

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

**DEPRIVAÇÃO MATERNA NO PERÍODO NEONATAL E SEUS EFEITOS NA  
CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA E ESPACIAL EM RATOS**

Fernando Benetti

Tese de Doutorado.

Porto Alegre, setembro de 2009.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

**DEPRIVAÇÃO MATERNA NO PERÍODO NEONATAL E SEUS EFEITOS NA  
CONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA AVERSIVA E ESPACIAL EM RATOS**

Fernando Benetti

Tese de Doutorado.

Porto Alegre, setembro de 2009.

## **Informações gerais**

### ***Título do projeto desenvolvido***

*“Deprivação materna no período neonatal e seus efeitos na consolidação da memória aversiva e espacial em ratos”*

### ***Linha de pesquisa:***

1) Mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos na formação, expressão, extinção e reaquisição de memórias.

2) Neurologia comportamental

3) Neuroplasticidade: papel na memória e sua relação com a atividade elétrica cerebral normal e patológica.

### ***Pesquisadores participantes e colaboradores:***

*MSc.Fernando Benetti*, PPG Fisiologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil;

Dr. Martín Cammarota, Centro de Memória, IPB, PUCRS Porto Alegre, RS, Brasil;

Dr. Ivan Izquierdo, Centro de Memória, IPB, PUCRS; e PPG Fisiologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil;

### ***Local de realização do estudo:***

Centro de Memória, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Hospital São Lucas da PUCRS. Avenida Ipiranga, 6690, Jardim Botânico, Porto Alegre, RS, Brasil.

Telefone (51) 33203000 ramal 2532. CEP 90610-000.

## **Agradecimentos**

Inicialmente quero agradecer ao Prof. Dr. Ivan Izquierdo por ter me recebido de braços abertos no Centro de Memória. Hoje minha segunda casa, às vezes a primeira. Minha escolha por fisiologia ocorreu já no segundo ano da graduação e agora esta etapa de doutoramento está se concretizando e certamente lembrarei com o maior orgulho o privilégio de ter tido um grande mestre como orientador neste período do doutorado. Obrigado pela sua preocupação comigo, não somente no âmbito de trabalho, mas pessoal também em momentos particularmente difíceis na minha vida. Obrigado pelas palavras de apoio, pelos conselhos, pela sua preocupação comigo e pelas oportunidades. Seus atos, seu jeito de trabalhar, sua simpatia, humildade, inteligência e competência entre os infinitos adjetivos te fazem assim, um verdadeiro mestre.

Ao Martín, por todo o empenho e dedicação no desenvolvimento deste trabalho. Pelas idéias, por me ensinar a pensar, a mostrar um sentido de se fazer ciência, pela paciência e compreensão. Tenho muito a te agradecer pela realização e discussão dos trabalhos, por estar sempre acessível a discutir e pensar em idéias e experimentos novos, pelas risadas, convivência e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Carlos Alexandre Neto, cuja atenção e ajuda foi decisiva para meu ingresso no doutorado do PPG fisiologia da UFRGS.

A Janine, por me ensinar tudo quando eu cheguei ao laboratório. Você foi o primeiro rosto, a primeira pessoa que vi ali no Centro de Memória depois do mestre e do Martín, e de cara ficamos amigos, muito amigos. Muito do que eu sei e aprendi também foi devido a sua atenção e paciência. Espero podermos estar sempre por perto e compartilhar ainda muito trabalho e alegrias. Obrigado por tudo.

Agradeço especialmente à Pâmela, pois ela foi quem contribuiu diretamente nos experimentos comportamentais realizados nesta tese, e por estar sempre disponível a ajudar-me em tudo o que precisava.

Agradeço também à Juliana e à Siomara, pela inquestionável afinidade. Pelas inúmeras risadas, alegrias e pelo clima sempre agradável de trabalho. Agradeço pelo esforço e pela participação nos experimentos que tornaram possível a publicação de um artigo e independente de tudo isso pela nossa bela amizade.

Ao meu amigo Weber, pela convivência, pela experiência, pela sua inteligência, pela irreverência, pelo confronto de idéias, pelas inúmeras discussões experimentais, pessoais, por entender o novo, questionar o diferente, duvidar do belo e por sempre poder compartilhar de suas qualidades com seus amigos. Aprendi coisas preciosas contigo!

Ao Cristiano, por todas as luzes acesas no final do túnel e pela nossa eminente amizade.

À Lia, por mostrar-me a importância amigável que os detalhes, a atenção e concentração fazem nos resultados dos experimentos. E claro, pela amizade.

Aos colegas do Laboratório: Jociane, Ramón, Julia, Andressa, Gabriela, Duda, Lara, Isa, Lucas e Clarice. Apesar de nem todos pensarem da mesma maneira, e de que em alguns dias nem todos estavam sintonizados na mesma frequência, o convívio com vocês foi enriquecedor nestes quatro anos. Agradeço pela imensa contribuição de todos em todos os sentidos que nos fizeram não só colegas de trabalho, mas também amigos. Agradeço a todos por me apoiarem e me ajudarem em um dos momentos mais difícil da minha vida.

À minha mãe e meu irmão, minha maior riqueza. Meu conforto, meu bem estar, minha maior alegria, meu apoio e segurança. Pelas dores e alegrias, do nosso jeito de viver, que só nós entendemos, enfim por tudo e por não ter palavras para expressar todo o amor que sinto por vocês.

Agradeço ao Marcelo, meu amigo, meu irmão e minha família aqui em Porto Alegre. Agradeço-te por todos os momentos de convivência, os bons, os não tão bons assim, mas principalmente pelo nosso companheirismo, entendimento e pela nossa importantíssima amizade.

Ao CNPq, a agência de fomento da pesquisa no Brasil que me pagou as bolsas de mestrado e doutorado. Permitiu-me ainda a oportunidade de viver e estudar em Florença, na Itália, durante um ano do doutorado *Sandwich*. Oportunidade esta inesquecível e incomparável. Acompanhei e aprendi algumas técnicas laboratoriais até então não realizadas em nosso laboratório aqui no Brasil. Vi como se faz pesquisa em neurociências nos países de excelência mundial. Agradeço também porque aprendi outro idioma, a conviver com leis, regras, e pessoas com costumes quase que completamente

diferentes dos nossos, aprendi a entender o que é relevância, a conviver com o diferente, com a visão do outro, a respeitar as opiniões divergentes e principalmente porque foi um lugar onde deixei muitos amigos.

A Universidade de Firenze, Itália (UNIFI), por atender-me prontamente em todos os aspectos legais e burocráticos no ingresso de um aluno estrangeiro no seu corpo acadêmico. Em especial, agradeço aos professores Corrado Bucherelli e Elisabeta Baldi, do Departamento de Fisiologia. Primeiramente, por aceitarem o convite do Prof. Izquierdo para meu estágio no exterior, por me receberem tão bem no departamento e sempre estarem à inteira disposição em tudo o que eu precisei durante o ano de 2008, e também por me introduzir no seu grupo de pesquisa e pelas colaborações realizadas.

Ao Professor Patrizio Blandina, por aceitar-me como um filho em seu laboratório, a sua segunda casa. Por acreditar em mim mesmo sem que pudesse expressar muito bem aquilo que pensava afinal, nos 3 primeiros meses falar (usar meu conhecimento em italiano) nas reuniões na frente de vários professores me deixava um “pouco” nervoso. Agradeço a ele também por sempre ser acessível e atencioso. Desde preocupar-se por eu estar longe de casa, da família e em todos os aspectos pessoais que isso possa representar por estar morando no exterior e por acreditar que eu fosse capaz de desenvolver e participar de todos os projetos que fui incumbido a ajudar e a desenvolver neste período que permaneci em Florença e aos arredores de toda a maravilhosa região da Toscana.

Ao Professor Renato Corradetti, que, com a maior paciência do mundo, aceitou o desafio de me ensinar a fazer LTP e literalmente me ensinar tudo

sobre este tema. Desde o exame oral sobre conhecimentos em eletrofisiologia até a parte prática. Aprendi a importância de ter sempre um grande conhecedor ao nosso lado, dando dicas, auxiliando, criticando e também elogiando com humildade. Obrigado mesmo.

À Professora Beatice Passani, por participar comigo em todos os experimentos, trocar idéias, sugestões científicas e pessoais. Aos inúmeros cafés compartilhados entre um experimento e outro. Obrigado pelas inúmeras correções na língua italiana, pela paciência na discussão dos resultados, por ensinar-me e aprendermos grandes coisas juntos.

Ao Leo, por ser minha sombra no laboratório, pela parceria nos experimentos e pela amizade.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, onde pude conquistar uma vaga no programa e usufruir dos ensinamentos acadêmicos deste programa e por toda a atenção e assistência fornecida por parte da coordenação, funcionários, professores e pesquisadores.

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, (PUCRS), por permitir o acesso ao espaço físico do Centro de Memória e pela manutenção dos animais experimentais.

A todos os amigos e colegas da fisiologia da UFRGS e do IPB/PUCRS que de uma forma ou outra contribuíram e participaram na minha vida para que eu chegasse até aqui.



**Dedicatória**

Ao meu pai (in memória), à minha mãe e ao meu irmão, com todo amor.

*“Aqui estou com a esperança de que é possível começar de novo,  
sanar minha vida pensando em coisas aprendidas, com tal força  
que o tempo não apagará as coisas, os lugares e os fatos,  
e tudo será mais verdadeiro do que foi.”*

Ceslaw Milosz

## Sumário

Lista de Abreviaturas.....	xi
Lista de Figuras.....	xiii
Resumo.....	xv
Abstract.....	xvi
I. INTRODUÇÃO .....	17
I.2. Hipótese .....	32
I.3. Objetivos .....	33
I.4. Objetivos específicos .....	33
II. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
II.4.1. Reconhecimento de objetos.....	36
II.4.2. Reconhecimento social .....	37
II.4.3. Esquiva inibitória .....	39
II.4.4. Labirinto aquático de Morris .....	41
II.4.5. Campo aberto .....	43
II.4.6. Labirinto em cruz elevado .....	44
II.5. Ensaio enzimático da Acetilcolinesterase (AChE) .....	45
II.6. Preparação dos hipocampus para a técnica de Western blot .....	45
III. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	47
IV. RESULTADOS.....	48
V. DISCUSSÃO.....	69
VI. CONCLUSÕES.....	78
VII. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	79
VIII. REFERÊNCIAS .....	82
IX. ANEXOS.....	103

## Lista de Abreviaturas

AchE - Acetilcolinesterase

BDNF – Brain derived neurotrophic factor (fator neurotrófico derivado do cérebro)

SNC – Sistema nervoso central

STM – Memória de curta duração

LTM – Memória de longa duração

AMPA –  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxizolproprionato

NMDA – N-metil-D-aspartato

Mglu – receptor de glutamato do tipo metabotrópico

Mglu1 - Receptor metabotrópico tipo 1

Mglu5 - Receptor metabotrópico tipo 5

$[Ca^{2+}]_i$  – Concentração de cálcio intracelular

Mg<sup>2+</sup> - Íon magnésio

Ca<sup>2+</sup> - Íon cálcio

NO – Óxido nítrico

NOS – Óxido nítrico sintase

GDP – Guanosina bifosfato

GTP – Guanosina trifosfato

PIP2 – Fosfatidil inositol bifosfato

DAG – Diacilglicerol

IP3 – Inositol trifosfato

AC1/AC8 – Adenil ciclase 1/8

CAMKII – Proteína calmodulina cinase 2

PKA – Proteína cinase A

PKC – Proteína cinase C

MAPK – Proteína cinase ativada por mitógenos.

cAMP – Monofosfato de adenosina

ATP – Trifosfato de adenosina

RAP1 – Proteína associada a Rãs

CREB – Proteína ligante ao elemento responsivo cAMP

ERK – Proteína cinase regulada por sinal extracelular

RsK2 – Proteína cinase S6 ribossomal, isoforma 2

DNA – Ácido desoxi-ribonucléico

CRE – Gene que codifica para o CREB.

mRNA – Ácido ribonucléico mensageiro.

LAM – Labirinto aquático de Morris

IPB – Instituto de Pesquisas Biomédicas

NBM – Núcleo Basal de Meynert

ANOVA – Análise de Variância

EM – Erro da média

## Lista de Figuras

- Figura 1.** Esquema simplificado das vias de sinalização intracelular para ativação da ERK1/2 e do CREB no hipocampo .....25
- Figura 2.** Protocolo experimental do reconhecimento de objetos .....37
- Figura 3.** Protocolo experimental da memória de reconhecimento social .....38
- Figura 4.** Rato na plataforma durante a sessão de treino na esQUIVA INIBITÓRIA40
- Figura 5.** Esquema de realização do teste de esQUIVA INIBITÓRIA.....41
- Figura 6.** Vista geral da sala do LAM do Centro de Memória do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS.....42
- Figura 7.** Foto da sala mostrando o labirinto em cruz elevado com o animal na plataforma no início do teste .....44
- Figura 8.** Efeitos da deprivação materna neonatal na memória de longa duração de ratos adultos na tarefa de reconhecimento de objetos..49
- Figura 9.** Efeito da deprivação materna neonatal e do tratamento com donepezil e galantamina na tarefa de reconhecimento social.....51
- Figura 10.** Efeitos da deprivação materna neonatal na atividade da acetilcolinesterase cerebral em ratos machos adultos .....52
- Figura 11.** A deprivação materna causa déficits cognitivos nas memórias de curta e de longa duração em ratos machos adultos testados na esQUIVA INIBITÓRIA.....57
- Figura 12.** O treino na esQUIVA INIBITÓRIA não induz um aumento na fosforilação de CREB e ERK 1/2 em ratos deprivados .....59
- Figura 13.** A deprivação materna neonatal não afeta a consolidação da memória espacial em ratos deprivados.....62
- Figura 14.** A deprivação materna no período neonatal afeta a retenção do aprendizado reverso da memória espacial.....65
- Figura 15.** Efeitos do treino no labirinto aquático de Morris na fosforilação de CREB e ERK 1/2 em ratos não-deprivados e deprivados da mãe no período neonatal .....67

**Lista de Tabelas**

- Tabela 1.** Classificação das memórias de acordo com o tempo que perduram 18
- Tabela 2.** Classificação das memórias de longa duração de acordo com o conteúdo ..... 19
- Tabela 3.** A privação materna neonatal não afeta a atividade exploratória nos machos testados na idade adulta na tarefa do reconhecimento de objetos.....53
- Tabela 4.** A privação materna neonatal não afeta a ansiedade nos machos testados na idade adulta na tarefa do reconhecimento de objetos ..54
- Tabela 5.** A privação materna neonatal não afeta a atividade exploratória nos machos testados na idade adulta na esquia inibitória .....55
- Tabela 6.** A privação materna neonatal não afeta a ansiedade nos machos testados na idade adulta na esquia inibitória.....56

## Resumo

A privação materna é conhecida por promover alterações neuroquímicas, comportamentais e da estrutura cerebral que persistem ao longo da vida. Aqui investigamos se os déficits cognitivos em ratos privados podem ser relacionados com uma disfunção no sistema colinérgico e na síntese de proteínas relacionadas aos processos mnemônicos. Ratas Wistar prenhas foram colocadas em caixas individuais e mantidas no biotério no ciclo claro/escuro (12:12 horas) com comida e água a vontade. Após o parto, as mães foram separadas dos seus filhotes por 3 horas, por dia, a partir do dia 1 pós-parto (PND-1) até o PND-10. Para fazer isto, as mães foram removidas das caixas residência e colocadas em uma caixa diferente, enquanto os filhotes permaneceram na caixa original, a qual foi transferida para outra sala mantida a temperatura de 32°C. Quando adultos com 120-150 dias de idade, os animais machos privados e não privados foram divididos em duas etapas experimentais: 1) Foram sacrificados para medirmos a acetilcolinesterase (AChE) ou treinados no reconhecimento de objetos e no reconhecimento social, ou 2) Foram treinados e testados na esQUIVA inibitória e no *Morris water maze* ou foram treinados e sacrificados para mensurarmos o fator de transcrição CREB e a síntese das proteínas ERK1/2 após o treinamento em 3 diferentes tempos. Na primeira etapa, a privação materna repetida afeta a memória no reconhecimento de objetos e no reconhecimento social. Além disso, ratos privados mostraram aumento na atividade da AChE no hipocampo e no córtex perirrinal. A administração oral de inibidores da AChE donepezil ou galantamina (1mg/kg) 30 min antes da sessão de treino reverteu os prejuízos na memória causados pela privação materna. Na segunda etapa, mostramos que a privação materna repetida também afeta a memória aversiva e espacial. Os animais treinados na esQUIVA inibitória mostraram déficits cognitivos quando testados na memória de curta (2 horas) e de longa duração (24 horas) após o treino. Além disso, a análise densitométrica das proteínas revelou que ratos privados treinados na esQUIVA não aumentaram a fosforilação de CREB e ERK1/2 após o treino. Da mesma forma, ratos privados não foram hábeis em reter o aprendizado reverso no labirinto aquático de Morris, mas aqui, os déficits cognitivos podem ser relacionados com o menor aumento da fosforilação do CREB e da ERK1/2 somente 2 horas após o treino no aprendizado reverso. Esses dados sugerem que a privação materna afeta os processos mnemônicos em ratos adultos, e que estes prejuízos podem ser mediados por modificações no sistema colinérgico ou na síntese de proteínas.

## Abstract

Maternal deprivation is known to result in long-lasting neurochemical, behavioral and brain structural effects. Here we investigated whether the cognitive aspects of these deficits might be related to a disruption of the cholinergic system and protein synthesis correlated with mnemonic process. Pregnant Wistar rats were individually housed and maintained on a 12:12 h light/dark cycle with food and water freely available. The mothers were separated from their pups for 3 h per day from postnatal day 1 (PND-1) to PND-10. To do that, the dams were moved to a different cage and the pups maintained in the original home cage, which was transferred to a different room kept at 32°C. After they reached 120-150 days of age, maternal-deprived and non-deprived male rats were either sacrificed for brain acetylcholinesterase (AChE) and protein (CREB and ERK1/2) measurement, or trained in an object recognition, social recognition, inhibitory avoidance and Morris water maze tasks and divided in two sets of experiments: 1) Complete repeated maternal deprivation affects recognition and social memory and there was increased acetylcholinesterase activity in hippocampus and perirhinal cortex of the deprived rats. Oral administration of the acetylcholinesterase inhibitors, donepezil or galantamine (1mg/kg) 30 min before training session reversed the memory impairments caused by maternal deprivation. 2) Complete maternal deprivation also affects aversive and spatial memory. These animals showed memory deficits in STM and LTM in inhibitory avoidance. Furthermore, densitometric analysis of proteins revealed that deprived rats did not increase the phosphorylation of ERK and CREB after training. Similarly, deprived rats did not able to retain the reversed learning in the Morris water maze but here, the cognitive deficit can be related with the increase in the protein phosphorylation measurement only 2 hours after training in reversed learning compared to non deprived rats. That findings suggest that maternal deprivation affects memory processing at adulthood and that this impairment can be mediated by modification of the cholinergic system or in the protein synthesis.



## I. INTRODUÇÃO

Inicialmente para que possamos entender a memória é preciso deixar claro algumas diferenças conceituais entre aprendizado e memória. Embora corriqueiramente confundidos, aprendizado e memória assumem conceitos distintos. Aprendizado é a aquisição de novas informações (Izquierdo, 2002) resultado da interação do sujeito com o meio. A retenção das informações aprendidas para poder evocá-la mais adiante é chamada de memória.

Se considerarmos uma visão evolutiva, o termo memória pode ainda assumir dois sentidos. O primeiro é a capacidade que certos indivíduos possuem de armazenar dados ou informações no sistema nervoso sobre o meio que o cerca, a fim de poder interagir e mudar o seu comportamento. O segundo sentido, mais amplo, é também todo o traçado deixado no mundo ou nos seus componentes através de determinados eventos (os fósseis, a memória genética e etc). Além disso, ainda existem memórias artificiais criadas pelos seres humanos: livros, bibliotecas, computadores, filmes e arquivos sonoros e/ou de imagens.

Neste sentido, podemos definir a memória como a representação interna do mundo, versões da nossa história codificada no sistema nervoso central (SNC) e que nos ajuda a guiar nosso comportamento. Assim, desde os invertebrados, a evolução filogenética da memória permitiu aos organismos, entre eles os seres humanos, que se beneficiassem das experiências passadas para resolver seus problemas e também permitiu que tornássemos mais

adaptáveis as mudanças e até planejar o futuro. Assim, a memória pode ser melhor definida como a aquisição de informações para posterior recordação que além da sua importância de caráter evolutivo e, portanto, biológico, representa-nos a base de nossa identidade.

As memórias podem ser classificadas de acordo com o tempo de retenção ou quanto à natureza de seu conteúdo (Izquierdo e McGaugh, 2000; Squire e Kandel, 2002). As memórias podem durar somente o tempo necessário para que possamos utilizá-las, ou um tempo muito mais longo. As memórias armazenadas por um curto período de tempo (segundos, minutos, poucas horas) são chamadas de memória de curta duração (STM) e as memórias mantidas por um longo período de tempo (muitas horas, dias, semanas, anos, décadas) são chamadas de memórias de longa duração (LTM) (McGaugh, 2000; Izquierdo, 2002). Então, as memórias podem ser classificadas de acordo com o tempo em que perduram (Tabela 1).

