baixa utilizada foi 0.002 $\mu$ g de BB, com esta dose, não obtivemos diferença significativa, quando comparamos ao grupo controle. Quando utilizada 0.01 $\mu$ g de BB, obtivemos a maior significância na retenção da memória nos animais, sendo um pouco maior que a dose de 0.05 $\mu$ g, que também demonstrou resultados significativos. A dose mais alta testada foi 0.25 $\mu$ g de BB, que demonstrou um prejuízo significativo na retenção da memória. Os resultados deste experimento demonstraram que a BB quando em dose 0.01 e 0.05  $\mu$ g induziu a um aumento significativo na retenção da memória, resultando, ambos, em  $p < 0.05$  quando comparados ao grupo controle, por outro lado, quando utilizamos a dose 0.25  $\mu$ g, a BB prejudica a retenção da memória (  $p < 0.01$  quando comparados ao grupo controle) (Fig. 2). Esses resultados indicam que a BB em altas doses induz efeito oposto na consolidação da memória na área CA1 do hipocampo em testes com esQUIVA Inibitória.

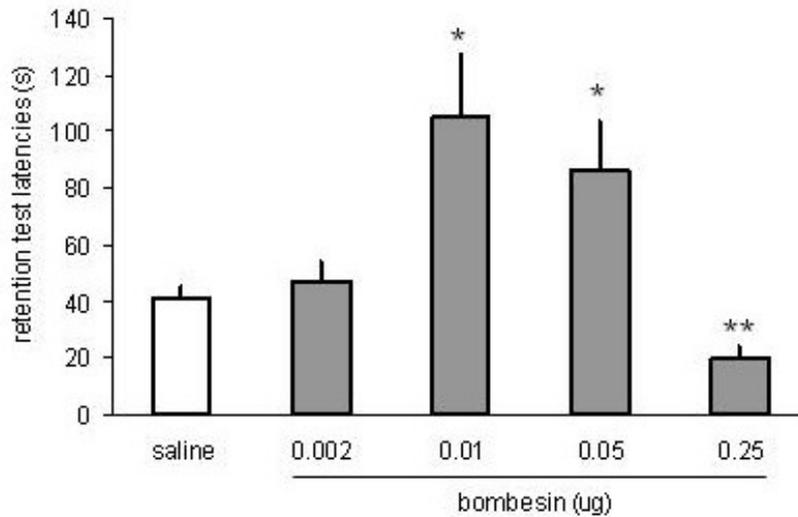


Figura 3 - Modulação da consolidação da memória no hipocampo induzida pela Bombesina

#### **4.1. A facilitação da memória no hipocampo induzida pela bombesina é dependente de GRPRs, PKC, PKA e MAPK**

Para examinar os mecanismos que agem na consolidação da memória, os rats foram divididos em 12 grupos que receberam uma infusão 10 min pré-treino e outra imediatamente após o treinamento de esquiva inibitória como descrito acima, os testes de retenção foram feitos 24 horas após o treinamento com a esquiva inibitória e os resultados estão demonstrados na figura 3.

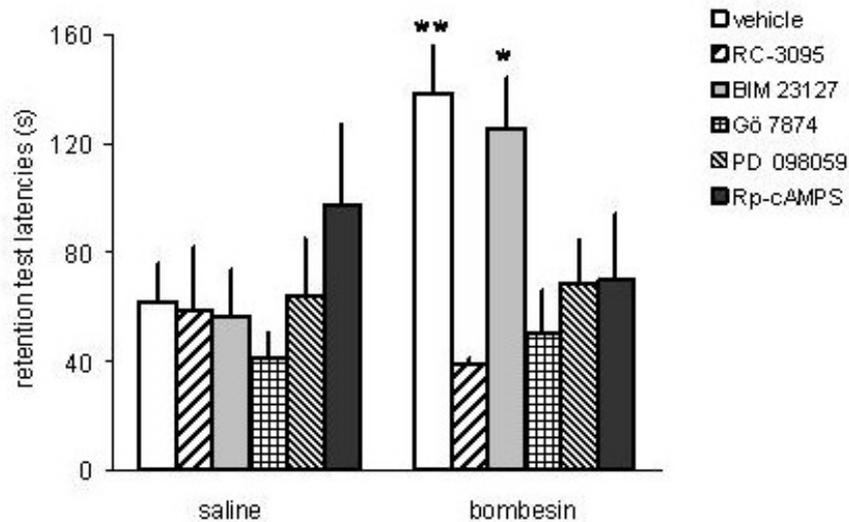


Figura 4 - A facilitação da consolidação da memória no hipocampo requer a ação dos receptores GRP e proteínas cinases.

