

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA

Pablo Barreto Solari

**NATUREZA DA AMNÉSIA:  
DEFICIT NA AQUISIÇÃO OU NA EVOCAÇÃO?**

Porto Alegre, 2016

Pablo Barreto Solari

**NATUREZA DA AMNÉSIA:  
DEFICIT NA AQUISIÇÃO OU NA EVOCAÇÃO?**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Alberto Quillfeldt

Coorientador: M<sup>a</sup>. Ana Paula Crestani

Porto Alegre, 2016.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Jorge pela oportunidade de fazer parte de sua equipe e por ter me apresentado o imenso mundo da neurociência.

À coorientadora Ana pelo grande suporte não só neste trabalho, mas também por todos ensinamentos da rotina diária do laboratório.

À toda equipe do LPBNC por toda amizade sempre demonstrada a mim.

À Zelma, pela grande amizade, profissionalismo e dedicação aos ratos.

À minha família, que sempre me apoiou nos momentos de desânimo.

À minha esposa, pois sem ela não estaria apresentando este trabalho.

## **RESUMO**

Pode-se contextualizar a memória como a capacidade de codificar, consolidar e acessar as informações disponíveis no sistema nervoso central. Estudos mostraram que para alguns tipos de aprendizado, chamados aqui de aprendizados subsequentes, não é necessária a ativação dos receptores NMDA para serem formados, indo de encontro com outros trabalhos que mostraram um déficit na aquisição e consolidação da memória após o bloqueio destes. Neste trabalho, foram realizados experimentos fazendo uso da tarefa de localização de objetos que forma uma memória que não persiste, assim como as memórias adquiridas na primeira infância, para avaliar se o aprendizado subsequente nesta tarefa seria dependente ou independente da ativação dos receptores NMDA. Para isso, os animais passaram por experimentos em dois contextos, A e B, para verificar se após o bloqueio farmacológico com um antagonista dos receptores NMDA os animais ainda são capazes de aprender a segunda tarefa no contexto B. Os resultados mostraram uma tendência de que os animais aprenderam a tarefa no curto prazo, mas cuja memória não persistiu até teste realizado cinco dias depois. O aprendizado subsequente foi constatado nos animais que tiveram os receptores NMDA bloqueados, mas não nos animais do grupo controle. Concluímos que os resultados, apesar de preliminares, são promissores possibilitando avançar em futuros experimentos, porém o protocolo ainda precisa de ajustes para estabelecer um resultado mais bem definido.

**Palavras chave:** memória, amnésia, receptores NMDA, aprendizados subsequentes.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 FASES DA MEMÓRIA .....	1
1.2 CLASSIFICAÇÃO DAS MEMÓRIAS.....	2
1.3 ESQUECIMENTO .....	3
1.4 AMNÉSIA .....	4
1.5 AMNÉSIA INFANTIL.....	4
1.6 SISTEMA GLUTAMATÉRGICO .....	5
1.7 RECEPTORES NMDA ( <i>N</i> -Metil- <i>D</i> -Aspartato).....	5
1.8 APRENDIZADOS SUBSEQUENTES .....	7
2 JUSTIFICATIVA .....	10
3 OBJETIVOS.....	11
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	11
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	11
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	12
4.1 ANIMAIS .....	12
4.2 PROCEDIMENTOS COMPORTAMENTAIS.....	12
4.3 DESENHO EXPERIMENTAL .....	14
4.4 FÁRMACO.....	15
5 RESULTADOS .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
6 DISCUSSÃO.....	20
7 CONCLUSÃO.....	22
8 REFERÊNCIAS .....	23

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fases da memória.....	2
Figura 2 - Representação esquemática de um Receptor NMDA.....	6
Figura 3 - Resultados dos ratos pré-treinados e pré-expostos na tarefa de esquiva inibitória....	7
Figura 4 - Teste no CAC após treinamento em diferentes tratamentos com infusão de CPP. ...	8
Figura 5 - Imagem capturada pela câmera montada sobre o aparato, mostrando o contexto A. .....	12
Figura 6 - Imagem capturada pela câmera montada sobre o aparato, mostrando o contexto B	13
Figura 7 - Desenho esquemático para a verificação do aprendizado. ....	14
Figura 8 - Desenho esquemático para a verificação da persistência da memória. ....	15
Figura 9 - Desenho esquemático para verificação do aprendizado subsequente.....	15
Figura 10 - Verificação do aprendizado da tarefa no contexto A <b>Erro! Indicador não definido.</b>	
Figura 11 - Verificação da persistência do aprendizado da tarefa no contexto A..... <b>Erro! Indicador não definido.</b>	
Figura 12 - Avaliação do aprendizado subsequente no contexto B.....	18