**Tabela 1. Classificação das memórias de acordo com o tempo que perduram.**

	<b>Tempo de permanência</b>	<b>Características</b>
Memórias sensoriais	Alguns segundos	Retêm a breve impressão de um estímulo após este ter desaparecido, ou seja, depois que o sistema sensorial correspondente deixar de enviar informação ao cérebro.
Memórias de Curta Duração (STM)	Menos de 3 horas	Permite manter uma pequena quantidade de informação em estado ativo e facilmente acessível.
Memórias de Longa Duração (LTM)	Dias, meses, anos, toda a vida	Contém informações de diversas origens altamente interconectadas formando um sistema de arquivos dinâmico.

As memórias sensoriais que fazem um rápido registro de um estímulo e enviam essas informações ao cérebro. As memórias de duração muito breve (segundos) permitem compreender a informação, na medida em que ela vai sendo registrada pelo organismo, dentro de um contexto; este tipo de STM denomina-se memória de trabalho. Pertencem a ela, por exemplo, a terceira palavra da frase anterior, que persistiu só o número de segundos necessário para compreender essa frase e inseri-la no contexto do que estamos lendo ou ouvindo. As STMs de maior duração (minutos, horas) também chamadas de memórias primárias ou ativas são as memórias que nos permitem manter a mente em um estado ativo e facilmente acessível a uma quantidade limitada de informação (Rossato, 2006).

**Tabela 2. Classificação das memórias de longa duração de acordo com o conteúdo.**

Características		Subdivisões	Características
Explícitas ou Declarativas	Contém informação que usualmente sabemos que possuímos e a qual temos acesso consciente.	Episódicas	Retém as informações acerca de nossas próprias vidas e eventos.
		Semânticas	Retém as informações acerca do mundo que nos rodeia, mas que lembramos sem saber como, quando e onde as adquirimos.
Implícitas ou Não declarativas	Contém informação a qual não temos acesso consciente, tal como conhecimento procedimental e a informação obtida a partir de aprendizados simples como aqueles produzidos pelo treino em tarefas de condicionamento clássico e habituação.		

Este tipo de memória que perdura minutos ou poucas horas garante o sentido de continuidade do presente; é a que nos permite ler um capítulo, um trecho de um texto ou de uma novela ou um conto, ou entender um evento (por exemplo, um filme, uma conversa) (Bonini, 2006).

As LTM garantem o registro do passado autobiográfico, o dos conhecimentos e o das habilidades motoras ou sensoriais do indivíduo (também chamados “hábitos”); como foi dito, as LTM duram muitas horas, dias ou até anos; neste último caso, podem se denominar memórias remotas (McGaugh, 2000; Izquierdo, 2002).

Quanto à natureza de seu conteúdo (Tabela 2), as memórias podem ser classificadas em memórias declarativas (ou explícitas), e não declarativas (ou implícitas). A memória implícita é a memória dos hábitos, procedimentos e regras, ou seja, coisas que não podem ser descritas facilmente com palavras. A memória explícita é exatamente o oposto, ou seja, pode ser descrita com palavras e subdivide-se em episódica e em semântica (Izquierdo e McGaugh 2000).

As memórias episódicas são as que possuem informações a respeito de nossas próprias vidas e eventos, como por exemplo, o dia que ganhei minha primeira bicicleta, minha festa de formatura, o dia que meu pai faleceu, um filme que eu vi. Ao contrário, as memórias semânticas armazenam informações acerca do mundo que nos rodeia (a música, a matemática, a biologia, o inglês), É interessante notar que as memórias semânticas costumam ser adquiridas através de episódios, o qual talvez explique o fato de que, basicamente, tanto as memórias episódicas como as semânticas utilizam o mesmo conjunto de

sistemas ou núcleos centrais (hipocampo, córtex perirrinal, neocórtex temporal e fronto-parietal) (Izquierdo e Medina, 1997; Izquierdo, 2002; Izquierdo et al., 2006, 2008). Sobre o nível de interação entre ambos os tipos de memória declarativa só há, de momento, hipóteses (ver Milner et al., 1998; Squire e Kandel, 2002).

No entanto, para que a informação adquirida através do aprendizado seja consolidada na forma de memórias, ocorrem alterações neuroquímicas dentro e entre as células nervosas das estruturas mencionadas no parágrafo anterior, entre outras como a área basolateral do núcleo da amígdala e várias regiões do córtex pré-frontal (Izquierdo et al., 2006, 2007). A consolidação é o processo pelo qual as informações aprendidas são gravadas, e envolve a ativação ordenada e sequencial de uma série de proteínas em distintas áreas do cérebro, modulando a eficácia neuronal e promovendo o estabelecimento de novas conexões sinápticas e o fortalecimento de algumas preexistentes. Este processo converte um traço inicialmente frágil e susceptível em uma memória de longa duração estável, persistente e resistente a eventos traumáticos e a tratamentos farmacológicos (McGaugh, 2000; Rossato, 2006; Izquierdo et al., 2006, 2008).

Os eventos bioquímicos envolvidos na sinalização intracelular na formação da memória, no hipocampo, são basicamente os mesmos que foram postulados ou descritos para a potenciação de longa duração (LTP) no hipocampo (ver Izquierdo e Medina, 1995, 1997) (Figura 1). A recente demonstração da natureza bioquímica dos processos de formação ou consolidação de memórias na sub-região CA1 do hipocampo (Izquierdo et al.,

2006) coincidiu com a publicação por dois grupos diferentes de que de fato ocorre potenciação de longa duração na sinapse CA3-CA1 na sub-região CA1 durante a consolidação de pelo menos dois tipos de memória aversiva (Gruart et al., 2006; Whitlock et al., 2006).

Os passos bioquímicos da consolidação em CA1 (ou da LTP) incluem inicialmente a ativação de receptores glutamatérgicos do tipo AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxizolproprionato) que são responsáveis pela transmissão sináptica basal seguidos pela ativação de receptores glutamatérgicos NMDA (N-metil-D-aspartato) e dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGlu) (Izquierdo e Medina, 1997; Izquierdo et al., 2006). O aumento pós-sináptico das concentrações intracelulares de cálcio [ $\text{Ca}^{2+}$ ]<sub>i</sub> representa o primeiro sinal para a indução da LTP. Este sinal geralmente resulta da ação prolongada do glutamato, liberado por estimulação tetânica de um terminal pré-sináptico sobre o pós-sináptico (Izquierdo et al., 2008). Na membrana do neurônio pós-sináptico, há receptores glutamatérgicos do tipo NMDA. Estes se tornam ativos somente após a união do glutamato concomitantemente com uma despolarização prévia e mantida causada pelo efeito do glutamato sobre os receptores AMPA adjacentes. Esta despolarização prévia é necessária para que haja a saída do íon magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) do canal iônico do NMDA, desbloqueando-o, enquanto a união do glutamato resulta na abertura deste canal desbloqueando a passagem de íons  $\text{Ca}^{2+}$ . Trata-se, portanto, de um mecanismo de detecção de atividade simultânea na pré e na pós-sinapse. Com o aumento da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  ativado no espinho dendrítico a enzima NOS (NO sintase) que produz NO (óxido nítrico) a partir da l-arginina

presente na célula. O NO auxilia na liberação de vesículas contendo glutamato em resposta a chegada de um potencial de ação, mas atua apenas nas sinapses que estiverem ativas no momento do desencadeamento da LTP (Squire e Kandel, 2002) ou da consolidação da memória (Medina e Izquierdo, 1995; Izquierdo et al., 2006, 2008; Furini et al., 2009). Inibidores da NOS dados logo após o treino no hipocampo ou na amígdala potencializam a consolidação da memória (Medina e Izquierdo, 1995; Furini et al., 2009).

O glutamato, uma vez liberado na fenda sináptica, se une aos seus receptores glutamatérgicos ionotrópicos (NMDA, AMPA) e metabotrópicos, mGlu1 e mGlu5. Os ionotrópicos são os mediadores de geração de potenciais pós-sinápticos excitatórios das células que respondem ao glutamato. Os receptores metabotrópicos, uma vez ativados, ligam-se à proteína G que muda sua conformação, e sua subunidade  $\alpha$ q diminui sua afinidade por GDP, trocando-o por GTP. Uma vez alterada a sua conformação, a subunidade  $\alpha$ -GTP difunde-se pelo citoplasma e liga-se a fosfolipase C ativando-a. Esta por sua vez hidrolisa um lipídio de membrana, o fosfatidil-inositol-bifosfato (PIP<sub>2</sub>), originando diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>). O DAG difunde-se pela membrana e liga-se a proteína cinase C (PKC). O IP<sub>3</sub> difunde-se pelo citosol, ligando-se a um canal de membrana no retículo endoplasmático, que se abre e permite a saída de Ca<sup>2+</sup> estocado em seu interior, aumentando ainda mais o nível citoplasmático de Ca<sup>2+</sup> (Izquierdo, 2002). De acordo com a figura 1, este Ca<sup>2+</sup> presente no citoplasma liga-se a calmodulina formando o complexo Ca<sup>2+</sup> / calmodulina que ativa as adenilil-ciclases AC1 e AC8, a proteína cinase dependente de cálcio-calmodulina II (CAMKII) e, juntamente com o DAG, ativa

a PKC. A CAMKII e a PKC fosforilam e ativam outras proteínas, dentre as quais as proteínas ativadas por mitógenos (MAPK) e as proteínas cinases reguladas por sinal extracelular (ERK1/2) (Izquierdo, 2002; Bonini, 2006; Izquierdo et al., 2006, 2008). Além disso, a adenilil-ciclase sintetiza o monofosfato de adenosina (cAMP) a partir do trifosfato de adenosina (ATP). O cAMP liga-se a unidade regulatória da proteína cinase dependente de cAMP (PKA). A subunidade catalítica da PKA, agora desinibida, ativa no citosol a Rap 1 (proteína associada a Ras) e/ou migra para o núcleo, onde fosforila o fator de transcrição CREB (proteína ligante ao elemento responsivo ao cAMP), ativando-o (Bernabeu et al., 1997). A Rap1 fosforila, no citoplasma, a proteína cinase regulada por sinal extracelular (ERK1/2). A ERK1/2 uma vez fosforilada, migra para o núcleo e fosforila Rsk-2 (proteína cinase S6-ribossomal, isoforma 2), e ou fosforila o fator de transcrição Elk1. A Rsk2, então ativada, fosforila o fator de transcrição CREB (Thomas e Huganir, 2004). Este, por sua vez, liga-se ao DNA (ácido desoxirribonucléico) numa sequência de bases específicas denominada CRE (elemento responsivo ao cAMP), que se situa em uma região específica dos genes chamada de promotores imediatos e tardios.

Os genes imediatos codificam mRNA (ácido ribonucléico) para outros fatores de transcrição, que então se ligarão aos promotores de um outro conjunto de genes tardios, ativando sua transcrição. Os genes tardios codificam mRNA para proteínas estruturais, de adesão ou receptores (AMPA, NMDA, metabotrópicos), que serão requisitados para a produção de sítios sinápticos que irão reforçar especificamente as sinapses que desencadearam todo este processo.



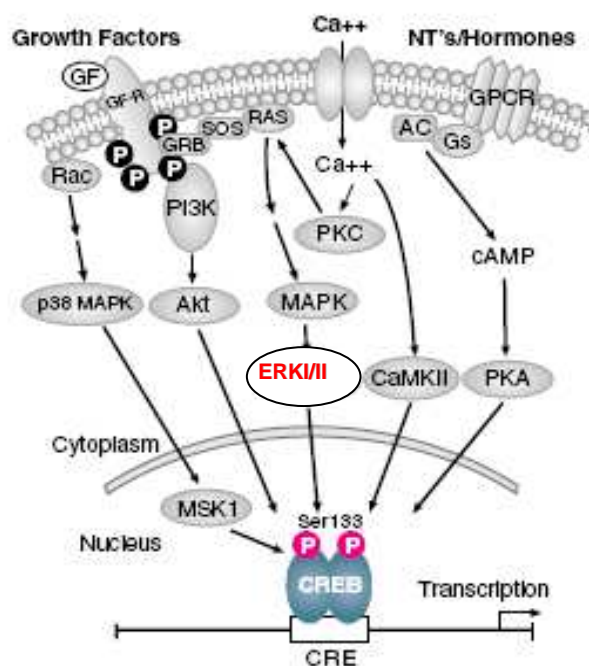


Figura 1. Esquema simplificado das vias de sinalização intracelular para ativação da ERK1/2 e do CREB no hipocampo.

Esta última etapa representa a fase tardia da LTP que podem durar dias ou semanas (Squire e Kandel, 2002; Izquierdo et al., 2008).

Além dos fenômenos descritos até aqui, grandes evidências indicam que a LTM requer a síntese de proteínas (Davis e Squire, 1984; McGaugh, 2000; Igaz et al., 2002). Diferentes tipos de aprendizados em uma variedade de espécies incluindo humanos (Atkins et al., 1998; Berman et al., 1998; Sharma et al., 2003) requerem a ativação do fator de transcrição constitutivo CREB para a formação de LTM (Guzowski e McGaugh, 1997; Bernabeu et al., 1997; Lamprecht et al., 1997; Kida et al., 2002). Um dos principais sistemas de transdução do sinal que regulam a produção e a atividade do CREB é o das

cinases reguladas extracelularmente (ERKs), especificamente a ERK 1/2 cinase (Atkins et al., 1998; Cammarota et al., 2000; Izquierdo et al., 2008).

O U0126 (inibidor da ERK 1/2 cinase), quando administrado na região CA1 do hipocampo, impede a formação da memória na esQUIVA INIBITÓRIA (Rossato et al., 2004); efeito similar se obtém com outros inibidores dessa enzima (Walz et al., 1999). Ratos que receberam um choque de 0.5 mA durante a sessão de treino na esQUIVA INIBITÓRIA mostraram um aumento na fosforilação de ERK1/2 (Alonso et al., 2002). A administração de anisomicina (inibidor da síntese protéica) na amígdala também impede a consolidação da memória na esQUIVA INIBITÓRIA, além de alterar a liberação de neurotransmissores importantes nesse processo (Qi et al., 2009). Além disso, Rossato e colaboradores (2006) também demonstraram que a administração intrahipocampal de anisomicina bloqueia a consolidação da memória de reconhecimento de objetos. Portanto, as memórias podem ser modificadas através do uso de fármacos antes ou depois da sessão de treino (Ardenghi et al., 1997, Bonini et al., 1997). A modulação da memória pode ser feita, por exemplo, com o uso de antagonistas de receptores NMDA, AMPA, ou com o uso de inibidores da síntese protéica, entre elas a ERK, considerada uma das vias mais ativadas durante o processo de consolidação e da manutenção da LTP (Atkins et al., 1998; Walz et al., 1999; Cammarota et al., 2000; Rossato et al., 2004) junto com a via de sinalização da PKA (Izquierdo & Medina, 1997; Izquierdo et al., 2006).

Em conjunto com os mecanismos neuronais há, por exemplo, outros múltiplos processos que participam na consolidação da memória. Mecanismos

que vão desde a liberação de neurotransmissores, (dopamina, noradrenalina, serotonina, histamina), hormônios (estrógeno e a corticosterona), efeitos de agentes estressores e da participação dos sistemas colinérgico e dos endocanabinóides (Izquierdo et al., 2004, 2006).

Fortes evidências apontam o sistema colinérgico como um dos maiores moduladores da memória e seu papel na doença de Alzheimer despertou muita atenção de pesquisadores nos últimos 30 anos (Izquierdo et al., 2004; Prado et al., 2006; dec Castro et al., 2009). A formação hipocampal recebe abundante inervação do sistema colinérgico e a acetilcolina (ACh) desempenha um papel fundamental no aprendizado. Na clínica, importantes déficits cognitivos são evidenciados em pacientes com a doença de Alzheimer (Bartus et al., 1982; Winkler et al., 1998) e estão relacionados a profundas disfunções nos neurônios colinérgicos produtores da ACh pelo núcleo basal de Meynert (NBM) (Barnes et al., 2000). Entretanto, inibidores da AchE como a galantamina e o donepezil, revertem ou bloqueiam os sintomas amnésicos da doença de Alzheimer.

Os inibidores da AchE como o donepezil e a galantamina, parecem ter uma dupla função na sinapse colinérgica. Primeiro, eles elevam os níveis de ACh na fenda sináptica para agirem nos receptores muscarínicos dos neurônios pós sinápticos. Segundo, agem aumentando a liberação de acetilcolina através da via dos receptores nicotínicos (Marchi e Raiteri, 1996; Barnes et al., 2000) e potencializam indiretamente a atividade dos receptores NMDA (Moriguchi et al., 2004).

Estudos clínicos têm mostrado que a galantamina, por exemplo, melhora a cognição de pacientes com Alzheimer (Raskind et al., 2000; Tariot et al., 2000; Wilkinson e Murray, 2001; Lamirault et al., 2003; Gold 2003). Em estudos com animais, a galantamina foi capaz de reverter a amnésia induzida pela escopolamina em camundongos e ratos testados na esQUIVA INIBITÓRIA (Bores et al., 1996; Chopin & Briley, 1992), assim como no labirinto em T e no LAM em ratos (Fishkin et al., 1993). Em animais que tiveram o NBM lesionado, a amnésia foi revertida pelo uso da galantamina quando os animais foram testados no LAM (Morris et al., 1982) e na esQUIVA INIBITÓRIA (Sweeney et al., 1990). Mais recentemente foi demonstrado melhora no aprendizado e na retenção da memória no reconhecimento de objetos em animais que receberam doses de donepezil (Pickaerts et al., 2005) ou galantamina (Lamirault et al., 2003; Bruin & Pouzet, 2006). Além disso, fatores que interferem na neurogênese como os glicocorticóides, estresse e a idade, são conhecidos como potenciais mediadores dos prejuízos nas funções hipocampais (Gould et al., 1999, Levine, 2005). A deleção genética do transportador rápido de ACh para as vesículas sinápticas, que interfere seriamente com a transmissão colinérgica tanto nicotínica como muscarínica, causa graves deficiências na consolidação de memórias de índole aversiva, de reconhecimento de objetos ou reconhecimento social e espacial (Prado et al., 2006; de Castro et al., 2009).

Em mamíferos, incluindo roedores, intervenções na relação mãe-filhote nas fases iniciais da vida promovem alterações na emocionalidade bem como nas funções cognitivas que perduram ao longo da vida. Essas alterações

representam um considerável fator de risco para o desenvolvimento de doenças de ordem psiquiátricas e neurodegenerativas (Levine, 2000; Price et al., 2001; Huang et al., 2002; Cirulli et al., 2003; Renard et al., 2005; Benetti et al., 2007; Benetti et al., 2009) como, por exemplo, déficits de memória (Gruss et al., 2008; Kikusui et al., 2009).

Um paradigma bastante utilizado para a indução desses déficits cognitivos é a deprivação maternal repetida (3 a 6 horas diárias de deprivação dos filhotes da mãe) que é amplamente utilizado na literatura e atua como um dos mais potentes estressores naturais para os filhotes durante o período de desenvolvimento (Huang et al., 2002; Renard et al., 2005; Benetti et al., 2009; Mello et al., 2009; Aisa et al., 2009).

Diferentes tipos de estresse ao longo da vida, como um estresse social ou a negligência do cuidado parental, e mais precisamente do cuidado materno em ratos, está associado com mudanças importantes na idade adulta em seu comportamento, na fisiologia em resposta ao estresse e a susceptibilidade a psicopatologias ao longo da vida. Ratos que foram privados da mãe no período neonatal mostraram, quando estudados na idade adulta, aumento no medo e ansiedade em resposta a um agente estressor (Kuhn e Schanberg, 1998; Wigger e Neumann, 1999; Renard et al., 2005, Renard et al., 2007), altos níveis de corticosterona (Huot et al., 2002; Huot et al., 2004; Plotsky et al., 2005), maior inibição comportamental provocadas por medo a exposição a ambientes novos (Ogawa et al., 1994; Madruga et al., 2006), maior imobilidade (Aisa et al., 2007) e maior atividade da medula adrenal refletida pela maior secreção de adrenalina e noradrenalina (Renard et al., 2005). Portanto, fortes

evidências sugerem que a privação materna é um estresse psicossocial potente e que afeta as funções cerebrais, sejam elas plásticas (estruturais) ou neuroquímicas.

Muitos dos estudos que relatam os efeitos que a privação materna na infância têm sobre o aprendizado e memória são contraditórios, e a maioria aponta o estresse neonatal em ratos ou em humanos às diversas situações estressantes da vida cotidiana como o principal mediador destes distúrbios (Levine, 2005). Lehmann e seus colaboradores (1999) foram um dos primeiros grupos a estudar os efeitos na cognição do paradigma da separação materna. Usando um protocolo de 24 horas de separação única demonstraram que ratos privados apresentavam déficits cognitivos na memória de medo condicionado e na esQUIVA ativa (Lehmann et al., 1999), mas não tinham déficits cognitivos no LAM (Lehmann et al., 1999; 2002), e atribuíram esses efeitos cognitivos a uma maior ansiedade e liberação de glicocorticóides no hipocampo.