#### Pós-treino - SALINA

- O primeiro grupo (SAL-DMSO) recebeu a infusão pré-treino de veículo (DMSO) e a pós-treino com salina. Os resultados deste grupo foram comparados aos resultados dos grupos seguintes.
- Os grupos que receberam respectivamente infusão pré-treino de RC-3095, BIM23127, Go-7874, PD-098059, e pós-treino de salina não apresentaram diferenças significativas quando comparados

ao grupo controle, indicando que não existe prejuízo na consolidação da memória.

- O grupo que recebeu a infusão pré-treino de RpcAMPS e pós-treino de salina, apesar de demonstrar um aumento no tempo de latência quando comparados ao grupo controle, não apresentou diferença significativa.

#### Pós-treino BOMBESINA

- O grupo que recebeu a infusão pré-treino de veículo (DMSO) e a pós-treino de bombesina (BB) demonstrou diferença significativa em relação ao grupo controle, confirmando que a BB, em doses baixas, age na facilitação da memória.
- O grupo RC-3095, antagonista de receptores GRP, pré-treino e BB e pós-treino, de acordo com os resultados, não demonstrou uma diferença significativa em relação ao grupo controle, o que demonstra que o RC-3095 reverte o efeito de facilitação ocasionado pela BB.

- O grupo Go-7874 (inibidor de PKC) pré-treino e BB pós-treino não apresentou diferença significativa em comparação com o grupo controle, indicando que a inibição da PKC também reverte o efeito de facilitação causado pela BB.
- O grupo PD-098059 (inibidor de MAPKK) não apresentou diferença significativa em comparação ao grupo controle, indicando que o PD-098059 reverte a ação da BB.
- O grupo BIM23127 também demonstrou uma diferença significativa quando comparado ao resultado com os animais do grupo controle, demonstrando que o antagonista do receptor da Neuromedina não reverte os efeitos da BB.
- O grupo que recebeu a infusão pré-treino de RpcAMPS e pós-treino de bombesina, apesar de demonstrar um aumento no tempo de latência quando comparado ao grupo controle, não apresentou diferença significativa.

Este trabalho teve como objetivo avaliar os mecanismos de sinalização celular que medeiam a ação da BB na consolidação da memória e os resultados sugerem que para a consolidação da memória induzida pela BB na área CA1 do hipocampo é necessária a ação dos receptores GRP, ação das proteínas cinases (PKA, PKC e MAPK), porém não é necessário a ação dos receptores de NMB, o que já era esperado, de acordo com Hhki-Hamazaki *et al*, (2005) GRP é extremamente mais expressado em cérebro de ratos que a NMB, e os receptores GRP possuem uma alta afinidade ao GRP e BB porém, baixa afinidade a NMB, enquanto que os receptores NMB possuem alta afinidade a NMB e baixa ao GRP e BB, o que indica que esses receptores são evolutivamente conservados e não são necessários no processo de consolidação da memória. Os resultados destes experimentos demonstram também que, dependendo da dose utilizada, a BB pode facilitar ou prejudicar a consolidação da memória no hipocampo.

Os experimentos aqui apresentados utilizaram treino comportamental com IA e infusões intrahipocampais para examinar os mecanismos de sinalização celular que medeiam os efeitos da BB na consolidação da memória no hipocampo. Estudos indicam que o homólogo mamífero da BB, o GRP, seja liberado juntamente com o glutamato pelos neurônios glutamatérgicos (Shumyatsky *et al.*, 2002) e age através da ligação com os receptores GRP nos sítios pós sinápticos. Os GRPRs são expressos em todo o SNC dos mamíferos, inclusive na área CA1 do hipocampo dorsal (Kamichi *et al*, 2005). A administração