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

CAC: Condicionamento Aversivo ao Contexto

mgluR: Receptor Metabotrópico para Glutamato

AMPA:  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico

NMDA: *N*-Metil-*D*-Aspartato

LTP: Potenciação de Longo Prazo

AP5: Ácido 2-amino-5-fosfopentanóico

CREAL: Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório

## 1 INTRODUÇÃO

Ao longo de nossas vidas, passamos por incontáveis tipos de situações de aprendizado, sejam estas situações de aprendizado cultural, científico, laboral, entre outras. Esses aprendizados, que armazenados são chamados de memória, são a matéria prima de nossa individualidade, ou seja, são os conhecimentos e experiências adquiridas ao longo de nossas vidas que nos fazem ter as mais diversas reações aos mais variados estímulos.

### 1.1 FASES DA MEMÓRIA

Para dar início a estudos de natureza comportamental, é necessário que saibamos diferenciar as fases de formação da memória (fig. 1), que consiste primeiramente, da *aquisição* e da *consolidação*.

A *aquisição* ocorre durante a exposição a uma situação de aprendizado, ou seja, o recebimento da informação do ambiente, podendo ser este aprendizado agradável ou aversivo.

A *consolidação* ocorre após o início de processos metabólicos estimulados pela aquisição. Nesse período, a memória permanece lábil, ou seja, ainda pode sofrer interferências, sejam essas interferências oriundas do ambiente ou por meio de fármacos em experimentos laboratoriais.

Uma memória, já consolidada, pode ser evocada. A *evocação* de uma memória consiste na expressão do aprendizado, seja essa expressão verbal ou comportamental. A *evocação* é o meio pelo qual podemos acessar e avaliar o aprendizado de uma tarefa, em alunos de uma escola, por exemplo, avaliamos o aprendizado através de testes, provas, entre outros. Em ratos, podemos avaliar a evocação de uma memória através de tarefas comportamentais como o condicionamento aversivo ao contexto (CAC), onde é realizada a medição do tempo total de ausência dos movimentos, comportamento conhecido como “*freezing*”, após a apresentação de um estímulo incondicionado, choque nos pés.

A evocação de uma memória pode resultar em dois processos antagônicos, a *reconsolidação* ou a *extinção*. Esses processos são dependentes do valor adaptativo da resposta dada ao estímulo. Se a expressão desta memória ainda for relevante ao indivíduo ela é reconsolidada, se a expressão desta memória não for mais relevante, esta memória não é apagada, e sim extinguida sua expressão devido à formação de uma nova memória que se sobrepõe à memória original.

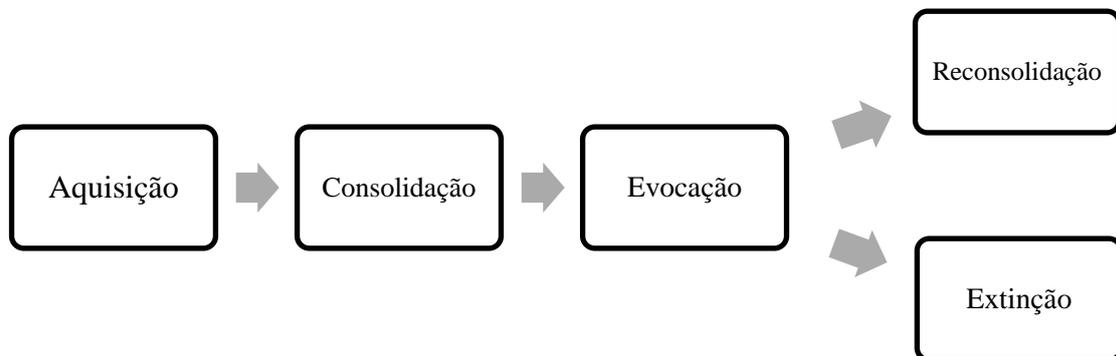


Figura 1 – Ilustração esquemática das fases da memória.