Em contrapartida, estudos mais recentes, usando o modelo da privação materna repetida com ratos e camundongos, mostraram que a privação materna no período neonatal diminui a expressão de fatores neurotróficos derivados do cérebro (BDNF), (Lippmann et al., 2007; Fumagalli et al., 2004; Roceri et al., 2004) e altera a expressão de receptores glutamatérgicos no hipocampo, mas não no córtex pré - frontal (Pickering et al., 2006) em ratos, e, em camundongos diminui não só a produção de BDNF como também a neurogênese (Kikosui et al., 2009). Além disso, outros estudos mostraram aumento na apoptose neuronal e redução no número de neurônios

hipocampais em ratos adultos, evidenciando as alterações estruturais causadas pela deprivação maternal repetida (Lee et al., 2001; Huot et al., 2002, Roceri et al., 2002; Mirescu et al., 2004).

Recentemente alguns resultados no LAM, no nado forçado e no reconhecimento de objetos mostraram déficits cognitivos em ratos privados, mas foram revertidos com o uso de mifepristone e propranolol (Aisa et al., 2007). Além disso Mello e colaboradores (2009) demonstraram que o exercício físico pode reverter o déficit cognitivo na memória de medo, mas não reverte os déficits no LAM e no reconhecimento de objetos. Claramente a deprivação materna no período neonatal produz anormalidades nas funções associadas com o hipocampo e amígdala (Mirescu et al., 2004), duas regiões estruturais envolvidas nas memórias espaciais (Martin et al., 2005; Micheau et al., 2004) e aversivas (Medina e Izquierdo, 1995; Izquierdo & Medina 1997; Alonso et al., 2002; Vazdarjanova et al., 2001; de Castro et al., 2009) respectivamente. Desta maneira, compreender como a deprivação maternal atua nos mecanismos da formação da memória tornou-se primordial para contribuir com soluções farmacológicas e terapêuticas na clínica ou na pesquisa básica para reverter possíveis déficits na memória causados pela deprivação materna por exemplo.

## I.2. Hipótese

Nós testamos à hipótese de que a privação materna no período neonatal pode causar déficits cognitivos nos animais adultos. Para verificar esta hipótese, partimos do pressuposto que esses efeitos deletérios podem ser mediados pela atividade aumentada da AchE no sistema colinérgico e/ou por alterações neuroquímicas na fosforilação das proteínas cinases ERK1/2 e do fator de transcrição CREB no hipocampo, que, como vimos, é crucial para a consolidação das memórias espacial, aversiva e de reconhecimento (Izquierdo et al., 2006; Rossato et al., 2006; Clarke et al., 2008; Furini et al., 2009).

A atividade aumentada de AchE pode inviabilizar o acúmulo de quantidades de acetilcolina nos níveis ideais para o funcionamento das sinapses colinérgicas. Esta menor quantidade de acetilcolina na fenda sináptica possivelmente interfere na ativação das cascatas de fosforilação das proteínas cinases, entre elas a PKC, as ERKs, assim como a fosforilação do fator de transcrição CREB, induzindo a possíveis déficits cognitivos.

Desta maneira, estudar a participação do sistema colinérgico e da fosforilação do CREB e da ERK1/2 cinase nos mecanismos de consolidação de memórias espaciais e aversivas em ratos privados tornou-se imprescindível para explicar os resultados apresentados nesta tese.



### **I.3. Objetivos**

Este projeto tem por objetivo principal verificar os efeitos comportamentais e neuroquímicos que a deprivação maternal no período neonatal tem na consolidação de memórias aversivas e espaciais em animais testados na idade adulta.

### **I.4 Objetivos específicos**

**1)** Estudar se a deprivação maternal causa déficits cognitivos em diferentes paradigmas comportamentais.

**2)** Verificar se a administração oral de donepezil ou galantamina é capaz de reverter possíveis déficits cognitivos em animais treinados na idade adulta nas tarefas comportamentais de reconhecimento de objetos e de reconhecimento social.

**3)** Verificar, como parâmetro de atividade colinérgica, se há diferenças na atividade de AchE em níveis basais no hipocampo e córtex perirrinal de ratos não deprivados e deprivados.

**4)** Medir a fosforilação de ERK1/2 cinase e de CREB em ratos que foram treinados na esQUIVA inibitória e no labirinto aquático de Morris.

## II. MATERIAIS E MÉTODOS

### II.1. Fêmeas prenhas

Ratas *Wistar* prenhas com idade entre 80 a 90 dias e com peso de 200-220g, foram obtidas da colônia de reprodução do CREAL da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Cada fêmea foi mantida individualizada em sua caixa residência. O dia do parto foi rigorosamente controlado e considerado como dia zero. Todas as mães e filhotes foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas cada (início ciclo claro às 07h00min e início ciclo escuro às 19h00min) com ração e água a vontade, com temperatura controlada (23-24 °C) e umidade (60%) mantida constante. O máximo de precaução foi tomado com o intuito de minimizar o sofrimento dos animais e de reduzir o número de animais utilizados. Todos os experimentos estavam de acordo com as normas dos “*Principles of laboratory animal care*” (NIH publication N° 85-23, revised 1996).

### II.2. Deprivação maternal

No dia 1 pós-parto (PND 1), as ninhadas foram levadas artificialmente, por redistribuição, ao nível de 10 filhotes (cinco machos e cinco fêmeas quando possível) por mãe. Um ou mais filhotes de cada ninhada foram utilizados em cada um dos diferentes procedimentos experimentais.

A mãe foi afastada dos filhotes por um período de 3 horas por dia, nos 10 primeiros dias de vida. A deprivação materna consistia em remover a mãe da caixa residência. Os filhotes permaneciam nas caixas residências (agrupados no ninho na presença do cheiro da mãe), as quais foram transferidas para outra sala com temperatura constante de 32°C para compensar a temperatura corporal da mãe para a ninhada (Benetti et al., 2009). Todo esse procedimento foi realizado entre 08h00min e 13h00min. Ratos não deprivados foram mantidos intactos e com a constante presença da mãe e foram nossos animais controles. A maravalha da caixa residência só foi trocada no 11º dia pós-parto (PND 11) para ambos os grupos. Os filhotes foram desmamados aos 21 dias e somente os machos foram utilizados em nossos experimentos. As fêmeas foram doadas para outro grupo de pesquisa do Instituto de Pesquisas da PUCRS. Todos os experimentos descritos abaixo foram realizados com animais machos, adultos com idade entre 120-150 dias de vida.

### II.3. Observações comportamentais

Todos os experimentos foram realizados em salas isoladas, silenciosas com temperatura entre 23-24°C durante o ciclo claro. Os animais foram colocados nesta sala uma hora antes do início dos experimentos para habituação à mesma, seja nas sessões de treino ou nas sessões de teste. Antes de iniciar qualquer procedimento experimental, todos os animais foram gentilmente manipulados pelo experimentador. A manipulação consistia em

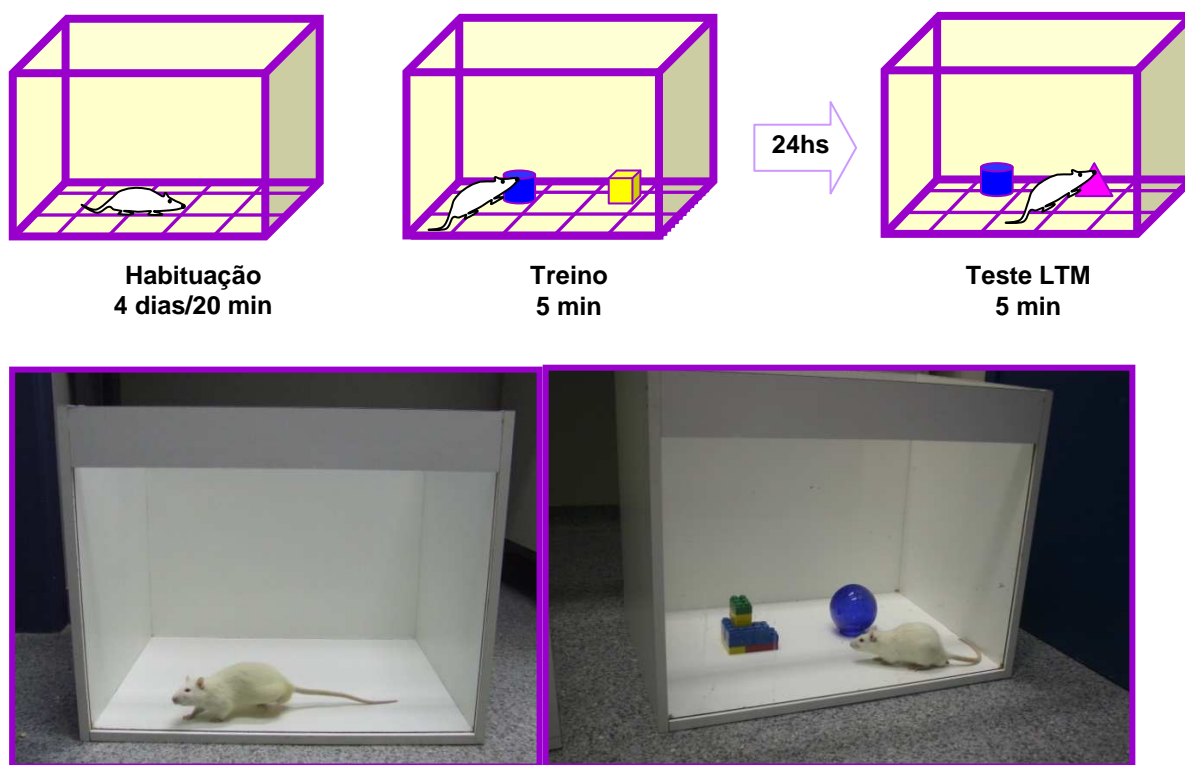
tocar os ratos, pegá-los com as mãos, de acordo com as necessidades de manuseio de animais experimentais em laboratório, a fim de promover a habituação desses animais com o experimentador e diminuir a ansiedade dos mesmos. Todos os animais foram manipulados durante 5 minutos nos quatro dias antecedentes ao início dos experimentos.

#### II.4. Tarefas comportamentais

##### *II.4.1. Reconhecimento de objetos*

A tarefa de reconhecimento de objetos (Ennaucer e Delacour, 1988) foi realizada na mesma arena do campo aberto (Figura 2), de acordo com o protocolo descrito por Myskiw et al, (2008) e de onde já obtivemos resultados prévios que foram publicados (Benetti et al., 2009). Todos os animais foram habituados na arena na ausência de objetos e outros estímulos comportamentais durante 20 min, por 4 dias. Os objetos a serem reconhecidos foram feitos de metal, vidro ou de plástico e foram fixados no chão da arena com fita adesiva. No dia da sessão de treino, os animais foram colocados na arena na presença de dois objetos distintos (A e B) e ficaram ali para explorá-los por 5 minutos. A sessão de teste foi realizada 24 horas depois da sessão de treino para avaliar a LTM. No teste, um dos objetos foi substituído por um novo objeto (C) e o rato foi novamente colocado na arena e testado por 5 minutos. A posição dos objetos (familiar ou novo) foi modificada aleatoriamente para cada animal e deixando a arena sempre limpa entre cada animal testado. A exploração dos objetos foi definida como o fato de cheirar ou tocar os objetos

com o nariz e as patas anteriores. O tempo gasto explorando cada objeto foi registrado pelo pesquisador e foi expresso como o percentual do tempo total de exploração em segundos (Rossato et al., 2007).

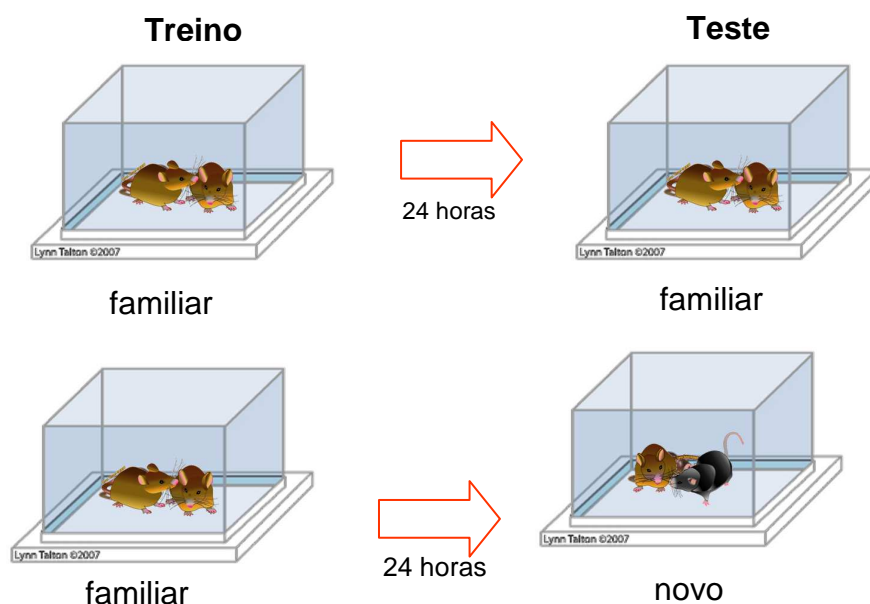


**Figura 2. Protocolo experimental do reconhecimento de objetos.** Na parte superior da figura a representação esquemática deste a habituação até a fase final no teste. Na parte inferior, as duas fotos representam respectivamente a habituação de um animal e a sessão de treino na memória de reconhecimento de objetos. As caixas utilizadas para realização dos testes no reconhecimento de objetos são as mesmas utilizadas para os testes no campo aberto.

#### *II.4.2. Reconhecimento social*

A Figura 3 ilustra o protocolo para a tarefa de reconhecimento social (Lèvy et al., 2003; Prado et al., 2006). Para este experimento cada animal foi transferido para uma caixa de acrílico transparente de dimensões 45.9 cm x

45.9 cm x 29 cm e mantidos individualizados nesta caixa por dois dias antes do início do experimento. Os animais experimentais permaneceram nestas caixas durante todo o experimento. No dia 1, um rato macho juvenil de 20 a 25 dias de vida foi colocado dentro da caixa do rato adulto experimental durante 30 minutos. Os parâmetros comportamentais analisados nos animais experimentais foram cheirar direto ou indiretamente os juvenis na região da cabeça e da região ano genital. A observação do comportamento feita pelo experimentador ocorreu nos primeiros 5 minutos de exposição do rato juvenil na caixa do rato macho adulto experimental.



**Figura 3. Protocolo experimental da memória de reconhecimento social.** Na parte superior da figura está ilustrado a sessão de treino e teste (realizada 24 horas após o treino) em que o mesmo macho juvenil, chamado familiar, foi colocado dentro da caixa do animal experimental. Na parte inferior está ilustrado a sessão de treino feita com o juvenil familiar e o teste com um macho juvenil novo. Durante as sessões de treino os machos juvenis permaneceram na caixa do animal experimental durante 30 minutos. No entanto, as sessões de treino e teste foram realizadas nos primeiros 5 minutos de exposição com o animal experimental adulto.

Ao final dos 30 minutos de exposição, o rato juvenil foi retirado da caixa do macho adulto, colocado na sua caixa residência e devidamente identificado. O dia 2 representa o dia do teste comportamental. Neste dia, os animais de cada grupo experimental foram expostos ao mesmo macho juvenil que encontraram no dia 1 ou foram expostos a um macho juvenil diferente (novo) e foram observados novamente nos primeiros 5 minutos de exposição na caixa com o animal experimental adulto. O protocolo usado foi adaptado a partir do protocolo usado por Lévy et al. (2003).

#### *II.4.3. Esquiva inibitória*

A esquiva inibitória (McGaugh, 1966; Izquierdo e Netto, 1985) (Figura 4) consiste em um aparelho com a parte frontal confeccionada em acrílico transparente, medindo 50 x 25 x 25 cm. O assoalho é uma grade de barras de bronze paralelas de 0,1 cm de calibre, separadas entre si por 1 cm. Na parte esquerda, sobre a grade, há uma plataforma de fórmica com 7 cm de largura e 2,5 cm de altura (Bernabeu et al., 1997; Cammarota et al., 2000; Bonini, 2006; Rossato et al., 2004).

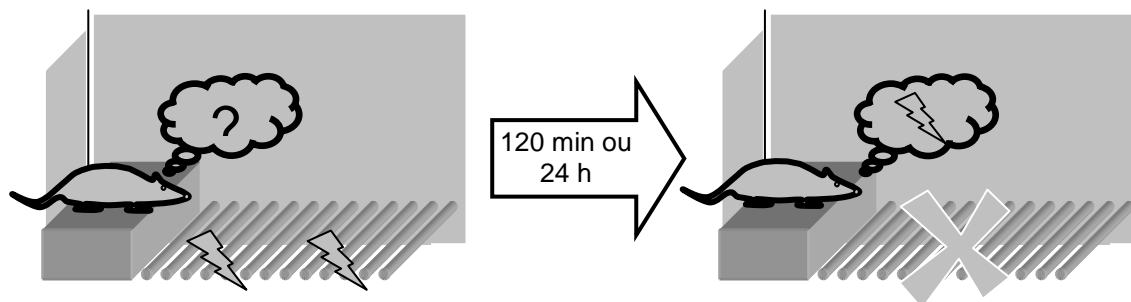


**Figura 4. Rato na plataforma durante a sessão de treino na esquiva inibitória.**

Para o teste, de sessão única, o rato foi colocado sobre a plataforma fixa no lado esquerdo do assoalho metálico conectado a um estimulador elétrico (figura 4). Ao animal foi permitido explorar toda a caixa, no entanto alguns segundos, no instante em que o animal desceu da plataforma com as quatro patas na grade de barras de bronze eletrificáveis para explorar o resto da caixa, recebeu um choque elétrico (0.4 mA). O animal então foi retirado da caixa de teste e recolocado na sua caixa residência (Cammarota et al., 1996; Rossato et al., 2004).

Para avaliar a memória formada os animais foram submetidos a sessões de teste, quando foram novamente recolocados sobre a plataforma da caixa de esquiva. Na sessão de teste foi verificada a latência de descida da plataforma; quanto mais o animal reteve a memória formada durante o treino, maior foi a latência de descida da plataforma no momento do teste (Figura 5).





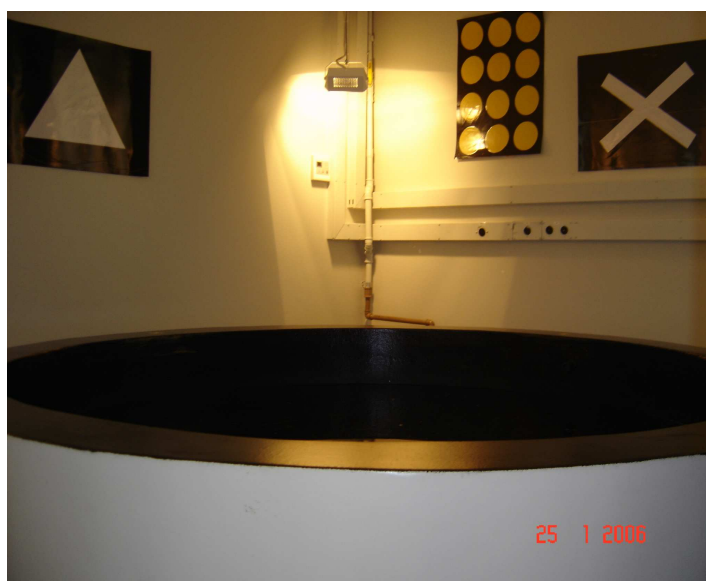
**Figura 5. Esquema de realização do teste de esquila inibitória.** Os animais foram testados na STM (120 minutos) ou na LTM (24 horas) após a sessão única de treino. Os animais que aprendem a tarefa, quando são recolocados na caixa da esquila lembram do estímulo aversivo (choque nas patas) e não descem na plataforma ou apresentam uma latência de descida maior do que aqueles animais que não aprenderam a tarefa.

#### *II.4.4. Labirinto aquático de Morris*

O labirinto aquático de Morris (LAM) (Morris et al., 1982; Rossato, 2006) (Figura 6) consiste em um tanque com 2 m de diâmetro, dividido em quatro quadrantes iguais e imaginários para análise dos dados, com seu interior pintado de preto. A tarefa depende muito da integridade física e da atividade fisiológica do hipocampo (Morris, 1982; Izquierdo et al., 2006, 2008). A temperatura da água foi mantida em  $\pm 22^{\circ}\text{C}$  durante as sessões de treino e teste. A plataforma foi colocada em um dos quadrantes e ficou submersa a menos de 2 cm da superfície da água. Durante a sessão de treino a plataforma permaneceu no mesmo lugar e importantes sinais visuais foram colocados na parede da sala onde estava o labirinto (Bonini, 2006; Rossato, 2006).