sistêmica de agonistas de GRPRs induzem a um aumento na retenção de memória em ratos e camundongos (Flood and Morley, 1988; Rashidy-Pour and Razvani, 1998; Santo-Yamada *et al.*, 2001) enquanto antagonistas dos mesmos induzem ao prejuízo (Santo-Yamada *et al.*, 2003; Roesler *et al.*, 2004b; Martins *et al.*, 2005) isso também ocorre quando essas drogas são infundidas nas áreas cerebrais, inclusive no hipocampo e amígdala basolateral. Essas descobertas sugerem que a ativação dos receptores GRP tenha um papel estimulatório na formação da memória, embora outros estudos proponham que os receptores GRP estejam localizados predominantemente em interneurônios inibitórios responsáveis pela liberação de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), e a ativação dos receptores GRP pode levar a um aumento na transmissão GABAérgica, inibindo a plasticidade sináptica e a memória (Lee *et al.*, 1999; Shumyatsky *et al.*, 2002). Segundo Lee *et al.*, (1998), a BB induz a despolarização dos neurônios GABAérgicos em áreas diferentes do hipocampo. Portanto, o papel dos GRPRs no hipocampo e na formação da memória continua controverso, mas os resultados deste estudo demonstram claramente que os GRPRs no hipocampo modulam a consolidação da memória motivada emocionalmente.

Levando em consideração que os resultados do experimento que testou a ação das doses de BB demonstraram que altas doses causam um prejuízo enquanto baixas doses aumentam a memória, e que muitos estudos sugerem que os GRPRs agem no sistema de inibição, é possível que os GRPRs sejam expressos tanto em neurônios GABAérgicos,

inibitórios, quanto em neurônios glutamatérgicos, excitatórios, bem como em outros neurônios responsáveis pela liberação de outros neurotransmissores, como serotonina e dopamina. Embora não existam evidências diretas sobre a expressão dos GRPRs em neurônios excitatórios, recentes descobertas feitas por Kamichi *et al* (2005), indicam que uma subpopulação de neurônios GABAérgicos expressam GRPRs na amígdala basolateral, havendo assim a possibilidade dos GRPRs serem expressos também por neurônios não GABAérgicos liberadores de glutamato ou outros neurotransmissores.

Diferentes doses de antagonistas de GRPRs podem induzir a diferentes efeitos sobre a transmissão sináptica, estimulando ou inibindo a plasticidade sináptica e a memória (Dantas *et al.*, 2006). Além disso, baixas e altas doses de BB induzem efeitos opostos na consolidação da memória. Evidências indicam que as vias das cinases PKC, PKA e MAPK medeiam a consolidação da memória no hipocampo (Izquierdo *et al.*, 2000) e estudos em células de câncer e neuroendócrinas sugerem que as respostas intracelulares da ativação dos GRPRs provoque uma queda nos níveis de  $Ca^{2+}$  e a ativação da via fosfolipase C (PLC)/PKC, ativando na volta a via MAPK/ERK. A resposta celular dos GRPRs são bloqueadas por inibidores de MAPK e PKC (Hellmich *et al.*, 1999). Consistente com esses achados, os resultados deste estudo indicam claramente que a modulação da memória pelos GRPRs no hipocampo necessitam de ambas PKC e MAPK já que a facilitação causada pelo efeito da BB foi bloqueado quando utilizados os inibidores destas cinases, mas não prejudicando a memória.

Agonistas GRPRs ativam proteínas Gq induzindo a fosfolipase C levando a um aumento da concentração de  $Ca^{2+}$  e ativação da PKC (Kroog *et al.*, 1995). As proteínas Gq, pertencente à família das proteínas G são proteínas que ativam diretamente a via da PKC, mas não da PKA (Chan e Wong, 2005) e estudos mostram que a inibição de PKA não previne respostas celulares provocadas por GRPRs (Kim *et al.*, 2000). Porém um dos alvos da sinalização por MAPK é o fator CREB (*cAMP response element binding protein*) que não é diretamente

fosforilado por MAPK, mas ativado e transcrito por uma família de proteínas cinases ativadas pelo MAPK (Xing *et al.*, 1996, Impey *et al.*, 1998).

Muitos mecanismos envolvidos nas vias PKC MAPK e PKA podem explicar a necessidade da PKA na consolidação da memória modulada pela BB, como o fato de a atividade de MAPK/ERK ser aumentada pelo  $\text{Ca}^{2+}$ , ativando assim a via cAMP/PKA nos neurônios do hipocampo (Impey *et al.*, 1998). Uma possibilidade seria que com o aumento de  $[\text{Ca}^{2+}]$  leve a um aumento na atividade de adenilato ciclase como resposta, o que aumentaria os níveis de cAMP. Sabendo-se que CREB é fosforilado por uma subunidade catalítica de PKA e responsável pela ativação de genes induzidos por cAMP, a MAPK pode estar diretamente ligada a cascata decorrente da ação de PKA, sendo de extrema importância para a consolidação da memória como demonstrado na figura 4