De modo geral, foi resumido por KANDEL (2012, p. 1441) que “o aprendizado refere-se à mudança no comportamento que resulta da aquisição do conhecimento sobre o mundo e a memória é o processo pelo qual o conhecimento é codificado, armazenado e mais tarde evocado”.

## 1.2 CLASSIFICAÇÃO DAS MEMÓRIAS

As memórias podem ser distinguidas didaticamente, baseando-se no tempo de duração e no seu conteúdo.

As *memórias de curta duração* são aquelas que duram de alguns minutos até algumas horas enquanto que as *memórias de longa duração* podem permanecer por dias, meses e anos.

Uma característica que chama a atenção entre estas memórias é que a memória de curta duração persiste pelo tempo necessário para a formação da memória de longa duração (IZQUIERDO, 2011), ou seja, ela mantém a função enquanto a memória de longa duração é consolidada. Apesar de usarem as mesmas estruturas nervosas, possuem mecanismos moleculares distintos.

Existe ainda um tipo de memória que persiste por menos tempo que a memória de curta duração, ela é chamada de *memória de trabalho*.

A *memória de trabalho* tem curtíssima duração e tem como função permitir que façamos nossas tarefas diárias. Como exemplo desta, podemos citar a leitura de um anúncio

qualquer, onde não poderíamos entender uma mensagem simples se ao ler uma palavra, esquecêssemos a anterior. Moduladas pelo córtex pré-frontal (IZQUIERDO, 2011), essas memórias não deixam traços duradouros no encéfalo.

Baseando-se em seu conteúdo, as memórias podem ser classificadas em *memórias declarativas* ou *não-declarativas*.

As *memórias declarativas* consistem em memórias que podem ser expressas verbalmente, podendo ainda ser divididas em memórias episódicas e memórias semânticas. As *memórias declarativas episódicas* são aquelas em que o sujeito vivenciou ou viu acontecer uma situação, do tipo, “joguei futebol com amigos na semana passada no campo da escola”. As *memórias declarativas semânticas* são consideradas aquelas de fatos ou conceitos, como “O quadrado da hipotenusa é igual à soma dos quadrados dos catetos”.

As memórias *não-declarativas* são as memórias procedimentais, ou seja, são aquelas que aprendemos de acordo com nossos hábitos e não precisamos dispor de grande atenção para expressá-las. Um exemplo clássico desse tipo de memória é andar de bicicleta, pois quando se sobe em uma, não é necessária uma evocação passo a passo para pedalar, esse movimento ocorre naturalmente.

### 1.3 ESQUECIMENTO

Considerando os fatos de uma maneira geral, o ato de esquecer é um processo natural e ocorre continuamente nas nossas vidas. Seria impossível armazenar toda a informação recebida através de nossos sentidos e que formaram uma efêmera memória de trabalho, por exemplo.

Além disso, esquecemos também de memórias que formaram arquivos em nossa mente que com o passar do tempo, não conseguimos mais evocar. A individualidade de todo ser é composta daquilo que é memorizado e também esquecido, pois o ato de esquecer também interfere em nosso comportamento. Deixamos de expressar também as memórias habitadas ou extintas, pois como anteriormente citado, a evocação dessas memórias é suprimida pela evocação de outra memória associada aquele contexto, mas pode ser recuperada se o resultado da ação for o mesmo da memória original.

## 1.4 AMNÉSIA

A *amnésia* é a perda parcial da memória que pode ou não estar associada com deficit cognitivo, se não estiver, é chamada de *amnésia dissociada* (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2008). A amnésia pode ser resultado de vários processos como concussão, acidente vascular cerebral, síndrome de *Korsakoff*, encefalite, tumor cerebral, entre outros. A amnesia pode ser dividida em duas classes, *amnésia retrógrada* e *amnésia anterógrada*.