Durante os experimentos, o tanque foi filmado com uma câmera fixada no teto da sala na posição central da piscina. A latência de escape desde que o

animal começou a nadar até o encontro da plataforma foi contada. Cada animal foi treinado por cinco dias consecutivos, e em cada dia o animal passou por 8 sessões de treinos. Em cada sessão de treino o animal foi colocado dentro do tanque para nadar até encontrar a plataforma partindo de diferentes pontos. Quando os animais não encontravam a plataforma em 60 segundos eles eram gentilmente guiados para ela, onde permaneciam por 30 s, quando então eram colocados em um novo ponto no tanque. O início da tarefa sempre foi feito de maneira pseudo-randomizada, mas a plataforma submersa sempre permaneceu no mesmo lugar.



**Figura 6.** Vista geral da sala do LAM do Centro de Memória do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS.

A memória de retenção foi avaliada durante 60 segundos, no sexto dia, portanto, depois de 24 horas da última sessão de treino. O teste foi idêntico à sessão de treino exceto o fato de que a plataforma não estava presente. A duração (em porcentagem) do tempo total de permanência em cada quadrante virtual da piscina foi medida como uma memória de retenção (Huot et al., 2002; Prado et al., 2006; Rossato, 2006; de Castro et al., 2009; R). No dia 7, os ratos foram novamente submetidos a uma simples sessão de treino de aprendizado reverso, no qual os animais foram treinados a localizar a plataforma submersa desta vez fixada no quadrante oposto ao inicial. A retenção da memória foi avaliada no teste sem a plataforma no oitavo dia, portanto, 24 horas após o aprendizado reverso (Rossato et al., 2006).

#### *II.4.5. Campo aberto*

Os animais foram colocados em uma caixa branca (a mesma descrita para a tarefa do reconhecimento de objetos na parte inferior da figura 2) com dimensões de 40 cm de altura x 30 cm de profundidade x 50 cm de largura e com a frente de vidro transparente. Linhas pintadas de preto foram feitas no assoalho da caixa dividindo-a em 12 quadrados de tamanhos iguais. Os animais foram submetidos a esta tarefa com o objetivo de analisar a atividade exploratória (Barros et al., 2000, 2002; Prado et al., 2006).

#### II.4.6. Labirinto em cruz elevado



**Figura 7.** Foto da sala mostrando o labirinto em cruz elevado com o animal na plataforma no início do teste.

O labirinto em cruz elevado (Figura 7) consiste em uma plataforma central com dimensões 5 cm x 5 cm de onde os animais foram largados para iniciar a tarefa, com dois braços abertos (50 cm de comprimento x 10 cm de largura x 0.5 cm de altura) e dois braços fechados (50 cm de comprimento x 10 cm de largura e 10 cm de altura) (Pellow et al., 1985; Barros et al., 2000, 2002, 2004).. Os animais foram colocados na plataforma com o focinho na direção dos braços abertos e foram analisados por 5 minutos com o objetivo de mensurar a ansiedade e medo dos animais (Pellow et al., 1985, Barros et al., 2000).

### *II.5. Ensaio enzimático da Acetilcolinesterase (AChE)*

Os ratos foram decapitados com 120 dias de vida. Os cérebros foram removidos e as regiões CA1 do hipocampo e do córtex perirrinal foram dissecadas. A atividade da AChE foi determinada usando o método de espectrometria de acordo com a técnica de Ellman et al., (1961) modificada por Lassiter et al., (2003). Os índices de hidrólise foram mensurados na presença da acetilcolina na concentração de 0.8 mM em 1 ml de solução com 30 mM de tampão fosfato, pH 7,5 e 1 mM de DTNB a 25°C. O homogeneizado de CA1 e córtex perihinal foram centrifugados e 50 µl do sobrenadante foram adicionados a solução e incubados por 3 minutos. O resultado da reação de hidrólise da solução foi medido pela formação de tiolato de di-ânion a 412 nm, com duração de 5 min, com intervalos de 30 s. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. A dosagem de proteínas foi feita pelo método de Bradford (1976) usando albumina bovina como padrão.

### *II.6. Preparação dos hipocampos para a técnica de Western blot*

Os hipocampos foram rapidamente dissecados e armazenados em freezer a -80°C. Os homogeneizados hipocampais foram preparados em solução tampão (NaF 50mM, Tris 20mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM, PMSF 1mM, ortovanadato 1mM). As quantidades de proteínas para cada amostra foram quantificadas como descrito por Bradford et al. (1976), usando albumina bovina (sérica) como padrão de normalização dos dados.

Após a quantificação das proteínas foram realizados os experimentos de Wester Blot. Para estes experimentos, quantidades iguais de proteínas (20µg) foram fracionadas por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (PAGE) e transferidos em membranas de polovinilidileno difluorido (PVDF). A eficiência da transferência das proteínas pelo “electroblotting” foi verificada pelo método de Ponceau S. As membranas foram bloqueadas em tampão (Tween-Tris, salina, (TTBS; 100mM Tris-HCl, pH7.5, contendo 0.9%NaCl e 0.1%Tween-20) contendo albumina a 5% e incubadas overnight a 4°C com anticorpo primário poli clonal para CREB total e CREB fosforilado (Upstate, 1:1000) e ERK total e ERK fosforilado (Cell Signalling 1:1000). Depois, cada membrana foi lavada com TTBS por 3 vezes, com duração de 10 min cada lavagem. As membranas foram incubadas com anticorpos secundários (1:2000, anti-rabbit, Cell Signalling) durante 2 h a temperatura ambiente. Após serem incubadas com o anticorpo secundário, as membranas foram lavadas novamente com TTBS. Cada lavagem teve duração de 10 min. Antes de revelar as membranas em filme auto-radiográfico, estas foram incubadas com peroxidase conjugada por 5 min a temperatura ambiente e a quimiluminescência foi mostrada pela revelação em filme auto-radiográfico. A análise densitométrica dos filmes foi realizada com o auxílio do software Opti-Quant<sup>®</sup>. Toda a técnica realizada nestes experimentos foi baseada na metodologia usada por Cammarota et al, 1998.

### III. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa Excel para Windows<sup>®</sup> e Prism version 4 (GraphPad Software<sup>®</sup>, San Diego, CA). Inicialmente foi testada a normalidade dos dados; posterior a essa análise, foi adotado um teste estatístico paramétrico ou não-paramétrico (especificamente descrito nos resultados) conforme os dados observados com a análise da curva de normalidade. O nível mínimo de significância considerado em todas as análises foi de  $p < 0,05$ .

#### IV. RESULTADOS

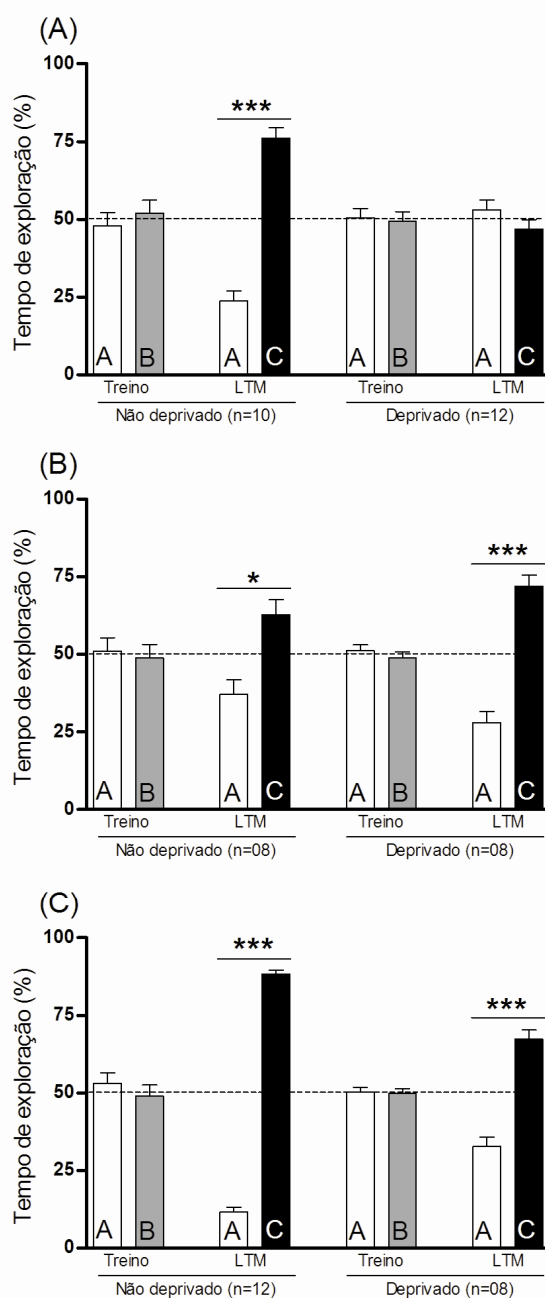
##### **Efeitos da privação materna neonatal na tarefa de reconhecimento de objetos.**

Os ratos foram treinados (dia 1) na tarefa de reconhecimento de objetos e testados 24 horas após o treino (dia2).

De acordo com a Figura 8 (A), nos animais controles não privados, observamos uma significativa redução no percentual do tempo total de exploração do objeto familiar em relação ao tempo gasto explorando o objeto novo na sessão de teste ( $P < 0,001$ ;  $t_{[09]} = 8,05$ ). Este efeito não foi visto quando analisamos os ratos controles privados (figura 8 - A), os quais mostraram um percentual igual de exploração entre o objeto familiar e novo na sessão de teste ( $P = 0,32$ ;  $t_{[11]} = 1,22$ ), indicando, portanto uma redução na LTM.

Verificamos, entretanto que este efeito amnésico pode ser revertido após a administração oral de donepezil (1mg/kg) ( $P < 0,001$ ;  $t_{[7]} = 6,12$ ) (figura 8 - B) ou galantamina (1mg/kg) ( $P < 0,001$ ;  $t_{[7]} = 5,74$ ) (figura 8 - C) 30 min antes da sessão do treino.



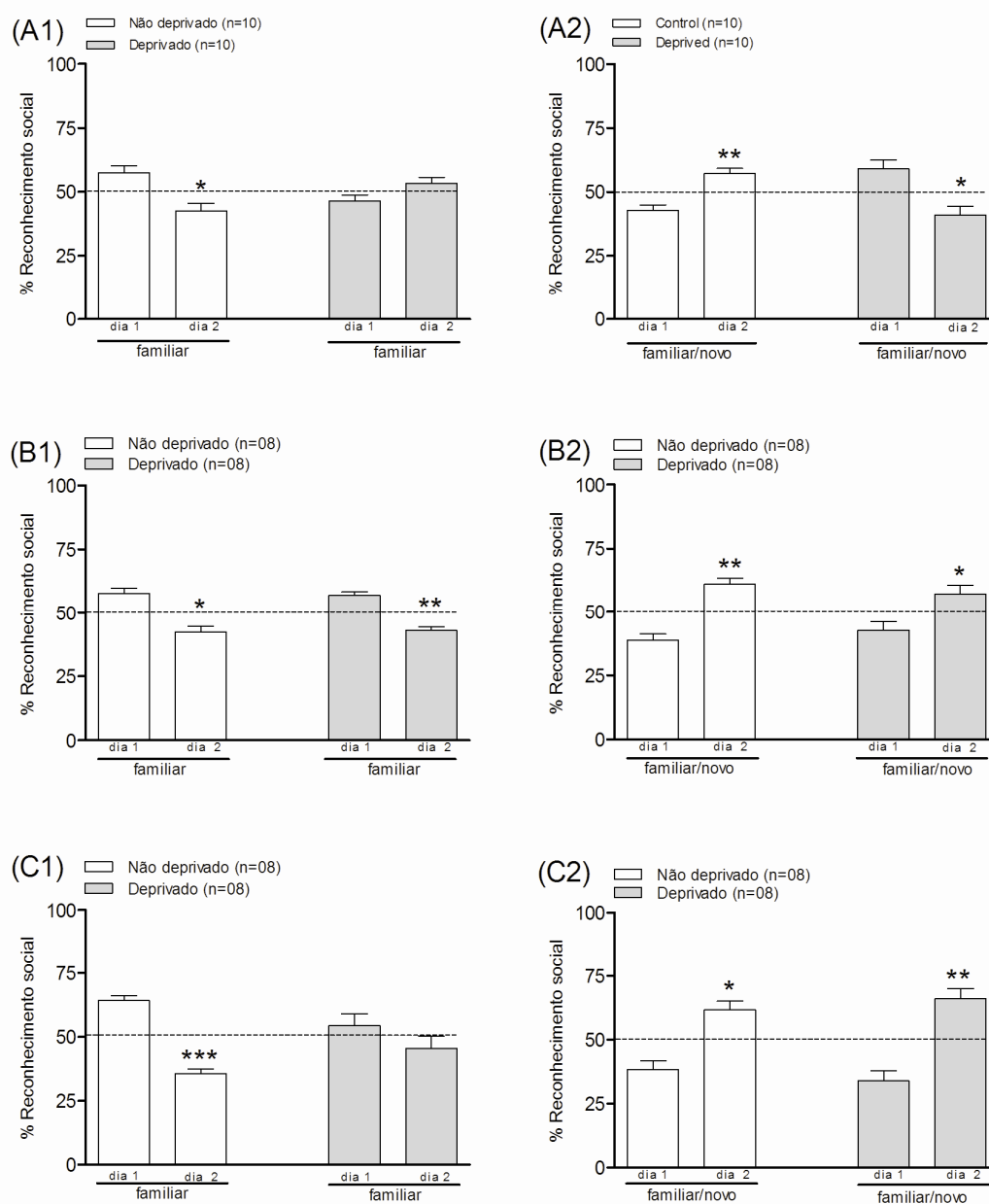


**Figura 8. Efeitos da deprivação materna neonatal na memória de longa duração de ratos adultos na tarefa de reconhecimento de objetos.** Os ratos receberam 1mg/kg de veículo (A), 1 mg/kg de donepezil (B) ou 1 mg/kg de galantamina (C), 30 minutos antes da sessão de treino. Os ratos foram colocados no campo aberto contendo dois objetos diferentes (A + B) e permaneceram por 5 minutos para explorar livremente. Os resultados apresentados são as diferenças do percentual do tempo gasto explorando cada objeto. Em todos os casos, na sessão de treino não houve diferenças no percentual do tempo gasto explorando os objetos A e B. Quando os animais foram submetidos à sessão de teste com um novo objeto C, os ratos deprivados da mãe não mostraram preferência por explorar o objeto novo, ao contrário dos não deprivados (A). No entanto, os animais deprivados mostraram preferência pelo objeto novo, quando foram tratados com donepezil (B) e galantamina (C). Os resultados foram expressos pela média ( $\pm$ EM) do percentual da exploração total em cada caso. O número de animais por grupo é mostrado embaixo de cada gráfico; o nível de significância adotado foi  $p < 0,05$ . \* $p < 0,02$ , \*\*\* $p < 0,001$  e o teste utilizado foi o teste t de Student.

## **Efeitos da privação materna neonatal na tarefa de reconhecimento social.**

Ratos controles não privados reconheceram o rato juvenil familiar quando foram re-expostos a ele no dia do teste ( $P < 0,05$ ;  $t_{[9]} = 2.60$ ), diminuindo o percentual de investigação, de acordo com a figura 9 (A1). Além disso, quando os ratos controles não privados são expostos a um novo juvenil no dia do teste (dia 2), eles aumentam o percentual de investigação ( $P < 0,01$ ;  $t_{[9]} = 3.36$ ), conforme figura 9 (A2). O mesmo não ocorreu com os animais privados. Ratos privados (figura 9 – A1) não reconheceram os juvenis familiares e o percentual de investigação nos dias 1 e 2 foram iguais ( $P > 0,05$ ;  $t_{[9]} = 1.52$ ). Além disso, quando os ratos privados foram testados (figura 9 - A2) na presença de um novo juvenil no dia do teste (dia 2), estes mostraram uma diminuição no percentual de investigação social ( $P < 0,05$ ;  $t_{[9]} = 2.65$ ).

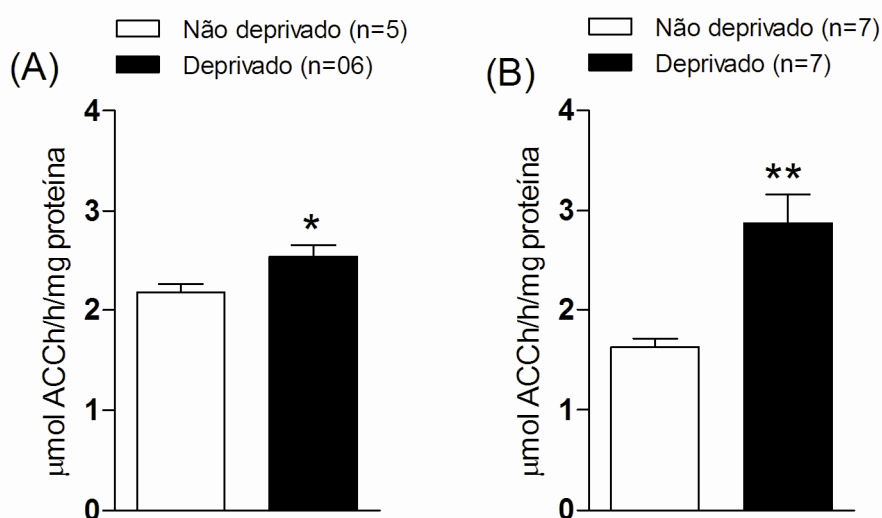
O donepezil (1mg/kg) administrado 30 min antes da sessão de treino no dia 1 foi capaz de reverter o déficit cognitivo visto nos ratos privados. Na figura 9 (B1), os ratos privados que receberam uma dose oral de donepezil, quando foram testados na presença do mesmo juvenil (familiar) apresentaram uma diminuição no percentual de investigação social ( $P < 0,001$ ;  $t_{[7]} = 4.83$ ). Na figura 9 (B2) observamos o oposto, quando foram expostos a um novo juvenil aumentaram o percentual de investigação ( $P < 0,05$ ;  $t_{[7]} = 3.29$ ). A galantamina (1mg/kg) administrada 30 min antes da sessão de treino no dia 1 foi capaz de reverter o déficit cognitivo em ratos privados somente quando foram expostos a um novo juvenil no dia 2 (figura 9 – C2), ( $P < 0,004$ ;  $t_{[7]} = 4,20$ ).



**Figura 9. Efeito da deprivação materna neonatal e do tratamento com donepezil e galantamina na tarefa de reconhecimento social.** No dia 1 (treino), um rato macho, juvenil com 20-25 dias de idade foi colocado dentro da caixa do rato macho adulto durante 30 minutos. No dia 2, o mesmo juvenil (familiar) foi recolocado na caixa (A1, B1, C1) ou um outro macho juvenil (novo) foi colocado na caixa com o macho adulto (A2, B2, C2). Em todos os casos, os ratos não deprivados (colunas brancas) reduziram o percentual de investigação social para o juvenil familiar no dia 2 (A1, B1, C1) e aumentaram o percentual de investigação do novo juvenil no dia 2 (A2, B2, C2). Esses efeitos não foram vistos em ratos deprivados tratados com salina (A1 e A2, colunas cinza), mas foram vistos em ratos tratados com donepezil (B2) ou galantamina (C2). As doses utilizadas foram as mesmas citadas na figura 8. Dados foram expressos pela média  $\pm$  (EM) do percentual do tempo total de investigação. O nível de significância aceito foi \*  $p < 0,02$ , \*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*  $p < 0,001$  no teste t de Student.

## Efeito da deprivação materna neonatal na atividade da acetilcolinesterase no hipocampo e no neocórtex.

De acordo com a figura 10, os animais que foram submetidos à deprivação materna no período neonatal apresentaram atividade aumentada da enzima AchE em níveis basais quando analisados na idade adulta. Em (A) mostramos a atividade aumentada desta enzima no hipocampo ( $P < 0,05$ ;  $t_{[9]} = 2.45$ ) e em (B) mostramos a atividade aumentada desta enzima no córtex perirrinal (como amostra de uma região fisiologicamente vinculada do neocórtex) ( $P < 0,005$ ;  $t_{[12]} = 4.22$ ).



**Figura 10. Efeitos da deprivação materna neonatal na atividade da acetilcolinesterase cerebral em ratos machos adultos.** Os ratos deprivados foram comparados com ratos não deprivados em níveis basais. A atividade desta enzima foi dosada no hipocampo (A) e no córtex perirrinal (B). Os resultados foram expressos pela média  $\pm$  (EM) da quantidade em  $\mu\text{mol}$  de acetilcolina consumida por hora por mg de proteína ( $\mu\text{mol Ach / h / mg proteina}$ ) em ratos não deprivados e deprivados. O número de animais por grupo está expresso no gráfico. O nível de significância aceito foi de  $p < 0,05$ . \*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$  para o teste t de Student.