Analisando esses dados, propomos um modelo de mecanismos de sinalização celular mediadores da regulação pelos GRPRs na consolidação da memória na área CA1 do hipocampo, onde o GRP liberado dos terminais sinápticos, associado à proteína Gq, ligam-se aos GRPRs dos sítios pós-sinápticos. Em testes feitos com células de neuroblastoma humano foi demonstrado que os receptores dopaminérgicos D1 estão relacionados ao aumento da atividade de um dos três subtipos identificados de MAPK, JNK (c-Jun N-terminal cinase) em cAMP e PKA dependentes de diferentes maneiras (Zhen *et al.*,

1998). Essa ativação induz a um aumento nos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular provocando uma ativação da via de sinalização PLC/PKC podendo assim ativar, na volta, via MAPK. O receptor dopaminérgico D1R é associado a proteína G e a ativação da adenilato ciclase. A sinalização de cAMP induzido pelos D1R pode ser potencializado pela aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  levando à ativação da via da PKA.

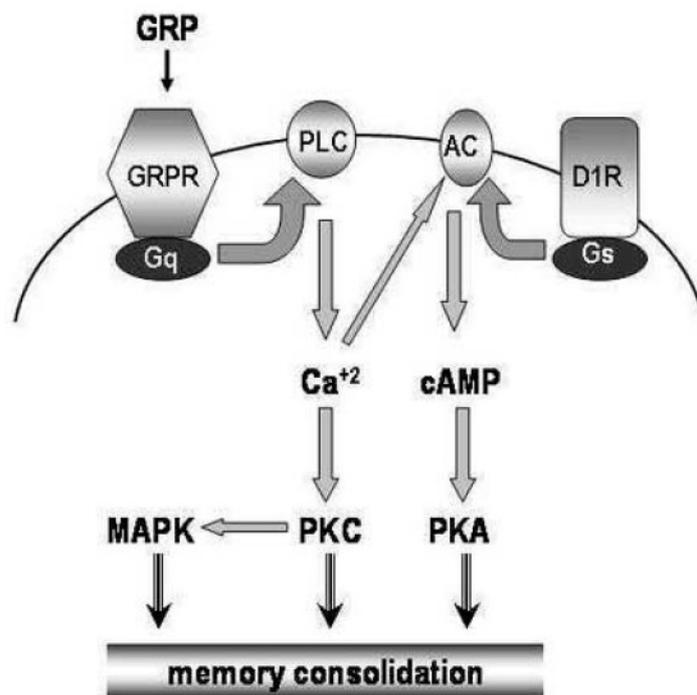


Figura 4 - Esquema de modelo para um mecanismo de sinalização celular mediando as ações regulatórias dos receptores GRP na consolidação da memória no hipocampo.

## **5. Conclusão**

Em conjunto, os resultados apresentados neste trabalho indicam que o GRPR modula a consolidação da memória aversiva no hipocampo dorsal por um mecanismo dependente das vias de sinalização celular mediadas por PKC, MAPK e PKA

## **V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

BISSETTE, G., NEMEROFF, C.B., DECKER, M.W., KIZER, J.S., AGID, Y., JAVIY-AGID, F. (1985) Alterations in regional brain concentrations of neurotensin and bombesin in Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, **17**,324-328.

BOURTCHOULADZE, R., ABEL, T., BERMAN, N., GORDON, R., LAPIDUS, K., KANDEL, E. R. (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**,365-74.

DANTAS, A. S. LUFT, T., HENRIQUES, J. A. P., SCHWARTSMANN, G., ROESLER, R. (2006) Opposite effects of low and high doses of the gastrin-releasing peptide receptor antagonist RC-3095 on memory consolidation in the hippocampus: Possible involvement of the GABAergic system. *Peptides*; **27**, 2307-2312

DAVIS, H. P., SQUIRE, L. R.,(1984) Protein synthesis and memory: a review. *Psychol Bull*, **96**,518-59.

FLOOD, J.F., MORLEY, J.E. (1988) Effects of bombesin and gastrin-releasing peptide on memory processing. *Brain Research*, **460**,314-322.

GRECKSCH, G., MATTHIES, M. (1980) Two sensitive periods for the amnesic effect of anisomycin. *Pharmacol Biochem Behav*, **12**,663-5.