A *amnésia retrógrada* está relacionada como a perda de memória para eventos anteriores ao trauma que a resultou, enquanto que a *amnésia anterógrada* é a incapacidade de formar novas memórias após um trauma.

Existe ainda a *amnésia global transitória*, que é caracterizada pela amnésia de episódios recentes, sejam anteriores ou posteriores ao fato que iniciou este processo, nesta forma de amnésia, o paciente fica desorientado, normalmente não sabendo o que aconteceu ou onde está. Este tipo de evento costuma ceder, e acaba deixando um espaço em branco na memória do indivíduo. A amnésia global transitória pode ser resultado de uma breve isquemia cerebral, ou de uma concussão craniana por trauma (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2008).

## 1.5 AMNÉSIA INFANTIL

O esquecimento e a inabilidade de expressar memórias de forma comportamental são comuns ao longo da vida, mas destaca-se a forma como isso ocorre no início de nosso desenvolvimento, um fenômeno chamado de *amnésia infantil* (CAMPBELL; CAMPBELL 1962).

Conforme IZQUIERDO (2011, p. 125) [...] toda a vida dos seres humanos se desenvolve fora da linguagem, num mundo pré-linguístico até os três anos de idade, aproximadamente [...] É, assim, inviável traduzir essas memórias infantis em termos de linguagem e trazê-las à tona [...] por isso as pessoas não conseguem evocar as memórias da primeira infância.

Apesar de não serem expressas, essas memórias adquiridas na infância deixam traços físicos que podem interferir nos aprendizados futuros e assim é amplamente aceito que memórias aversivas adquiridas na infância contribuem para o desenvolvimento de psicopatologias na vida adulta (TAYLOR *et al.*, 2011).

## 1.6 SISTEMA GLUTAMATÉRGICO

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central. Para realizar sua função excitatória, o glutamato necessita de seus receptores presentes nas sinapses e estes pertencem a duas famílias distintas, receptores *metabotrópicos* e *ionotrópicos*. Os receptores metabotrópicos, (mgluR 1-8) são receptores acoplados a proteína G e atuam por ação de segundos mensageiros que ativam cascatas de reações e produzem uma resposta pós-sináptica mais lenta (BRESSAN; PILOWSKI, 2003) . Já os receptores ionotrópicos (receptores AMPA, NMDA e Cainato), produzem uma resposta rápida logo após a entrada dos íons no neurônio pós-sináptico.

### 1.7 RECEPTORES NMDA (*N*-Metil-*D*-Aspartato)

Os receptores NMDA são canais iônicos heteromeros e tetraméricos formados pela assembléia de suas subunidades. As subunidades são divididas em três subfamílias de acordo com a homologia das suas sequências: GluN1, GluN2 (GluN2A-D) e GluN3 (GluN3A-B) (fig. 2). As propriedades biofísicas destes receptores podem ser alteradas conforme as diferentes subunidades presentes na sua formação.