**A privação materna neonatal não afeta a atividade exploratória e a ansiedade nos animais testados na memória de reconhecimento de objetos.**

Antes de realizarmos os experimentos na tarefa do reconhecimento de objetos, todos os animais dos grupos experimentais não privados e privados foram testados no campo aberto, como parâmetro comportamental para mensurar a atividade exploratória (tabela 3). Os animais foram observados pelo experimentador em dois dias consecutivos. Os comportamentos analisados estão mostrados na tabela 3. Os dados foram expressos pela média ( $\pm$  EM). A análise estatística mostrou que não houve diferenças significativas entre os dois grupos em todos os comportamentos analisados. Dados foram analisados pelo teste t de Student para  $p < 0,05$ .

**Tabela 3. A privação materna neonatal não afeta a atividade exploratória nos machos testados na idade adulta na tarefa do reconhecimento de objetos.**

Comportamentos	Dia 1		Dia 2	
	Não privado (n=10)	Privado (n=12)	Não privado (n=10)	Privado n=12)
Locomoção total	84.1 $\pm$ 12.50	68.2 $\pm$ 10.20	45.60 $\pm$ 6.89	43.58 $\pm$ 4.52
Cruzamentos	57.30 $\pm$ 7.76	54.42 $\pm$ 5.82	41.50 $\pm$ 5.58	39.33 $\pm$ 5.86
Rearings	23.80 $\pm$ 2.41	20.08 $\pm$ 3.14	15.73 $\pm$ 2.63	13.25 $\pm$ 2.00

Os resultados mostram que não houve diferenças significativas na atividade exploratória entre os dois grupos experimentais em todos os parâmetros comportamentais analisados. O número de animais por grupo está expresso na tabela, assim como os comportamentos analisados. Os resultados foram expressos pela média  $\pm$  (EM) e analisados pelo teste t de Student,  $p < 0.05$ .

Os animais também foram testados no labirinto em cruz elevado (tabela 4), com o objetivo de verificar o nível de ansiedade. Os animais foram testados durante 5 minutos. Os dados foram expressos pela média  $\pm$  (EM) e analisados através do teste t de Student para  $p < 0,05$  de significância. A análise estatística não apresentou diferenças significativas entre os dois grupos comportamentais analisados.

**Tabela 4. A deprivação materna neonatal não afeta a ansiedade nos machos testados na idade adulta na tarefa do reconhecimento de objetos.**

<b>Comportamentos</b>	<b>Não deprivado (n=10)</b>	<b>Deprivado (n=12)</b>
Tempos nos braços abertos	105.8 $\pm$ 21.89	91.25 $\pm$ 24.84
Tempos nos braços fechados	182.9 $\pm$ 24.96	191.0 $\pm$ 25.33
Entradas nos braços abertos	5.40 $\pm$ 1.50	6.08 $\pm$ 1.17
Entradas nos braços fechados	4.80 $\pm$ 0.72	4.58 $\pm$ 0.89
Olhar para baixo	10.30 $\pm$ 2.62	11.67 $\pm$ 2.50

Não houve diferenças significativas na ansiedade entre ratos não deprivados e deprivados. O número de animais por grupo está expresso na tabela, assim como os comportamentos analisados. Os resultados foram expressos pela média  $\pm$  (EM) e analisados pelo teste t de Student,  $p < 0,05$ .

#### **A deprivação materna neonatal não afeta a atividade exploratória e a ansiedade nos animais testados na esquiiva inibitória.**

Os animais foram testados no campo aberto e no labirinto em cruz elevado para verificar a atividade exploratória e o nível de ansiedade nos nossos grupos experimentais estudados.

No teste do campo aberto (tabela 5), os animais foram observados pelo experimentador por dois dias consecutivos durante 5 minutos em cada sessão de teste. Os dados foram expressos pela média  $\pm$  (EM). A análise estatística mostrou que não houve diferenças significativas entre os dois grupos em todos os comportamentos analisados. Dados foram analisados pelo teste t de Student para  $p < 0,05$ .

**Tabela 5. A deprivação materna neonatal não afeta a atividade exploratória nos machos testados na idade adulta na esquiiva inibitória.**

Comportamentos	Dia 1		Dia 2	
	Não deprivado (n=10)	Deprivado (n=12)	Não deprivado (n=10)	Deprivado n=12)
Locomoção total	60,3 $\pm$ 7,88	62,58 $\pm$ 9,02	56,10 $\pm$ 5,45	49,58 $\pm$ 7,54
Cruzamentos	52,30 $\pm$ 5,58	58,92 $\pm$ 4,35	52,0 $\pm$ 4,87	52,50 $\pm$ 6,38
Rearings	31,0 $\pm$ 7,52	22,45 $\pm$ 3,2	19,0 $\pm$ 3,18	16,55 $\pm$ 2,1

Os resultados mostram que não houve diferenças significativas na atividade exploratória entre os dois grupos experimentais em todos os parâmetros comportamentais analisados. Os animais foram manipulados pelo experimentador durante 4 dias consecutivos durante 5 minutos para cada sessão antes de serem testados no campo aberto. O número de animais por grupo e os comportamentos analisados estão descritos na tabela. Os resultados foram expressos pela média  $\pm$  (EM) e analisados pelo teste t de Student,  $p < 0,05$ .

Os mesmos animais também foram testados no labirinto em cruz elevado (tabela 6), com o objetivo de verificar a ansiedade. Os animais também foram analisados durante 5 minutos. Os dados foram expressos pela média  $\pm$  (EM) e analisados através do teste t de Student para  $p < 0,05$  de significância. A

análise estatística não apresentou diferenças significativas entre os dois grupos experimentais analisados.

**Tabela 6. A deprivação materna neonatal não afeta a ansiedade nos machos testados na idade adulta na esQUIVA inibitória.**

Comportamentos	Não deprivado (n=10)	Deprivado (n=12)
Tempo nos braços abertos	93,70 ± 25,45	92,83 ± 24,59
Tempo nos braços fechados	134 ± 30,45	185,7 ± 23,80
Entradas nos braços abertos	5,66 ± 1,65	6,54 ± 1,17
Entradas nos braços fechados	5,00 ± 0,78	4,81 ± 0,94
Olhar para baixo	9,1 ± 2,81	11,67 ± 2,50

Não houve diferenças significativas na ansiedade entre ratos não deprivados e deprivados. O número de animais por grupo está expresso na tabela, assim como os comportamentos analisados. Os resultados foram expressos pela média ± (EM) e analisados pelo teste t de Student,  $p < 0,05$ .

### **A deprivação materna neonatal afeta a consolidação da STM e da LTM em ratos deprivados testados na esQUIVA inibitória.**

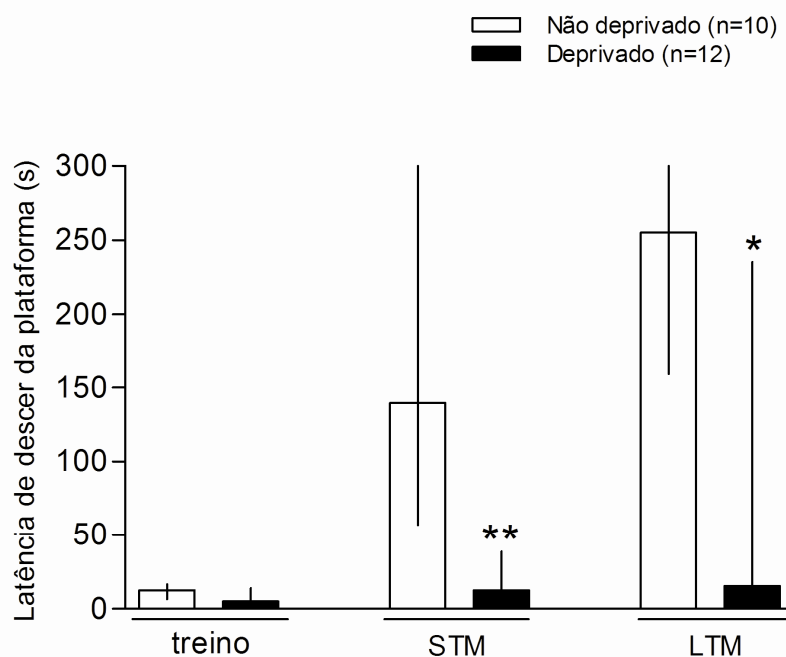
Os resultados da figura 11 foram apresentados pela mediana e intervalo interquartil.

Na sessão de treino, não houve diferenças significativas entre animais não deprivados [12,5 (6,5/16,5)] e deprivados [5 (3,25/14)],  $p=0,24$ . No entanto, duas horas após a sessão do treino na STM, os animais deprivados apresentaram déficits cognitivos. A latência para descer da plataforma com as quatro patas foi significativamente menor nos animais deprivados [12,5



(7,25/38,25)] em comparação aos não deprivados [139,5 (56,75/300)],  $p < 0,005$ .

Da mesma forma, quando os animais foram testados na LTM (24 horas após a sessão de treino), ratos deprivados [15,5 (9,0/235,3)] novamente apresentaram déficits cognitivos quando comparados com os ratos não deprivados [255 (159,3/300)],  $p < 0,05$ .



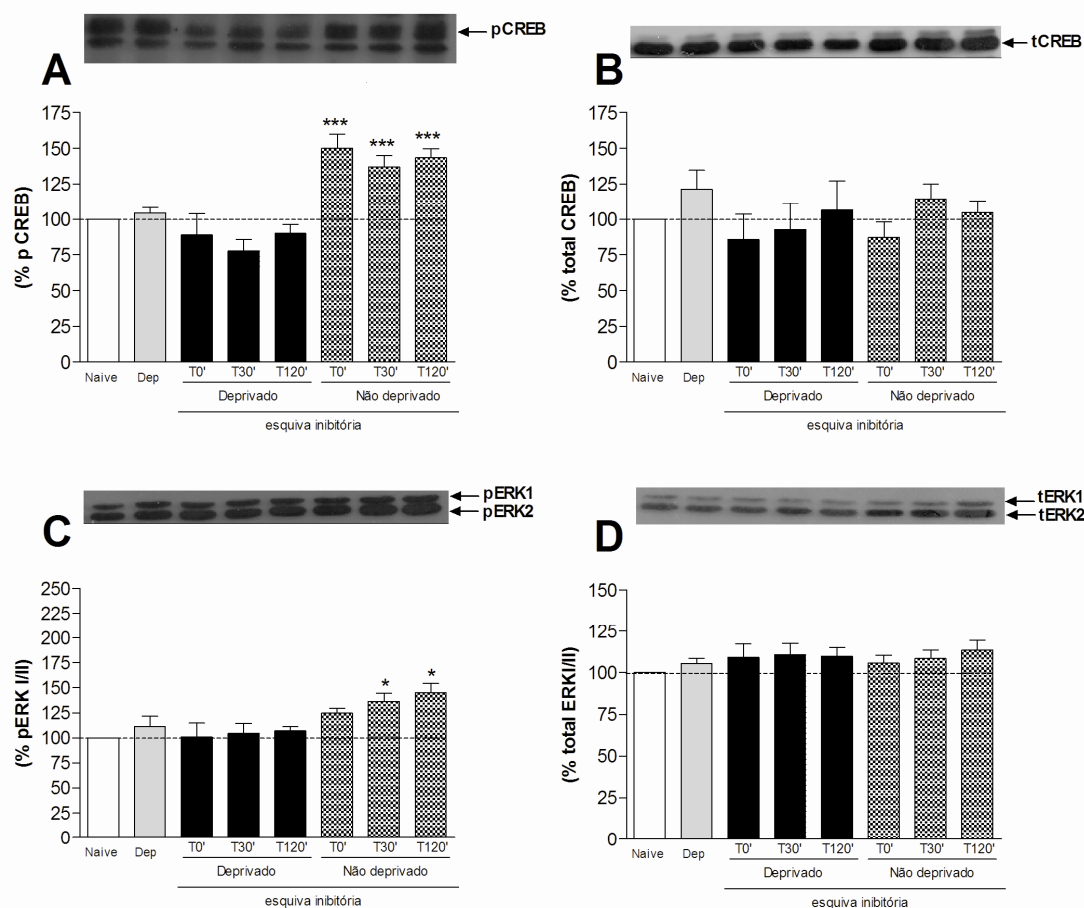
**Figura 11. A deprivação materna causa déficits cognitivos nas memórias de curta e de longa duração em ratos machos adultos testados na esquiwa inibitória.** Para a sessão de treino os animais foram gentilmente colocados na plataforma com o focinho voltado para a parede. A sessão de treino consistia em dar um choque de 0.4 mA por 2s quando o animal descia da plataforma com as quatro patas. Todos os animais foram treinados uma única vez. Ratos deprivados e não deprivados foram testados na idade adulta 2 horas (STM) e 24 horas (LTM) após a sessão de treino. Imediatamente após o treino os animais foram retirados da caixa de esquiwa e colocados na caixa-moradia onde permaneceram até o momento dos testes. Os dados foram expressos pela mediana ( $\pm$  intervalo interquartil). O número de animais foi apresentado junto com os grupos experimentais. O teste estatístico utilizado foi Mann-Whitney para  $p < 0,05$  de significância. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$ .

**Efeitos neuroquímicos hipocampais no processo de consolidação da memória em ratos treinados na esQUIVA inibitória que foram privados da mãe no período neonatal.**

Nós verificamos (figura 11) que ratos privados tiveram déficits cognitivos na STM e na LTM na esQUIVA inibitória. Sabendo que a ativação de proteínas cinases é importante no processo de consolidação da memória, nós decidimos verificar a fosforilação do fator de transcrição CREB e da proteína cinase ERK em animais que foram treinados nesta tarefa e decapitados imediatamente (T0), 30 (T30) ou 120 (T120) min após o treino. Os dados apresentados foram expressos pela média  $\pm$  (EM) do percentual de fosforilação ou do conteúdo total das proteínas em relação ao grupo naive, considerado amostra de referência (100%). O teste estatístico usado foi ANOVA de uma vista seguida pelo teste de Bonferroni.

Na figura 12 (A) pode-se observar que somente ratos não privados que foram treinados na esQUIVA tiveram aumento significativo na fosforilação de CREB em relação aos demais grupos [ $F_{(7,29)} = 12,54$ ;  $p < 0,0001$ ]. Na figura 12 (B), em relação ao CREB total, não houve diferenças significativas entre os grupos [ $F_{(7,29)} = 0,03$ ;  $p > 0,05$ ]. Ao analisarmos a fosforilação de ERK (figura 12C), observa-se que 30 e 120 minutos após o treino (T30 e T120), respectivamente, somente os ratos não privados treinados na esQUIVA inibitória apresentaram um aumento na pERK1/2 em relação aos demais grupos analisados [ $F_{(7,32)} = 3,99$ ;  $p < 0,005$ ]. Não houve diferenças estatísticas

entre os grupos quanto ao nível de ERK total [ $F_{(7,32)} = 0,55$ ;  $p > 0,05$ ], (figura 12D).



**Figura 12. O treino na esquila inibitória não induz um aumento na fosforilação de CREB e ERK 1/2 em ratos deprivados.** Na parte superior de cada gráfico as setas indicam onde estão as proteínas para cada "imunoblot". Cada gráfico representa a análise densitométrica das proteínas analisadas. Os animais foram treinados na esquila inibitória e decapitados imediatamente (T0), 30 (T30) ou 120 (T120) minutos após a sessão do treino e comparados aos grupos naive e deprivados não treinados (depr). Em A, a análise densitométrica para o CREB fosforilado mostrou que somente ratos não deprivados que foram treinados na esquila apresentaram aumento na fosforilação de CREB em todos os tempos analisados. A quantidade de CREB total não está alterada (B). Da mesma forma, em (C) a análise densitométrica da proteína ERK1/2 mostrou que somente ratos não deprivados treinados apresentaram aumento na fosforilação desta proteína 30 e 120 minutos após a sessão de treino em relação aos demais grupos analisados. A quantidade de ERK total (D) permaneceu inalterada. Os dados foram expressos pelo percentual da média  $\pm$  (EM) da densitometria óptica por unidades arbitrárias para cada grupo em diferentes tempos em comparação ao grupo naive. O número de animais de cada grupo foi de  $n=5$ . Os resultados foram estatisticamente analisados por ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Bonferroni com  $p < 0,05$  de significância. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

## **Efeito da deprivação materna neonatal na consolidação da memória espacial no LAM.**

Os resultados na figura 13 foram apresentados pela média  $\pm$  (EM) do percentual de aumento na produção de proteínas em relação ao naive. Os dados da figura 13 (A) foram analisados através da ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni. Para os demais dados da figura, os dados foram também expressos pela média  $\pm$  (EM) e analisados pelo teste t de Student.

A curva representada na figura 13 (A) é utilizada como indicador para avaliar se os animais aprenderam ou não à tarefa. O parâmetro utilizado nesta curva foi à latência que o animal apresentou para localizar a plataforma submersa na piscina. Quanto menor a latência para nadar até a plataforma, melhor é o aprendizado espacial subjacente.

De acordo com os dados da figura 13 (A), houve diferenças significativas entre os dias [ $F_{(4,110)} = 31,96$ ;  $p < 0,0001$ ] tanto para ratos não deprivados quanto para os deprivados, mostrando, portanto que os dois grupos aprenderam a localizar a plataforma. Na medida em que passam os dias de treinamento, embora ratos deprivados tenham apresentado uma latência maior para encontrar a plataforma nos dias 2 e 3 [ $F_{(4,110)} = 11,19$ ;  $p < 0,001$ ], no dia 5 os dois grupos apresentaram latências semelhantes para encontrar a plataforma submersa. Não houve interação entre dias vs. grupos [ $F_{(1,4)} = 0,93$ ;  $p > 0,05$ ].

No sexto dia a plataforma submersa foi retirada e o teste foi realizado. A figura 13 (B) mostra que não houve diferenças significativas no desempenho

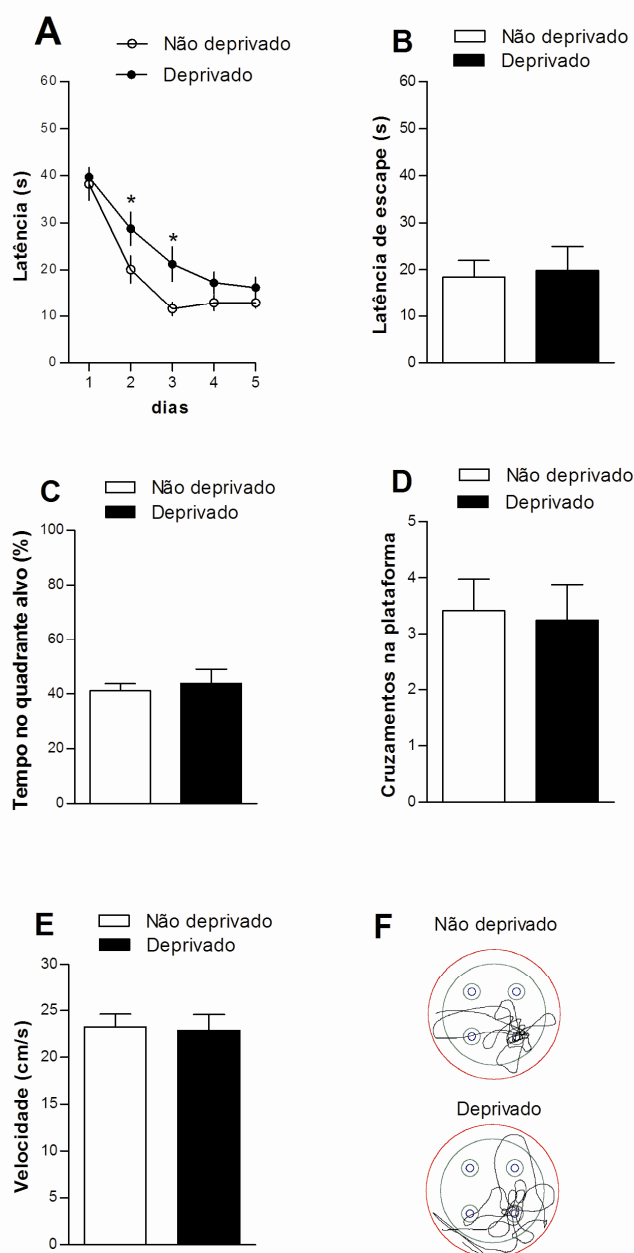
entre não deprivados ( $18,48 \pm 3,46$ ) e deprivados ( $19,88 \pm 5,06$ );  $p > 0,05$ ,  $t_{(11)} = 0,22$  na latência de escape para nadar no quadrante onde estava a plataforma nos cinco dias de treinamento.

O percentual de tempo no quadrante alvo (s) mostrado na figura 13 (C) também não difere entre os animais não deprivados ( $24,69 \pm 1,56$ ) e deprivados ( $27,15 \pm 3,40$ );  $p > 0,05$ ,  $t_{(11)} = 0,65$ .

De acordo com a figura 13 (D) o número de cruzamentos no local da plataforma também não difere significativamente entre ratos não deprivados ( $3,41 \pm 0,55$ ) e deprivados ( $3,25 \pm 0,62$ );  $p < 0,05$ ,  $t_{(11)} = 0,19$ .