HELLMICH, M.R., IVES, K.L., UDUPI, V., SOLOFF, M.S., GREELEY, G.H. JR., CHRISTENSEN, B.N., TOWNSEND, C.M. JR. (1999) Multiple protein kinase pathways are involved in gastrin-releasing peptide receptor-regulated secretion. *Journal of Biological Chemistry*, **274**,23901-23909.

IMPEY, S., OBRIETAN, K., WONG, S.T., POSER, S., YANO, S., WAYMAN, G., DELOULME, J.C., CHAN, G., STORM, D.R., (1998). Cross talk between ERK and PKA is required for Ca<sup>2+</sup> stimulation of CREB-dependent transcription and ERK nuclear translocation. *Neuron* **21**, 869-883.

ISHIKAWA-BRUSH, Y., POWELL, J.F., BOLTON, P., MILLER, A.P., FRANCIS, F., WILLARD, H.F., LEHRACH, H., MONACO, A.P. (1997) Autism and multiple exostoses associated with an X;8 translocation occurring within the GRPR gene and 3' to the SDC2 gene. *Human Molecular Genetics*, **6**,1241-1250.

ITO, E., OKA, K., ETCHEBERRIGARAY, R., NELSON, T.J., MCPHIE, D.L., TOFEL-GREHL, B., GIBSON, G.E., ALKON, D.L. (1994) Internal Ca<sup>2+</sup> mobilization is altered in fibroblasts from patients with Alzheimer

disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, **91**,534-538.

IZQUIERDO, I., QUEVEDO, J., IZQUIERDO, L.A., VIANNA, M.R.M., SZAPIRO, G., BARROS, D.M., ROESLER, R., ALONSO, M., WALZ, R., MEDINA, J.H. (2000) What can go wrong when memory fails: The main biochemical events underlying consolidation and retrieval in rats. In Palomo, T., Beninger, R.J. & Archer, T. (eds) *Neurodegenerative Brain Disorders*. Fundacion Cerebro y Mente, Madrid, pp.131-151.

KIM, H.J., EVERS, B.M., LITVAK, D.A., HELLMICH, M.R., TOWNSEND, C.M. JR. (2000) Signaling mechanisms regulating bombesin-mediated AP-1 gene induction in the human gastric cancer SIIA. *American Journal of Physiology and Cell Physiology*, **279**,C326-334.

KRANE, I.M., NAYLOR, S.L., HELIN-DAVIS, D., CHIN, W.W. and SPINDEL, E.R. (1988). Molecular cloning of cDNAs encoding the human bombesin-like peptide neuromedin B. Chromosomal localization and comparison to cDNAs encoding its amphibian homolog ranatensin. *J Biol Chem* **263**: 13317-13323.

LEE, K., DIXON, A.K., GONZALEZ, I., STEVENS, E.B., McNULTY, S., OLES, R., RICHARDSON, P.J., PINNOCK, R.D., SINGH, L., (1999). Bombesin-like peptides depolarize rat hippocampal interneurons

through interaction with subtype 2 bombesin receptors. *Journal of Physiology* **518**, 791-802.

MCGAUGH, J.L. (2000) Memory - a century of consolidation. *Science*, **287**,248-251.

MCGAUGH, J.L., IZQUIERDO, I. (2000) The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. *Trends in Pharmacological Sciences*, **21**,208-210.

MELLER, C.A., HENRIQUES, J.A.P., SCHWARTSMANN, G., ROESLER, R. (2004) The bombesin/gastrin-releasing peptide receptor RC-3095 blocks apomorphine but not MK-801-induced stereotypy in mice. *Peptides*, **25**,585-588.

MOODY, T.W., MERALI, Z. (2004). Bombesin-like peptides and associated receptors within the brain: distribution and behavioral implications. *Peptides*, **25**,511-520.

OHKI-HAMAZAKI, H., IWABUCHI, M., MAEKAWA F. (2005). Development and function of bombesin-like peptides and their receptors. *Int. J. Dev. Biol.* 49: 293-300.

OLINCY, A., LEONARD, S., YOUNG, D.A., SULLIVAN, B., FREEDMAN, R. (1999) Decreased bombesin peptide response to cigarette smoking in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, **20**,52-59.

OLIVE, M.F., MESSING, R.O., (2004). Protein kinase C isozymes and addiction. *Mol Neurobiol*, **29**,139-154.

PARKER, P.J., MURRAY-RUST, J. (2004). PKC at a glance. *J Cell Sci*, **117**,131-132.