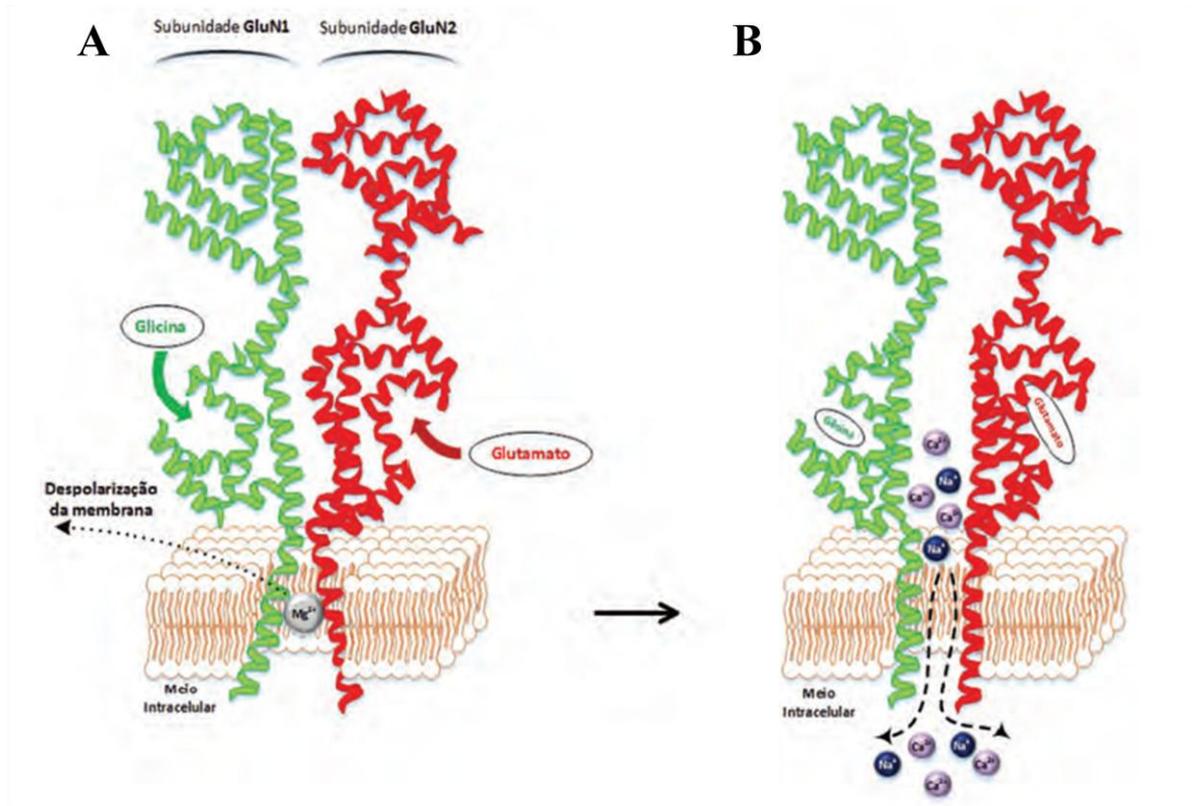


Figura 2 - Representação esquemática de um Receptor NMDA. Em **A** – Receptor antes da despolarização. Em **B** – Receptor depois da despolarização. Destaca-se os sítios de ligação para a glicina e glutamato. Adaptado de PEREIRA E SANTOS, 2014.

Classicamente, sabe-se que a formação da memória e a plasticidade sináptica, são dependentes dos receptores NMDA por estes permitirem o influxo de cálcio na célula pós-sináptica. O cálcio atua como segundo mensageiro induzindo a ativação de várias cascatas bioquímicas que levam a síntese proteica e ao fortalecimento sináptico.

O influxo de  $Ca^{2+}$  através destes receptores, só ocorre após uma despolarização da membrana da célula causada pelo influxo de  $Na^{+}$  viabilizados pelos receptores AMPA e do acoplamento da glicina e do glutamato em seus sítios no receptor (PEREIRA; SANTOS, 2014). Essa despolarização retira o íon  $Mg^{2+}$  do receptor NMDA e desobstrui o canal, tornando o receptor ativo.

Intervenções farmacológicas com antagonistas desses receptores prejudicam a aquisição e consolidação da memória, como foi demonstrado em alguns trabalhos (FANSELOW *et al.* 1994; CAIN *et al.* 1996; TSIEN, HUERTA; TONEGAWA 1996, CERCATO *et al.*, 2014).

## 1.8 APRENDIZADOS SUBSEQUENTES

Chamamos de *aprendizados subsequentes*, a memória que é formada após o animal já possuir um aprendizado prévio. Ainda há poucos estudos avaliando como as memórias pré-existentes interferem nos aprendizados subsequentes.

Como antes mencionado, para que uma memória seja formada, é necessário que os receptores NMDA sejam ativados induzindo cascatas de sinalização que levarão a indução de uma *potenciação de longa duração* (do inglês, LTP), a qual é o substrato neurobiológico do aprendizado e do armazenamento da memória (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2008). Porém, um segundo aprendizado pode ocorrer sem a necessidade da ativação dos receptores NMDA.