Para mensurarmos a atividade exploratória utilizamos como parâmetro a velocidade (cm/s) com que os animais nadavam durante a sessão de teste. De acordo com a figura 13 (E), não houve diferenças significativas na velocidade entre ratos não deprivados ( $23,22 \pm 1,37$ ) e deprivados ( $22,84 \pm 1,69$ );  $t_{(11)} = 0,16$ ,  $p < 0,05$ .

Em F, temos a representação esquemática do trajeto realizado pelos animais não deprivados vs. deprivados durante os 60 segundos na sessão de teste.



**Figura 13. A deprivação materna neonatal não afeta a consolidação da memória espacial em ratos deprivados.** A curva de aprendizado (A) mostra a média, em segundos da latência para encontrar a plataforma submersa durante os cinco dias de treino na tarefa. No sexto dia, a plataforma submersa foi retirada e o teste com duração de 60 segundos foi realizado. Em (B) é mostrada a média da latência de escape para o local da plataforma, em (C) o percentual do tempo no quadrante alvo, e em (D) o número de cruzamentos sobre a região da plataforma, na sessão de teste. A locomoção dos animais foi mensurada através da velocidade (E) que os animais nadavam durante a sessão do teste. Em (F) a representação esquemática do trajeto realizado pelos animais durante o teste na direção da região onde estava a plataforma submersa. Os resultados foram estatisticamente analisados por ANOVA de duas vias de medidas repetidas, seguido do pós-teste de Bonferroni para a curva de aprendizado (A). Para os demais testes apresentados na figura foi utilizado o teste t de Student, com  $n=12$  animais por grupo. O índice de significância estatístico aceito foi  $p<0,05$ .

Os resultados na figura 14 também foram apresentados pela média  $\pm$  (EM). Os dados da figura 14 (A) foram analisados através da ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni. Para os demais dados da figura, os dados foram também expressos pela média  $\pm$  (EM) e analisados pelo teste t de Student.

O aprendizado reverso foi realizado no dia 7. A plataforma submersa foi colocada no quadrante oposto ao original, o qual chamamos de quadrante reverso. A curva do aprendizado reverso (figura 14 – A) mostra que houve diferenças significativas entre as sessões de treino [ $F_{(7,178)} = 12,99$ ;  $p < 0,0001$ ] para os dois grupos. Não houve interação entre treinos vs. grupos [ $F_{(1,7)} = 0,30$ ;  $p > 0,05$ ].

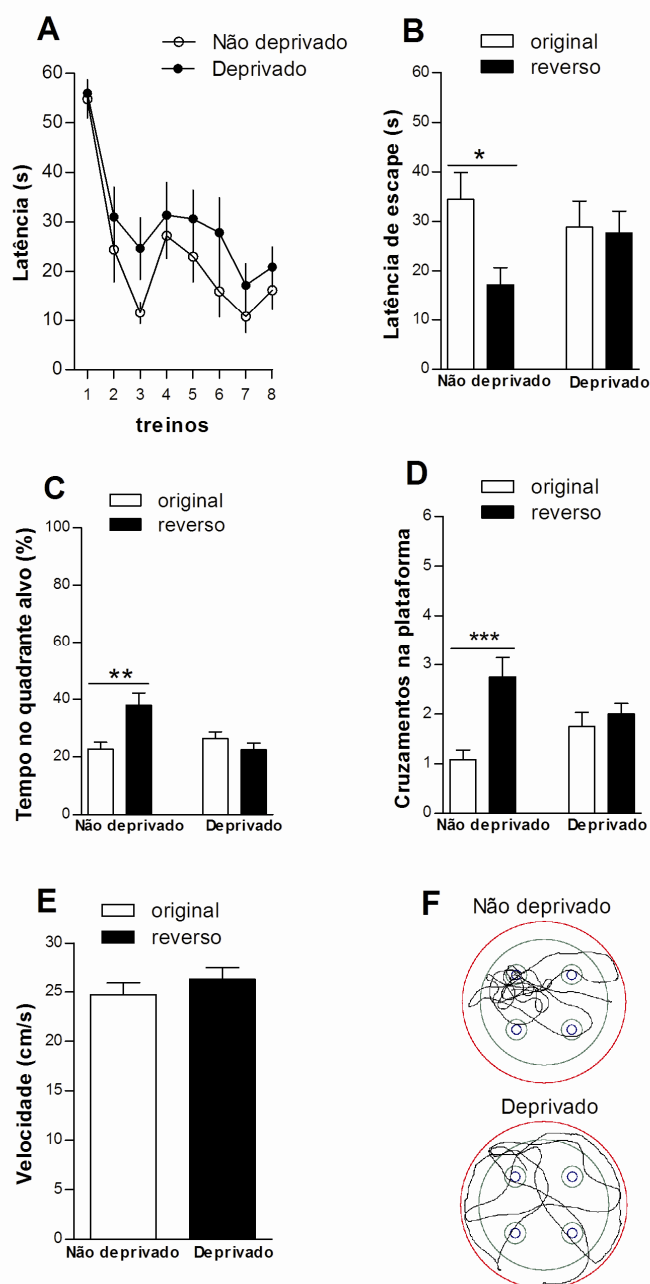
No oitavo dia, os animais foram submetidos a sessão do teste, sem a presença da plataforma submersa. A figura 14 (B) mostra que os ratos não deprivados apresentaram uma latência de escape menor para o local da plataforma no quadrante reverso ( $17,22 \pm 3,49$ ) do que para o local da plataforma no quadrante original ( $34,45 \pm 5,38$ );  $p < 0,05$   $t_{(11)} = 2,68$ . Nos ratos deprivados as latências de escape para os locais da plataforma nos quadrantes original ( $28,83 \pm 5,28$ ) e reverso ( $27,72 \pm 4,33$ ) foram iguais,  $p > 0,05$   $t_{(11)} = 0,16$ . Já a figura 14 (C) mostra que, na sessão de teste, somente os ratos não deprivados mostraram-se capazes de recordar onde estava a plataforma no quadrante reverso ( $37,95 \pm 4,26$ ) em relação ao quadrante original ( $22,77 \pm 2,35$ );  $p < 0,01$   $t_{(11)} = 3,11$ . Ratos deprivados apresentaram percentuais de tempos semelhantes, e próximos ao valor esperado pela probabilidade (25%) entre o quadrante reverso ( $22,50 \pm 2,31$ ) e original ( $26,44 \pm 2,25$ );  $p > 0,05$   $t_{(11)} = 1,21$ .

Ratos não submetidos à deprivação materna neonatal apresentaram um número maior de cruzamentos (figura 14-D) sobre a região da plataforma do quadrante reverso ( $2,75 \pm 0,39$ ) do que a região equivalente no quadrante original ( $1,0 \pm 0,19$ );  $p < 0,0001$   $t_{(11)} = 3,81$ . Ratos deprivados não diferiram dos controles no que diz respeito ao número de cruzamentos sobre a região da plataforma no quadrante no reverso ( $2,0 \pm 0,21$ ) ou no original ( $1,75 \pm 0,27$ );  $p < 0,05$ ,  $t_{(11)} = 0,71$ .

De acordo com a figura 14 (E), não houve diferenças significativas na velocidade entre ratos não deprivados ( $24,69 \pm 1,20$ ) e deprivados ( $26,33 \pm 1,19$ );  $t_{(11)} = 0,96$ ,  $p > 0,05$  durante a sessão do teste.

Na mesma figura, em F temos a representação esquemática do trajeto realizado pelos animais não deprivados vs. deprivados durante os 60 segundos na sessão de teste.



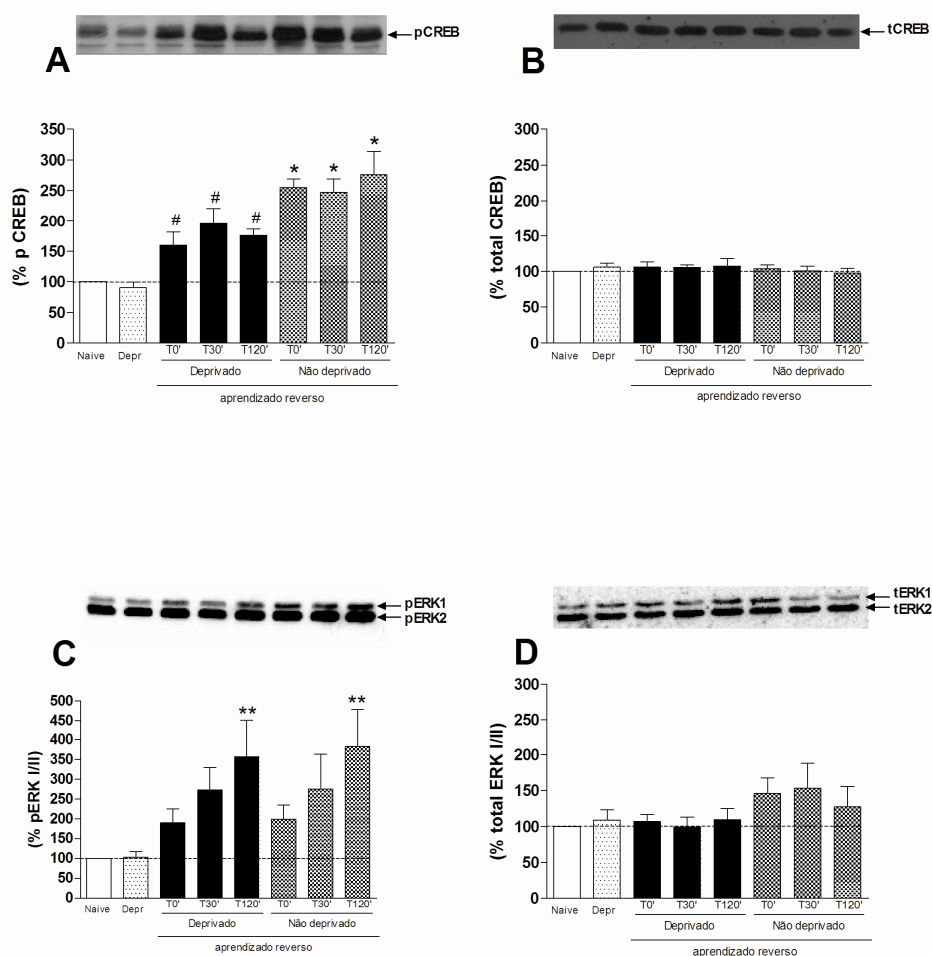


**Figura 14. A deprivação materna no período neonatal afeta a retenção do aprendizado reverso da memória espacial.** A curva de aprendizado em A, mostra a média, em segundos, da latência para encontrar a plataforma submersa durante as oito sessões de treino no aprendizado reverso. No sétimo dia, a plataforma submersa localizada no quadrante oposto ao quadrante original foi retirada da piscina e o teste com duração de 60 segundos foi realizado. Em B, tem-se a média da latência de escape para encontrar a plataforma no quadrante original vs. reverso para cada grupo (não-deprivado vs. deprivado). Em (C), o percentual do tempo gasto dentro dos quadrantes alvo e reverso durante a sessão de teste. Em (D), tem-se o número de cruzamentos sobre os locais correspondentes à plataforma original e à reversa para cada grupo. A locomoção dos animais foi mensurada através da velocidade (E) que os animais nadaram durante a sessão do teste. Em (F) a representação esquemática do trajeto realizado pelos animais durante o teste. O número de animais de cada grupo foi de 12. Os resultados foram estatisticamente analisados por ANOVA de duas vias de medidas repetidas, seguido do pós-teste de Bonferroni para a curva de aprendizado (A). Para os demais testes foi utilizado o teste t de Student. O índice de significância estatístico aceito foi \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

**Efeitos de variáveis neuroquímicas vinculadas à consolidação de memória no hipocampo em ratos treinados no LAM e que foram privados da mãe no período neonatal.**

Os resultados na figura 15 estão expressos como médias  $\pm$  (EM) do percentual de aumento na produção de proteínas em relação aos naive (controles) e foram analisados através da ANOVA de uma via, seguido do teste de Bonferroni.

De acordo com a figura 15 (A), houve aumento na fosforilação de CREB em ratos privados e não privados [ $F(3,7) = 13,71$ ;  $p < 0,0001$ ], que foram treinados no LAM, em relação aos grupos naive e privados. A densitometria óptica mostra que houve aumento na fosforilação do CREB do grupo privado treinado [ $F(4,20) = 4,95$ ;  $p < 0,05$ ] em todos os tempos em relação aos grupos naive e privados. Da mesma forma, houve aumento na fosforilação do CREB do grupo não privado treinado [ $F(4,20) = 3,89$ ;  $p < 0,05$ ] em todos os tempos analisados após a sessão de treino. Quando comparados somente os grupos que foram treinados, a fosforilação de CREB nos ratos não privados foi ainda maior em relação aos ratos do grupo privados [ $F(5,23) = 5,09$ ;  $p < 0,05$ ].



**Figura 15. Efeitos do treino no labirinto aquático de Morris na fosforilação de CREB e ERK 1/2 em ratos não deprivados e deprivados da mãe no período neonatal.** Na parte superior de cada gráfico as setas indicam onde estão as proteínas para cada "imunoblot". Cada gráfico representa a análise densitométrica das proteínas analisadas. Os animais (não deprivados x deprivados) foram treinados no labirinto aquático de Morris, decapitados imediatamente (T0), 30 (T30) ou 120 (T120) minutos após a última sessão do treino e comparados ao grupo naive. Naive e deprivados não treinados (depr) não diferem entre si. A análise densitométrica para o CREB fosforilado indica que ratos treinados (deprivados e não deprivados) tiveram um aumento significativo na fosforilação de CREB em relação aos grupos naive. No entanto, o grupo não deprivado treinado no aprendizado reverso apresentou uma maior fosforilação de CREB em relação aos demais grupos analisados (A). Não houve diferenças significativas na análise densitométrica para o CREB total em todos os grupos analisados (B). Em (C) a análise densitométrica da proteína ERK1/2 mostrou que 2 horas após a sessão de treino no aprendizado reverso, tanto ratos deprivados quanto não deprivados tiveram um aumento significativo na fosforilação de ERK1/2 em comparação aos demais grupos analisados. A densidade óptica para a ERK total (D) mostra que o conteúdo desta proteína permaneceu inalterado. Os dados foram expressos pelo percentual da média  $\pm$  (EM) da densitometria óptica por unidades arbitrárias para cada grupo em diferentes tempos em comparação ao grupo naive (controle experimental usado como referência). O número de animais de cada grupo foi de  $n=5$ . Os resultados foram estatisticamente analisados por ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Bonferonni para  $p<0,05$  de significância. Em A, \* $p<0,001$ ; #  $p<0,001$  em relação ao naive; em C, \*\* $p<0,001$  em relação ao naive.

A análise estatística da figura 15 (B) mostra que não houve diferenças significativas no conteúdo do CREB total entre todos os grupos analisados [ $F(7,32) = 0,29$ ;  $p > 0,05$ ].

A figura 15 (C) mostra que duas horas (T120) após a sessão de treino tanto os ratos privados quanto os não privados aumentaram significativamente a fosforilação da ERK1/2 [ $F(7,28) = 5$ ;  $p < 0,001$ ] em relação aos demais grupos. Na figura 12 – D, a análise entre os grupos não privados e privados treinados mostrou que não houve diferenças estatísticas entre os grupos quanto a quantidade de ERK total [ $F(7,32) = 0,55$ ;  $p > 0,05$ ].

## V. DISCUSSÃO

Consistente com estudos prévios realizados com aprendizado espacial (Huang et al., 2002; Lai et al., 2006; Aisa et al., 2007), aprendizado na esquiwa ativa, medo condicionado (Lehmann et al., 1999) e aprendizado social (Lévy et al., 2003), nós observamos que a deprivação materna no período neonatal induz déficits cognitivos que se expressam depois ao longo da vida. Estes dados suportam as evidências de que intervenções na relação mãe-filhote durante o período de desenvolvimento do sistema nervoso são cruciais para os processos de memória.

Ratos machos adultos privados de suas mães nos primeiros 10 dias de vida mostraram déficits cognitivos na memória de reconhecimento de objetos, na memória de reconhecimento social, na esquiwa inibitória e no labirinto aquático de Morris. Em relação aos resultados encontrados na memória de reconhecimento de objetos e de reconhecimento social, estes vão de encontro com os resultados encontrados por Aisa et al. (2007) e Lévy et al. (2003). Além disso, aqui nós mostramos que os efeitos deletérios da deprivação maternal podem ser revertidos com o uso dos inibidores da AchE, donepezil e galantamina.

A memória de reconhecimento confere ao indivíduo a habilidade de discriminar entidades (objetos, indivíduos) novas e familiares (Rossato et al., 2007). Análises feitas em pacientes amnésicos, bem como estudos feitos em primatas e roedores que tiveram regiões do cérebro lesionadas, indicam que a integridade do lobo temporal é essencial para a codificação, armazenamento e

expressão destes tipos de memória (Logothetis e Sheinberg, 1996; Riesenhuber e Poggio 2002). Além disso, a formação hipocampal é conhecida por sofrer grandes alterações estruturais (plásticas) e neuroquímicas em resposta as experiências do indivíduo ao longo da vida (Mirescu et al., 2004). Dados recentes de nosso laboratório indicam a participação de vários processos bioquímicos no hipocampo e córtex entorrinal na formação de memórias de reconhecimento (Rossato et al., 2007; Clarke et al., 2008; Furini et al., 2009).

Nossos dados mostram ainda que os efeitos deletérios da privação materna na consolidação da memória de reconhecimento de objetos e da memória de reconhecimento social também foram acompanhados pelo aumento na atividade da AchE no hipocampo e no córtex perirrinal de animais privados. O uso dos inibidores da AchE, donepezil ou galantamina, foi capaz de reverter os déficits cognitivos encontrados. A reversão dos déficits cessou quando o tratamento com os inibidores foi interrompido. Portanto, os resultados sugerem que a privação materna é capaz de alterar os mecanismos colinérgicos endógenos. O papel dos mecanismos colinérgicos na memória tem sido amplamente relatado ao longo dos anos por muitos autores (Bartus et al, 1982; Bartus et al, 1985; Price et al, 1985; Barros et al, 2002; Gold, 2003; Prado et al, 2006; Sarter et al., 2003; Sarter & Bruno, 2004; Kozak et al., 2007).

O declínio da memória decorrente da idade, ou aquele que ocorre em pacientes acometidos pela doença de Alzheimer, são frequentemente atribuídos ao mau funcionamento do sistema colinérgico (Bartus et al, 1982, 1985; Price et al., 1985; Mohapel et al, 2005). O donepezil e a galantamina são

amplamente usados no tratamento da falência da memória em idosos ou vítimas da doença de Alzheimer. Tanto o donepezil quanto a galantamina têm-se mostrado eficientes em melhorar a memória em uma variedade de tarefas comportamentais em animais, incluindo algumas semelhantes às descritas nos experimentos desta tese (Lamirault et al., 2003; Riekkinen et al., 1996; Prickaerts et al., 2005). Particularmente, donepezil e galantamina têm-se mostrado eficazes em melhorar o desempenho na memória de ratos velhos (Barnes et al, 2000).

Aqui nós sugerimos que as experiências adversas, como a privação materna repetida no período neonatal, podem induzir ao longo da vida do animal uma disfunção no sistema colinérgico cerebral, que pode ser revertida pelo donepezil e a galantamina. Estes nossos resultados sugerem que o uso de inibidores da AchE ajudam a tratar os danos provocados pela privação materna ou pelo estresse neonatal descritos até aqui.

Nos estudos com animais, muitas formas de estresse no período neonatal também afetam o comportamento dos animais adultos e possivelmente possam estar associados a algum tipo de déficit colinérgico (Sarter e Bruno, 2004), a alterações neuroendócrinas (Levine, 2000; Cirulli et al, 2003; Aisa et al, 2007), neuroquímicas e moleculares envolvidas na síntese de pCREB (Izquierdo & Medina, 1997; Izquierdo et al, 2006; Lipmann et al, 2007; Aisa et al, 2009; Ognibine et al, 2008), na expressão de receptores glutamatérgicos (Pickering et al, 2006; Kosten et al, 2007), ou em outros processos envolvendo modulação por dopamina e BDNF hipocampal e outros moduladores (Bekinschtein et al., 2007; Rosato et al., 2009).

Importantes evidências sugerem que algumas ERKs participam nos mecanismos de modificação sináptica ao longo do tempo e na formação da STM, da LTM e da indução e manutenção da LTP (Izquierdo et al, 2006, 2008), regulando a funcionalidade de diferentes sistemas de neurotransmissores, ativando os fatores de transcrição nucleares, como o CREB por exemplo (Rossato et al., 2006; Levenson et al., 2004; Kellerher et al., 2004; Miller e Marshall, 2005). De fato, têm-se demonstrado que as ERKs hipocâmpais, em particular a ERK1/2, são cruciais para a formação da memória de longa duração, da LTP (English e Sweatt, 1996; Kanterewicz, 2000), e do aprendizado do medo motivado (Atkins et al., 1998; Cammarota et al., 2000; Walz et al., 1999; Rossato et al., 2004).