QUEVEDO, J., VIANNA, M.R., MARTINS, M.R., BARICHELLO, T., MEDINA, J.H., ROESLER, R., IZQUIERDO. I. (2004) Protein synthesis, PKA, and MAP kinase are differentially involved in short- and long-term memory in rats. *Behavioural Brain Research*, **154**,339-343.

ROESLER, R. HENRIQUES, J.A.P., SCHWARTSMANN G. (2004a) Neuropeptides and anxiety disorders: bombesin receptors as novel therapeutic targets. *Trends in Pharmacological Sciences*, **25**,241-242.

ROESLER, R., KOPSCHINA, M.I., ROSA, R.M., HENRIQUES, J.A., SOUZA, D.O., SCHWARTSMANN, G. (2004b) RC-3095, a bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist, impairs aversive but not recognition memory in rats. *European Journal of Pharmacology*, **486**,35-41.

ROESLER R, LESSA D, VENTURELLA R, VIANNA MR, LUFT T, HENRIQUES JA, IZQUIERDO I, SCHWARTSMANN G. (2004c) Bombesin/gastrin-releasing peptide receptors in the basolateral amygdala regulate memory consolidation. *European Journal of Neuroscience*, **19**,1041-1045.

ROESLER, R., MELLER, C.A., KOPSCHINA, M.I., SOUZA, D.O., HENRIQUES, J.A.P., SCHWARTSMANN, G. (2003a) Intrahippocampal infusion of the bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 impairs inhibitory avoidance retention. *Peptides*, **24**,1069-1074.

ROESLER, R., SCHRÖDER, N., VIANNA, M.R., QUEVEDO, J., BROMBERG, E., KAPCZINSKI, F., FERREIRA, M.B.C. (2003b) Differential involvement of hippocampal and amygdalar NMDA receptors in contextual and aversive aspects of inhibitory avoidance memory in rats. *Brain Research*, **975**,207-213.

SCHAFE, G. E., NADEL, N.V., SULLIVAN, G. M., HARRIS, A., LeDOUX, J. E. Memory consolidation for contextual and auditory fear conditioning is dependent on protein synthesis, PKA, and MAP kinase (1999). *Learn Mem*;**6**,97-110.

SHUMYATSKY, G.P., TSVETKOV, E., MALLERET, G., VRONSKAYA, S., HATTON, M., HAMPTON, L., BATTEY, J.F., DULAC, C., KANDEL, E.R., BOLSHAKOV, E.Y. (2002) Identification of a signaling network in

lateral nucleus of amygdala important for inhibiting memory specifically related to learned fear. *Cell*, **111**,905-918.

TIUNOVA, A., ANOKHIN, K., ROSE, S. P. R., MILEUSIC, R. (1996). Involvement of glutamate receptors, protein kinases, and protein synthesis in memory for visual discrimination in the young chick. *Neurobiol Learn Mem*,**65**:233-43.

WALZ, R., ROESLER, R., QUEVEDO, J., ROCKENBACK, I., AMARAL, O. B., VIANNA, M., LENZ, G., MEDINA, J.H., IZQUIERDO, I (1999) Dose-dependent impairment of inhibitory avoidance retention in rats by immediate post-training infusion of a mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor into cortical structures. *Behavioural Brain Research*, **105**, 219-223

WALZ, R., ROESLER, R., QUEVEDO, J., SANT'ANNA, M., MADRUGA, M., RODRIGUES, C., GOTTFRIED, C., MEDINA, J.H., IZQUIERDO, I. (2000) Time-dependent impairment of inhibitory avoidance retention in rat by posttraining infusion of a mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor into cortical and limbic structures. *Neurobiology of Learning and Memory*, **73**,11-20.



**Anexo:**

ROESLER, R., LUFT, T., OLIVEIRA, S.H.S., FARIAS, C.B., ALMEIDA, V.R., QUEVEDO, J., DAL PIZZOL, F., SCHÖDER, N., IZQUIERDO, I., SCHWARTSMANN, G. (2006). Molecular mechanisms mediating gastrin-releasing peptide receptor modulation of memory consolidation in the hippocampus. *Neuropharmacology*, 51:350-357.

**Observação:** As figuras 1, 2 e 3 deste artigo apresentam resultados referentes a esta dissertação. As demais figuras do artigo (4 e 5) contém dados que serão apresentados em dissertações de mestrado e teses de doutorado de outros autores