Em nossos experimentos, ratos privados não aumentaram a produção de CREB nem de ERK1/2 fosforilado em relação aos animais não privados após a sessão de treino único na esquiiva inibitória. Isso pode explicar porque os ratos privados apresentaram os déficits cognitivos nesta tarefa tanto na STM quanto na LTM. É interessante ressaltar que entender os mecanismos responsáveis pela interação entre estresse, cognição e memória é importante já que estudos cognitivos e neurobiológicos confirmam que o hipocampo está criticamente envolvido na LTM (Morris et al., 2003; Poldrack e Packard 2003; Izquierdo et al., 2006, 2008; Whitlock et al., 2006; Gruart et al., 2006; Bekinschtein et al., 2007; Rossato et al., 2009). Além disso, as vulnerabilidades do hipocampo a agentes estressores como a privação materna podem interferir na plasticidade do hipocampo, na neurogênese (De Kloet et al., 1999; McEwen, 1999), diminuindo a expressão de receptores glutamatérgicos tipo



AMPA e NMDA no hipocampo (Pickering et al., 2006). De acordo com os nossos dados também altera a neuroquímica para a fosforilação da ERK e do CREB afetando diretamente a consolidação da memória na esQUIVA INIBITÓRIA.

Estes prejuízos cognitivos na memória aversiva parecem claros e não podem ser atribuídos a um comprometimento nutricional destes animais no período de desenvolvimento, pois estudos prévios já demonstraram que animais privados da mãe por um período de tempo variável, entre 1 a 3 horas diárias, não altera o ganho de peso corporal no período de desenvolvimento corporal (Kosten et al., 2000; 2004; 2006; Zang et al., 2005). Além disso, os animais foram mantidos em uma sala com temperatura constante igual à temperatura do ninho, de  $\pm 32^{\circ}\text{C}$ , eliminando um possível estresse por hipotermia causado pela falta do calor materno. Os déficits cognitivos também não podem ser associados com analgesia, pois a deprivação materna não afeta a sensibilidade à dor nas patas, nem altera a atividade exploratória e a ansiedade em ratos machos (Kosten et al., 2005). Portanto, os déficits cognitivos encontrados nos animais privados podem ser atribuídos a possíveis modificações neuroquímicas hipocampais que podem refletir na idade adulta os efeitos da ruptura do convívio na relação mãe-filhote no período neonatal.

No LAM, a aquisição do aprendizado se baseia fortemente no conhecimento que o animal tem acerca da posição original da plataforma de escape, bem como de outros aspectos não espaciais e procedimentais do LAM, como a habilidade de nadar e a de subir na plataforma para escapar da água e a ciência dessa possibilidade (Morris et al., 1982; Rossato, 2006).

Nossos resultados no LAM mostraram que embora ratos deprivados tenham uma latência significativamente maior para encontrar a plataforma nos dias 2 e 3 do treinamento, no quinto dia estes animais se equivaleram aos ratos não deprivados, mostrando, portanto que os dois grupos foram capazes de aprender a localizar a plataforma submersa. Diferente de outros protocolos experimentais vistos nesta tese, que envolveram uma única sessão de treino no LAM, os animais foram submetidos a um treinamento de oito sessões diárias por cinco dias. Este é um período de tempo suficiente para que os animais possam reter a tarefa e fortalecer o traço mnemônico, se recuperando de um possível déficit nos dias anteriores. Este fato pode ser evidenciado pelo teste no dia 6, quando tanto ratos não deprivados como deprivados nadaram aproximadamente 40% do tempo no quadrante onde estava a plataforma submersa nos dias de treinamento.

Após o estabelecimento da memória espacial no LAM, a localização da plataforma submersa foi mudada para o quadrante oposto ao original (aprendizado reverso). Ao iniciarem o aprendizado reverso os animais precisam criar um novo mapa espacial para substituir aquele formado no aprendizado original e assim nadarem até a plataforma e escaparem da água (Rossato, 2006; Martin et al, 2005). Este novo aprendizado se baseia no conhecimento adquirido no aprendizado original, pois a reversão é rapidamente adquirida, sugerindo que parte da memória original é preservada e fornece informações acerca da nova posição da plataforma de escape durante o aprendizado reverso.

Nossos resultados no aprendizado reverso no LAM mostram que ele foi adquirido tanto pelos animais deprivados como pelos não deprivados. Porém, o aprendizado foi melhor nos não deprivados. O aprendizado reverso é um aprendizado complexo que requer a participação da circuitaria neural evolutivamente mais recente, com a ativação da síntese de algumas proteínas essenciais para a consolidação de diferentes tipos de memórias; somente algumas espécies de cefalópodes (polvos), as aves e mamíferos, por exemplo, são capazes de executá-los (Igaz et al, 2002; Epstein et al, 2003). No aprendizado reverso o animal deve manter o componente procedural da memória (nadar) e alterar o componente declarativo (aprender a nova posição da plataforma no quadrante reverso de acordo com as informações espaciais referentes à posição original).

Após o treino no aprendizado reverso, os ratos não deprivados tiveram desempenho significativamente melhor no teste, pois aprenderam o local da plataforma reversa, tiveram latências de escape significativamente menores e o número de cruzamentos significativamente maiores em relação aos ratos deprivados. Além disso, os ratos não deprivados apresentaram um percentual de nado dentro do quadrante reverso significativamente maior em relação ao quadrante original, enquanto os ratos deprivados nadam em torno de 25% do tempo total do teste dentro de cada um dos quadrantes original e reverso.

Certamente não podemos inferir que esses resultados se devem a uma diferença na atividade locomotora destes animais, já que tanto no teste da consolidação quanto no teste do aprendizado reverso a velocidade entre os grupos não difere.

Considerando que no aprendizado espacial reverso os animais redirecionam a resposta original e aprendem a nadar para um quadrante diferente, tem-se sugerido que este comportamento envolve uma forma especial de extinção que é expressa como uma nova preferência espacial (Lattal et al, 2004). De fato a aquisição do quadrante reverso é mais rápida que a do quadrante original, sugerindo que muitos dos componentes não espaciais do traço original não são extintos, mas usados como uma base onde o traço espacial original é primeiro enfraquecido e depois mudado e estabilizado sob a forma de uma preferência reversa, podendo envolver reconsolidação da resposta original; um processo que no caso da vida real pode ser extremamente adaptativo (Rossato 2006). Nosso desenho experimental, no LAM apenas nos permite dizer que os ratos deprivados não reteram o teste do aprendizado reverso, mas não podemos dizer se este mecanismo é dependente de um processo de extinção ou de reconsolidação.

No entanto, se considerarmos a análise neuroquímica podemos inferir que embora a fosforilação do CREB tenha sido menor nos ratos deprivados treinados, ela ocorreu. Isto pode explicar porque os ratos não deprivados e deprivados obtiveram resultados semelhantes na consolidação da memória no LAM. Podemos inferir (embora não tenhamos estes dados) que possivelmente até o dia do aprendizado reverso a ativação das enzimas gerenciadoras da síntese de proteínas responsável pela construção do traço mnemônico do aprendizado espacial atingiu valores máximos, saturando o sistema. Quando os animais foram submetidos ao aprendizado reverso, uma nova onda de síntese protéica foi ativada, porém a partir de um nível já previamente

aumentado de síntese de proteínas relacionadas com o aprendizado espacial. A menor fosforilação de CREB em ratos privados em relação aos não privados treinados no LAM e o aumento na fosforilação da ERK1/2 somente 2 horas após o treinamento no aprendizado reverso apóiam esta suposição e podem explicar os prejuízos na retenção do aprendizado reverso nesses ratos privados.

## VI. CONCLUSÕES

Os resultados desta tese nos permitem algumas conclusões gerais:

- 1) Ratos deprivados apresentaram prejuízos na memória de reconhecimento de objetos;
- 2) Ratos deprivados apresentaram prejuízos na memória de reconhecimento social;
- 3) Ratos deprivados apresentaram aumento na atividade da AchE no hipocampo e no córtex perirrinal;
- 4) O uso de inibidores da AchE (1mg/kg), administrados 30 min antes do treino, reverte os déficits cognitivos encontrados nos itens 1 e 2.
- 5) Ratos deprivados apresentaram déficits cognitivos na STM e na LTM na esQUIVA inibitória e não aumentaram a fosforilação de CREB e ERK1/2 após a sessão de treino;
- 6) Ratos deprivados não reteram o aprendizado reverso no LAM e tiveram menor fosforilação de CREB em relação aos não deprivados após o treino.

Em síntese, nossos resultados sugerem que a deprivação maternal no período neonatal afetou a consolidação dos diversos tipos de memória estudados nesta tese. Os prejuízos mnemônicos em ratos deprivados podem ser mediados por alterações no sistema colinérgico e na síntese de proteínas no hipocampo.

## VII. PERSPECTIVAS FUTURAS

De acordo com os resultados obtidos em nossas pesquisas até aqui, surgiu uma questão. Os ratos privados da mãe não apresentaram fosforilação do CREB no hipocampo porque não aprenderam as tarefas comportamentais estudadas ou o déficit na memória é decorrente da falta de fosforilação do CREB? Como dito anteriormente, nós verificamos que a privação materna aumenta a atividade da AchE no hipocampo e no córtex perirrinal em ratos adultos alterando o funcionamento do sistema colinérgico. Assim, nós hipotetizamos que a atividade aumentada desta enzima, por consequência, pode inviabilizar quantidades de acetilcolina nos níveis ideais para o funcionamento das sinapses colinérgicas hipocampais. Esta menor quantidade de acetilcolina na fenda sináptica poderia modular a liberação de glutamato nas sinapses glutamatérgicas, interferindo na ativação das cascatas de fosforilação das proteínas cinases, entre elas a ERK1/2 e do CREB, explicando os resultados obtidos em nossos experimentos neuroquímicos e comportamentais realizados até agora.

Desta maneira, para aprofundar os estudos dos efeitos da privação materna nos mecanismos de consolidação de memórias espaciais e aversivas pretendo me concentrar no papel do sistema colinérgico como possível modulador desses efeitos. Para isso, os objetivos para pesquisar no futuro incluem:

- 1) Estudar se a administração de galantamina ou donepezil reverte os déficits cognitivos em todas as tarefas comportamentais estudadas nesta tese.
- 2) Estudar a fosforilação de CREB e ERK1/2 também nas tarefas do reconhecimento de objetos e reconhecimento social.
- 3) Verificar a fosforilação de ERK1/2 e CREB após a administração oral de galantamina em ratos treinados nas tarefas comportamentais cognitivas espaciais e aversivas.
- 4) Estudar se o uso de agonistas de receptores nicotínicos (nicotina) exerce o mesmo efeito mnemônico em ratos privados que receberam via oral uma única dose de galantamina ou donepezil.
- 5) Verificar se a liberação de acetilcolina aumenta em ratos privados após o uso dos inibidores da AchE.
- 6) Padronizar uma curva em função do tempo do pico de liberação de acetilcolina após a administração oral de galantamina, donepezil e nicotina.
- 7) Verificar como se dá a expressão de receptores glutamatérgicos no hipocampo, amígdala e córtex perirhinal após a administração dos inibidores da AchE.
- 8) Correlacionar se o aumento esperado da expressão e da atividade dos receptores glutamatérgicos e do aumento na liberação da acetilcolina podem influenciar a consolidação de memória de ratos privados.



Para desenvolver esses experimentos serão utilizadas técnicas de western blot, microdiálise e PCR em tempo real. Estas técnicas são amplamente utilizadas em nosso grupo de pesquisa no centro de memória na PUCRS.

## VIII. REFERÊNCIAS

Aisa B, Tordera R, Lasheras B, Del Rio J, Ramirez M. J. (2007). Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 32: 256 - 266.

Aisa B, Elizalde N, Tordera R, Lasheras B, Del Rio J, Ramirez MJ. (2009). Effects of neonatal stress on markers of synaptic plasticity in the hippocampus: implications for spatial memory. *Hippocampus*, (aceito para publicação).

Alonso M, Viola H, Izquierdo I and Medina J. (2002). Aversive experiences are associated with a rapid and transient activation of ERKs in the hippocampus. *Neurobiology of learning and Memory*, 77: 119 - 124.

Atkins CM, Selcher JC, Petraitis JJ, Trzaskos JM, Sweatt JD. (1998). The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nature Neuroscience*, 1: 602 – 609.

Barnes CA, Meltzer J, Houston F, Orr G, Mcgann K, Wenk GL. (2000). Chronic treatment of old rats with donepezil or galantamine: effects on memory, hippocampal plasticity and nicotinic receptors. *Neuroscience*, 99: 17 - 23.

Barros DM, Izquierdo LA, Souza TM, Ardenghi PG, Pereira P, Medina JH, Izquierdo I. (2000). Molecular signalling pathways in the cerebral cortex are required for retrieval of one-trial avoidance learning in rats. *Behav Brain Res.* 114(1-2): 183-92.

Barros DM, Pereira, Medina JH, Izquierdo I. (2002). Modulation of working memory and long but, not short-term memory by cholinergic mechanisms in the basolateral amygdala. *Behavioral Pharmacology*, 13 (2): 163 - 7.

Barros DM, Ramirez MR, Reis EA, Izquierdo I. (2004). Participation of hippocampal nicotinic receptors in acquisition, consolidation and retrieval of memory for one trial inhibitory avoidance in rats. *Neuroscience*, 126: 651 - 656.

Bartus RT, Dean RL, Beer B, Lippa AS. (1982). The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunctions. *Science*, 217: 408-417.

Bartus RT, Dean RL, Pontecorvo MJ, Flicker C. (1985). The cholinergic hypothesis: a historical overview, current perspective, and future directions. *Annual New York Academy of Science*, 444: 332 - 358.

Bekinschtein P, Cammarota M, Igaz LM, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Medina JH. (2007). Persistence of long-term memory storage requires a late protein

synthesis and BDNF-dependent phase in the hippocampus. *Neuron*, 53: 261 - 267.

Benetti F, Araújo AP, Sanvitto G, Lucion AB. (2007). Effects of neonatal novelty exposure on sexual behavior, fear, and stress-response in adult rats. *Developmental Psychobiology*, 49 (3): 258 – 264.

Berman DE, Hazvi S, Rosenblum K, Seger R, Dudai Y. (1998). Specific and differential activation of mitogen-activated protein kinase cascades by unfamiliar taste in the insular cortex of the behaving rat. *Journal of Neuroscience*, 18: 10037 – 10044.

Bernabeu R, Bevilaqua L, Ardenghi P, Bromberg E, Schmitz PK, Bianchin M, Izquierdo I, Medina J. (1997). Involvement of hippocampal D1/D5 receptor - cAMP signaling pathways in a late memory consolidation phase of an aversively-motivated task in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 7041 - 7046.

Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248 – 254.

Bredy TW, Grant RJ, Champagne DL, Meaney MJ. (2003). Maternal care influences neuronal survival in the hippocampus of the rat. *European Journal of Neuroscience*, 18 (10): 2903 - 2909.

Blokland A. (1995). Review Article. Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory? *Brain Research Review*, 21: 285 - 300.

Juliana Sartori Bonini. Papel da proteína cinase C (PKC) no processamento de memórias aversivas e espaciais. (2006). Tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Orientador: Ivan Izquierdo.

Cammarota M, Bernabeu R, Izquierdo I, Medina JH. (1996). Reversible changes in hippocampal 3H-AMPA binding following inhibitory avoidance training in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, 66 (1):85 -88.

Cammarota M, Bevilaqua LR, Ardenghi P, Paratcha G, Levi de Stein M, Izquierdo I, Medina JH. (2000). Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning abolition by NMDA receptor blockade. *Brain Research (Molecular Brain Research)*, 76: 36 - 46.

Cirulli F, Berry A, Alleva E. (2003). Early disruption of the mother-infant relationship: effects on brain plasticity and implications for psychopathology. *Neuroscience Biobehavioral Review*, 27: 73 – 82.

Clarke JR, Rossato JI, Monteiro S, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Cammarota M. (2008). Post-training activation of CB1 cannabinoid receptors in the CA1 region

of the dorsal hippocampus impairs object recognition long-term memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90: 374 - 381.

Davis H P, Squire L R. (1984). Protein synthesis and memory: A review. *Psychology Bulletin*, 96: 518 – 559.

de Castro BM, Pereira GS, Magalhães V, Rossato JI, De Jaeger X, Martins-Silva C, Leles B, Lima P, Gomez MV, Gainetdinov RR, Caron MG, Izquierdo I, Cammarota M, Prado VF, Prado MA. (2009). Reduced expression of the vesicular acetylcholine transporter causes learning deficits in mice. *Genes Brain Behavior*, 8: 23 - 35.

Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Feather-Stone, RM. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemistry Pharmacology*, 7: 88 – 95.

English JD, Sweatt JD. (1996). Activation of p42 mitogen-activated protein kinase in hippocampal long term potentiation. *J. Biol. Chem.*, 271: 24329 – 24332.

Ennauer A, Delacour J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. Behavioral data. *Behavioral Brain Research*, 31: 47 – 59.

Epstein HT, Child FM, Kuzirian AM, Alkon DL. (2003). Time windows for effects of protein synthesis inhibitors on Pavlovian conditioning in *Hermissenda*: behavioral aspects. *Neurobiology of Learning and Memory*, 79: 127 – 131.

Fumagalli F, Bedogni F, Perez J, Racagni G, Riva M. A. (2004). Corticostriatal brain-derived neurotrophic factor dysregulation in adult rats following prenatal stress. *European Journal of Neuroscience*, 20: 1348 - 54.

Furini CR, Rossato JI, Bitencourt LL, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. (2009). Beta-Adrenergic receptors link NO/sGC/PKG signaling to BDNF expression during the consolidation of object recognition long-term memory. *Hippocampus*, (*aceito para publicação*).

Gareth M. Thomas e Richard L. Huganir. (2004). MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nature Reviews*, 5: 175 - 183.

Gould E, Tanapat P, Hastings NB, Shors TJ. (1999). Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning. *Trends Cognitive Science*, 3: 186 - 192.

Gold, P. E. (2003). Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 80: 194 - 210.

Greisen M, H, Bolwing TG, Husum H, Nedergaard P, Wortwein G. (2005). Maternal separation affects male rat copulatory behavior and hypothalamic

corticotrophin releasing factor in concert. *Behavioral Brain Research*, 158 (2): 367 - 375.

Gruart A, Muñoz MD, Delgado-García, JM. (2006). Involvement of the CA3-CA1 synapse in the acquisition of associative learning in behaving mice. *Journal of Neuroscience*, 26:1077 - 1087.

Gruss M, Braun K, Frey JU, Korz V. (2008). Maternal separation during a specific postnatal time window prevents reinforcement of hippocampal long-term potentiation in adolescent rats. *Neuroscience*, 152: 1 - 7.

Guzowski JF, McGaugh JL. (1997). Antisense oligodesoxynucleotide-mediated disruption of hippocampal cAMP response element binding protein levels impairs consolidation of memory for water maze training. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 94: 2693 – 2698.

Hilgard, E.R., Bower, G.H. *Teorías del Aprendizaje*, Trillas, México, 1973.

Huang LT, Holmes GL, Lai MC, Hung PL, Wang CL, Wang TJ, Yang CH, Liou CW, Yang SN. (2002). Maternal deprivation stress exacerbates cognitive deficits in immature rats with recurrent seizures. *Epilepsia*, 43 (10): 1141 – 1148.



Huot RL, Plotsky PM, Lenox RH, McNamara RK. (2002). Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. *Brain Research*, 950: 52 – 63.

Huot RL, Gonzalez ME, Ladd CO, Thirivikraman KV, Plotsky PM. (2004). Foster little prevents hypothalamic-pituitary-adrenal axis sensitization mediated by neonatal maternal separation. *Psychoneuroendocrinology* 29: 279 – 289.

Igaz LM, Vianna M R, Medina JH, Izquierdo I. (2002). Two time periods of hippocampal mRNA synthesis are required for memory consolidation of fear-motivated learning. *Journal of Neuroscience*, 22: 6781 – 6789. .

Izquierdo I. (2002). *Memória*. Artmed, Porto Alegre.

Izquierdo I, Bevilaqua LRM, Rossato JI, Bonini JS, Medina JH, Cammarota M. (2006). Different molecular cascades in different sites of the brain control consolidation. *Trends in Neuroscience*, 29: 496 - 505.

Izquierdo I, Bevilaqua LR, Rossato JI, da Silva WC, Bonini JS, Medina JH, Cammarota M (2008) The molecular cascades of long-term potentiation underlie memory consolidation of one-trial avoidance in CA1 but not in basolateral amygdala and neocortex. *Neurotox. Res.*, 14: 1 - 22.

Izquierdo I, Cammarota M, Medina H. J, Bevilaqua L.R.M (2004). Pharmacological findings on the biochemical bases of memory processes: A general view. *Neural Plasticity*, 11: 159 - 187.

Izquierdo I e Medina JH. (1995). Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 63: 19 - 32.

Izquierdo I & Medina JH (1997). Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in the other brain structures. *Neurobiol. Learn. Mem.* 68: 285 - 316.

Izquierdo LA, Barros DM, Medina JH, Izquierdo I. (2003). Exposure to novelty enhances retrieval of very remote memory in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 79: 51 - 56.

Izquierdo LA, Barros DM, da Costa JC, Furini C, Zinn C, Cammarota M, Bevilaqua LR, Izquierdo I. (2007). A link between role of two prefrontal areas in immediate memory and in long-term memory consolidation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 88: 160 - 188.

Jeffrey RB, Jay S. (1998). From normal fear to pathological anxiety. *Psychological Review*, 105: 325 – 350.

Kanterewicz BI, Urban NN, McMahon DB, Norman ED, Giffen LJ, Favata MF, Scherle PA, Trzcos JM, Barrionuevo G, Klann E. (2000). The extracellular signal-regulated kinase cascade is required for NMDA receptor-independent LTP in area CA1 but not area CA3 of the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 20: 3057 - 3066.

Kida S, Josselyn SA, de Ortiz SP, Kogan JH, Chevere I, Masushige S, Silva A J. (2002). CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. *Nature Neuroscience*, 5: 348 – 355.

Kelleher RJ, Govindarajan A, Jung HY, Kang H, Tonegawa S. (2004). Translational control by MAPK signalling in long-term synaptic plasticity and memory. *Cell*, 116: 467 - 479.

Kikusui T, Ichkawa S, Mori, Y. (2009). Maternal deprivation by early weaning increases corticosterone and decreases hippocampal BDNF and neurogenesis mice. *Journal of Psychoneuroendocrinology*, 34: 762 - 772.

Kosten TA, Karanian DA, Yeh J, Haile CN, Kim JJK, Bahr BA. (2007). Memory impairments and hippocampal modifications in adult rats with neonatal isolation stress experience. *Neurobiology of Learning and Memory*, 88: 167 – 176.

Kosten TA, Miserendino MJD, Bombace JC, Lee HJ e Kim JJ. (2005). Sex-selective effects of neonatal isolation on fear conditioning and foot shock sensitivity. *Behavioral Brain Research*, 157: 235 - 244.

Kosten TA, Miserendino MJD, Kehoe P. (2000). Enhanced acquisition of cocaine self-administration in adult rats with neonatal isolation stress experience. *Brain Research*, 875: 44 - 50.

Kosten TA, Sanchez H, Zhang XY, Kehoe P. (2004). Neonatal isolation enhances acquisition of cocaine self-administration and food responding in female rats. *Behavioral Brain Research*, 151: 137 - 149.

Kosten TA, Sanchez H, Zhang XY, Kehoe P. (2006). Heightened cocaine and food self-administration in female rats with neonatal isolation experience. *Neuropsychopharmacology*, 31: 70 - 76.

Kuhn CM, Schanberg SM. (1998). Responses to maternal separation: mechanisms and mediators. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 16: 261 – 270.

Lai MC, Holmes GL, Lee KH, Yang SN, Wang CA, Wu CL, Tiao MM, HsiehC S, Lee CH, Huang LT. (2006). Effect of neonatal isolation on outcome following neonatal seizures in rats: the role of corticosterone. *Epilepsy Research*, 68 (2): 123 -136.

Lamprecht R, Hazvi S, Dudai Y. (1997). cAMP response element-binding protein in the amygdala is required for long- but not short-term conditioned taste aversion memory. *Journal of Neuroscience*, 17: 8443 – 8450.

Lamirault L, Guillou C, Thal C, Simn H. (2003). Combined treatment with galanthaminium bromide, a new cholinesterase inhibitor, and RS 67333, a partial agonist of 5-HT<sub>4</sub> receptors, enhances place and object recognition in young adult and old rats. *Progress in Neuropsychopharmacology (Biology Psychiatry)*, 27: 185 - 195.

Lassiter TL, Marshall RS, Jackson LC, Hunter DL, Vu JT, Padilha S. (2003). Automated measurement of acetylcholinesterase activity in rat peripheral tissues. *Toxicology*, 186 (3): 241 - 253.

Lee HJ. (2001). Fluoxetine enhances cell proliferation and prevents apoptosis in dentate gyrus of maternally separated rats. *Molecular Psychiatry*, 6: 725 – 728.

Levenson JM, O'Riordan KJ, Brown KD, Trinh MA, Molfese DL, Sweatt JD. (2004). Regulation of histone acetylation during memory formation in the hippocampus. *Journal of Biology and Chemistry*, 279: 40540 – 40559.

Lehmann J, Pryce CR, Bettschen D, Feldon J. (1999). The maternal separation paradigm and adult emotionality and cognition in male and female Wistar rats. *Pharmacology of Biochemistry and Behavior*, 64 (4): 705 - 715.

Levine S, (2000). Influence of psychological variables on the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *European Journal of Pharmacology*, 405: 149 – 160.

Lippman M, Bress A, Nemeroff CB, Plotsky PM, Monteggia L. (2007). Long-term behavioral and molecular alterations associated with separation in rats. *European Journal of Neuroscience*, 25: 3091 - 3098.

Lévy F, Melo AI, Galef BGJr, Madden M, Fleming AS. (2003). Complete maternal deprivation affects social, but not spatial, learning in adult rats. *Developmental Psychobiology*, 43: 177 - 191.

Liu D, Diorio J, Day JC, Francis D, Meaney MJ. (2000). Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. *Nature Neuroscience*, 3 (8): 799 - 806.

Logothetis NK and Sheinberg DL. (1996). Visual object recognition. *Annual Review Neuroscience*, 19: 577 - 621.

Madruga C, Xavier LL, Achaval M, Sanvitto GL, Lucion AB. (2006). Early handling, but not maternal separation, decreases emotional responses in two paradigms of fear without changes in mesolimbic dopamine. *Behavioral Brain Research*, 166: 241 – 246.

Marchi M, Raiteri M. (1996). Nicotinic autoreceptors mediating enhancement of acetylcholine release become operative in conditions of “impaired” cholinergic presynaptic function. *Journal of Neurochemistry*, 67: 1974 - 1981.

Martin S, Hoz Livia de, Morris R GM. (2005). Retrograde amnesia: neither partial nor complete hippocampal lesions in rats result in preferential sparing of remote spatial memory, even after reminding. *Neuropsychologia*, 43: 609 - 624.

McGaugh JL. (2000). Memory—a century of consolidation. *Science*, 287: 248 – 251.

McGaugh JL. (2002). Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective. *Trends in Neuroscience*, 25: 456.

Medina JH, Izquierdo I. (1995). Retrograde messengers, long-term potentiation, and memory processes. *Brain Research Review*, 21: 185 - 194.

Mello PB, Benetti F, Cammarota M, Izquierdo I. (2009). Physical exercise can reverse the deficit in fear memory induced by maternal deprivation. *Neurobiology of Learning and Memory*. (aceito para publicação).

Micheau J, Riedel G, Roloff E V L, Inglis J, Morris RGM. (2004). Reversible hippocampal inactivation partially dissociates how and where to search in the water maze. *Behavioral Neuroscience*, 118: 1022 - 1032.

Miller CA, Marshall JF. (2005). Molecular substrates for retrieval and reconsolidation of cocaine-associated contextual memory. *Neuron*, 47: 873 - 884.

Milner B, Squire LR, Kandel ER. (1998). Cognitive neuroscience and the study of memory, *Neuron*, 20: 445 - 468.

Mirescu C, Peters JD, Gould E. (2004). Early life experiences alter response of adult neurogenesis to stress. *Nature Neuroscience*, 7: 841 – 846.

Mohapel P, Leanza G, Kokaia M, Lindvall O. (2005). Forebrain acetylcholine regulates adult hippocampal neurogenesis and learning. *Neurobiology Aging*, 26: 939 - 946.

Moriguchi S, Marszalec W, Zhao X, Yeh JZ, Narahashi T. (2004). Mechanism of action of galantamine on N-methyl-D-aspartate receptors in rat cortical neurons. *Journal of Pharmacology Experimental Therapy*, 310: 933 - 942.

Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, 297: 681 - 683.

Ogawa T, Mikuni M, Muneoka K, Mori KJ, Takahashi K. (1994). Periodic maternal deprivation alters stress response in adult offspring; potentiates the negative feedback regulation of restraint stress-induced adrenocortical



response and reduces the frequencies of open field-induced behaviors. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 49: 961 – 967.

Ognibene E, Adriani W, Caprioli A, Ghirardi O, Ali SF, Aloe L, Laviola G. (2008). The effect of early maternal separation on brain derived neurotrophic factor and monoamine levels in adult heterozygous reeler mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 32: 1269 – 1276.

Pellow S, Chopin P, File S, Briley M. (1985). Validation of open: closed arms entries in an elevated plus maze as a measure of anxiety in the rats. *Journal of Neuroscience Methods*, 14: 149 - 167.

Pickering C, Gustafsson L, Cerebe A, Nylander I, Liljequist S (2006). Repeated maternal separation of male Wistar rats alters glutamate receptor expression in the hippocampus but not the prefrontal cortex. *Brain Research*, 1099: 101-108.

Prado VF, Martins-Silva C, Castro BM, Lima RF, Barros DM, Amaral E, Ramsey AJ, Sotnikova TD, Ramirez MR, Kim Hiung-Gun, Rossato JI, Koenen J, Quan H, Cota VR, Moraes MFD, Gomez MV, Guatimosin C, Westel WC, Kushmerick C, Pereira GS, Gainetdinov RR, Izquierdo I, Caron MG, Prado M. (2006). Mice deficient for the vesicular acetylcholine transporter are myasthenic and have deficits in object and social recognition. *Neuron*, 51: 601 - 612.

Price DL, Cork LC, Struble RC, Whitehouse PJ, Kitt CA, Walker LC. (1985). The functional organization of the basal forebrain cholinergic system in primates and the role of this System in Alzheimer's Disease. Annual New York Academy of Science, 444: 287 - 311.

Prickaerts J, Sik A, Van der Staay FJ, Vente J, Blokland A. (2005). Dissociable effects of acetylcholinesterase inhibitors and phosphodiesterase type 5 inhibitors on object recognition memory: acquisition versus consolidation. Psychopharmacology, 177: 381 - 390.

Plotsky PM, Thirvikraman KV, Nemeroff CB, Caldji C, Sharma S, Meaney MJ. (2005). Long-term consequences of neonatal rearing on central corticotrophin-releasing factor systems in adult male rat offspring. Neuropsychopharmacology, 30: 2192 - 2204.

Price DL, Cork LC, Struble RC, Whitehouse PJ, Kitt CA, Walker L.C. (1985). The functional organization of the basal forebrain cholinergic system in primates and the role of this System in Alzheimer's Disease. Annual New York Academy of Science, 444: 287 – 311.

Renard GM, Suarez MM, Levin GM, Rivarola MA. (2005). Sex differences in rats: effects of chronic stress on sympathetic system and anxiety. Physiology and Behavior, 85: 363 – 369.

Renard GM, Rivarola AM, Suarez MM. (2007). Sexual dimorphism in rats: effects of early maternal separation and variable chronic stress on pituitary adrenal axis and behavior. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 25: 373 – 379.

Rhees RW, Lephart ED, Eliason D. (2001). Effects of maternal separation during early postnatal development on male sexual behavior and female reproductive function. *Behavioral Brain Research*, 123 (1): 1 - 10.

Riesenhuber M, Poggio T. (2002). Neural mechanisms of object recognition. *Current Opinion Neurobiology*, 12: 162 - 168.

Riekkinen PJr, Schmidt BH, Stefanski R, Riekkinen M, Kuitunen J. (1996). Mefenolate improves spatial navigation and avoidance behavior in scopolamine-treated, medial, septum-lesioned and aged rats. *European Journal Pharmacology*, 309: 121 - 130.

Roceri M, Cirulli F, Pessina C, Peretto P, Racagni G, Riva MA. (2004). Postnatal repeated maternal deprivation produces age-dependent changes of brain-derived neurotrophic factor expression in selected brain regions. *Biology Psychiatry*, 55: 708 - 714.

Rossato JI, Bevilaqua LRM, Myskiw JC, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. (2007). On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and

reconsolidation of object recognition memory. *Learning and Memory*, 14: 36 - 46.

Rossato JI, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Medina JH, Cammarota M. (2009). Dopamine controls persistence of long-term memory storage. *Science*, no prelo.

Rossato JI, Bonini JS, Coitinho AS, Vianna MR, Medina JH, Cammarota M, Izquierdo I. (2004). Retrograde amnesia induced by drugs acting on different molecular systems. *Behavioral Neuroscience*, 118: 563 - 568.

Rossato JI, Zinn CG, Furini C, Bevilaqua LRM, Medina J, Cammarota M, Izquierdo I. (2006). A link between the hippocampal and striatal memory systems of the brain. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 78: 515 - 523.

Sharma SK, Sherff CM, Shobe J, Bagnall MW, Sutton MA, Carew TJ. (2003). Differential role of mitogen-activated protein kinase in three distinct phases of memory for sensitization in *Aplysia*. *Journal of Neuroscience*, 23: 3899 – 3907.

Squire LR, Kandel ER (2002). *Memória*. ArtMed, Porto Alegre.

Sun L, Shipley MT, Lidow MS. (2000). Expression of NR1, NR2A-D and NR3 subunits of the NMDA receptor in the cerebral cortex and olfactory bulb of adult rat. *Synapse*, 35: 212 – 221.

Suomi SJ. (1997). Early determinants of behavior: evidence from primate studies. *Br. Med. Bull.*, 53: 170 - 184.

Uriarte N, Breigeiron MK, Benetti F, Rosa FX, Lucion AB. (2007). Effects of maternal care on the development, emotionality, and reproductive functions in male and female rats. *Developmental Psychobiology*, 49 (5): 451 - 462.

Vazdarjanova A, Cahill L, McGaugh JL. (2001). Disrupting basolateral amygdala function impairs unconditioned freezing and avoidance in rats. *European Journal Neuroscience*, 14: 709 - 718.

Vianna, Mônica Ryff Moreira Roca. (2003). Mecanismos celulares e moleculares envolvidos no processo de extinção de memórias aversivas na região temporal medial. Tese de Doutorado do Departamento de Bioquímica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Porto Alegre, RS.

Voorhees EV, Scarpa A. (2004). The effects of child maltreatment on the Hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Trauma, Violence, Abuse*, 5: 333 - 352.

Walz R, Roesler R, Quevedo JL, Rockenbach IC, Amaral OB, Vianna MRM, Lenz G, Medina JH, Izquierdo I. (1999). Dose-dependent impairment of inhibitory avoidance retention in rats by immediate posttraining infusion of a mitogen-activated protein kinase inhibitor into cortical structures. *Behavioral Brain Research*, 105: 219 - 223.

Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF (2006). Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science*, 313: 1093 - 1097.

Wigger N e Neumann ID. (1999). Periodic maternal deprivation induces gender-dependent alterations in behavioral and neuroendocrine responses to emotional stress in adult rats. *Physiology and Behavior*, 66: 293 – 302.

Winkler J, Thal LJ, Gage FH, Fisher LJ. (1998). Cholinergic strategies for Alzheimer's disease. *J. Mol. Med.*, 76: 555 - 567.

Zhang XY, Sanchez H, Kehoe e Kosten TA. (2005). Neonatal isolation enhances maintenance but not reinstatement of cocaine self-administration in adult male rats. *Psychopharmacology*, 177: 391 - 399.

## IX. ANEXOS

- 1) Artigo “**Early postnatal maternal deprivation in rats induces memory deficits in adult life that can be reversed by donepezil and galantamine**” que compõe parte desta tese, publicado na revista *International Journal of Developmental Neuroscience*. Fator de impacto: 3,90. doi:10.1016/j.ijdevneu.2008.09.200
  
- 2) Resumo do artigo “**Maternal dietary loads of  $\alpha$ -tocopherol depress Protein Kinase C (PKC) signaling and synaptic plasticity in postnatal developing hippocampus and affect spatial memory in adult offspring**” do qual contribuí durante o ano de 2008 no período do doutorado sandwich no exterior na Universidade de Florença, Itália e que foi submetido para publicação na revista *Journal of Neuroscience*.
  
- 3) Resumo do trabalho feito na Universidade de Florença e que foi apresentado na forma oral no congresso europeu de histamina. “**XXXVIII<sup>th</sup> European Histamine Research Society**”, 13- 16 may, 2009.

**TITLE PAGE: Journal of Neuroscience**

2

3 **Journal Section:** Development/Plasticity/Repair

4

5 **Title:** Maternal dietary loads of  $\alpha$ -tocopherol depress Protein Kinase C (PKC) signaling  
6 and synaptic plasticity in postnatal developing hippocampus and affect spatial memory in  
7 adult offspring.

8

9 **Abbreviated title:** Maternal  $\alpha$ -tocopherol supplementation affects hippocampal functions  
10 in offspring.

11

**12 Authors and author addresses:**

13 Betti M<sup>1</sup>, Ambrogini P<sup>1</sup>, Minelli A<sup>1</sup>, Floridi A<sup>2</sup>, Lattanzi D<sup>1</sup>, Ciuffoli S<sup>1</sup>, Prospero E<sup>4</sup>,  
14 Frontini A<sup>5</sup>, Santarelli L<sup>6</sup>, Bucherelli C<sup>3</sup>, Baldi E<sup>3</sup>, Benetti F<sup>7</sup>, Galli F<sup>2</sup>, Cuppini R<sup>1</sup>,  
15 Dept. of Human, Environmental and Natural Sciences, Section of Physiology, University  
16 of Urbino "Carlo Bo", 61029-Italy. <sup>2</sup>Dept. of Internal Medicine, Section of Applied  
17 Biochemistry and Nutritional Sciences, University of Perugia, Italy. <sup>3</sup>Dept. of  
18 Physiological Sciences, University of Florence, Florence-Italy <sup>4</sup>Chair of Hygiene,  
19 <sup>5</sup>Institute of Normal Human Morphology, <sup>6</sup>Dept. of Molecular Pathology and Innovative  
20 Therapies, Polytechnic University of Marche, Ancona-Italy. <sup>7</sup>Centro de Memoria,  
21 Instituto de Pesquisas Biomedicas, Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do  
22 Sul (PUCRS) Av. Ipiranga, 6690, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

22

**23 Corresponding author:**

24 Michele Betti

25 Department of Human, Environmental and Natural Sciences

26 Section of Physiology

27 University of Urbino "Carlo Bo"

28 Via Ca' le Suore 2, 61029-Urbino, Italy

29 Tel +390722304286

30 Fax +390722304226

31 E-mail addresses [michele.betti@uniurb.it](mailto:michele.betti@uniurb.it)

32

33

34 **Number of figures:** 935 **Number of tables:** 2

36

37 **Number of pages:** 38

38

39 **Number of words for:** Abstract : 242; Introduction : 496; Discussion : 1500.

40

41 **keywords:** Vitamin E; - PKC; - Hippocampus; Long Term Potentiation (LTP); GAP-43;

42 MARCKS

43

44 **Acknowledgements:** We gratefully thank Dr Eduardo Fichera, PhD, for thoroughly  
45 reviewing the english. This work was supported by funds from the Italian MIUR (PRIN  
46 2005) to AM.

47

48

49



50

51 **ABSTRACT**

52

53

Besides acting as antioxidant,  $\alpha$ -tocopherol specific cell signaling can regulate pathways by inhibiting PKC, a kinase proposed to play pivotal roles in neural maturation and plasticity. Supplementing adult rats with  $\alpha$ -tocopherol reportedly affects neuronal remodeling and synapse formation in the hippocampus, in association with PKC inhibition. To date, little is known on the possible effects of  $\alpha$ -tocopherol loads in maturing nervous system, where PKC dysregulations have been associated to brain developmental dysfunctions. To investigate this issue, we fed dams with supranutritional doses of  $\alpha$ -tocopherol throughout pregnancy and lactation and evaluated, in offspring developing hippocampus, the effects on PKC signaling and morpho-functional maturation. Results showed that excessive maternal  $\alpha$ -tocopherol intake potentiates hippocampal  $\alpha$ -tocopherol incorporation, leading to a marked reduction of PKC phosphorylation throughout postnatal maturation, accompanied by decreased phosphorylation of major PKC-substrates, such as GAP-43 and MARCKS, involved in neural development and plasticity. Although hippocampal processes of neuronal maturation and synapse formation and targeting failed to display evident abnormalities, rats born to  $\alpha$ -tocopherol-supplemented mothers showed a significant reduction of long-term synaptic potentiation in juvenile hippocampal CA1, and revealed an impairment of hippocampus-dependent, long-lasting spatial learning abilities in adulthood. In conclusion, here we provide first evidence *in vivo* that maternal exposure to elevated doses of  $\alpha$ -tocopherol induces important alterations of cell signaling and synaptic plasticity in developing hippocampus, and exerts permanent, adverse effects on neurocognitive functions in adult offspring, thus emphasizing the need to evaluate the safety of excessive maternal intake of  $\alpha$ -tocopherol in humans.