Um experimento que usou a tarefa de esQUIVA inibitória, mostrou que os ratos não retêm a memória da tarefa, se forem infundidos bilateralmente via intra-hipocampo com o antagonista dos receptores NMDA AP5 (Ácido 2-amino-5-fosfopentanóico), imediatamente após o treino e testados um dia depois. Em compensação, ratos pré-treinados ou pré-expostos ao aparato, tem o efeito amnésico da infusão de AP5 evitado (fig. 3) (ROESLER *et al.*, 1998).

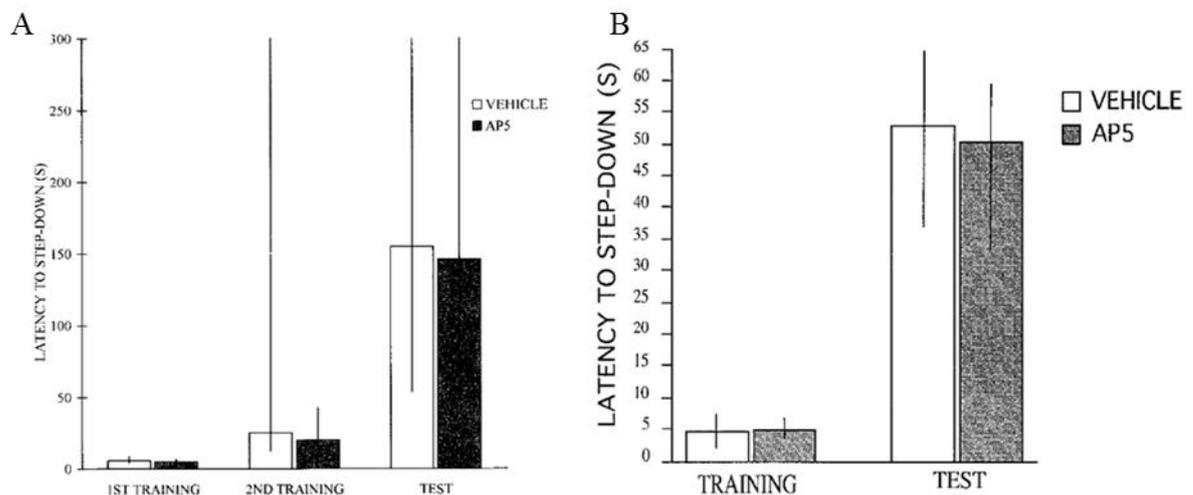


Figura 3 - Em A, resultados dos ratos pré-treinados. Em B, resultado dos animais pré-expostos, ambos mostrando que os animais aprendem a tarefa mesmo após infusão intra-hipocampal de AP5. Adaptado de ROESLER *et al.* 1998.

A independência dos receptores NMDA para formação dos aprendizados subsequentes foi mostrada não somente na tarefa de esQUIVA inibitória, mas também no labirinto aquático de Morris (BANNERMAN *et al.*, 1995) e no condicionamento aversivo ao contexto (SANDERS; FANSELOW 2003).

Outros trabalhos também mostraram que animais treinados previamente em um contexto, podem formar uma memória para um segundo contexto sem a ativação dos receptores NMDA (WILTGEN *et al.*, 2010; TAYLER *et al.*, 2011).

Nestes experimentos que avaliaram os segundos aprendizados independentes dos receptores NMDA, foram percebidas algumas condições para que este tipo de fenômeno ocorresse. Um trabalho avaliou se o aprendizado da tarefa no labirinto aquático de Morris também induziria este resultado na tarefa de condicionamento aversivo ao contexto, já que as duas tarefas recrutam as mesmas estruturas encefálicas para formar a memória (fig. 4). Com os resultados, foi mostrado que apenas os animais que passaram por treinamento na tarefa de condicionamento aversivo ao contexto (este levemente modificado), conseguiram formar o segundo aprendizado independente dos receptores NMDA (WILTGEN *et al.*, 2011). Com isso sugere-se que apesar de recrutarem as mesmas estruturas encefálicas, as tarefas formam esquemas diferentes, ou seja, o traço deixado pelo primeiro aprendizado auxilia no aprendizado de uma tarefa que tenha alguma semelhança com a memória original, mas não interfere se o exercício for muito diverso, voltando este a ser dependente dos receptores NMDA.

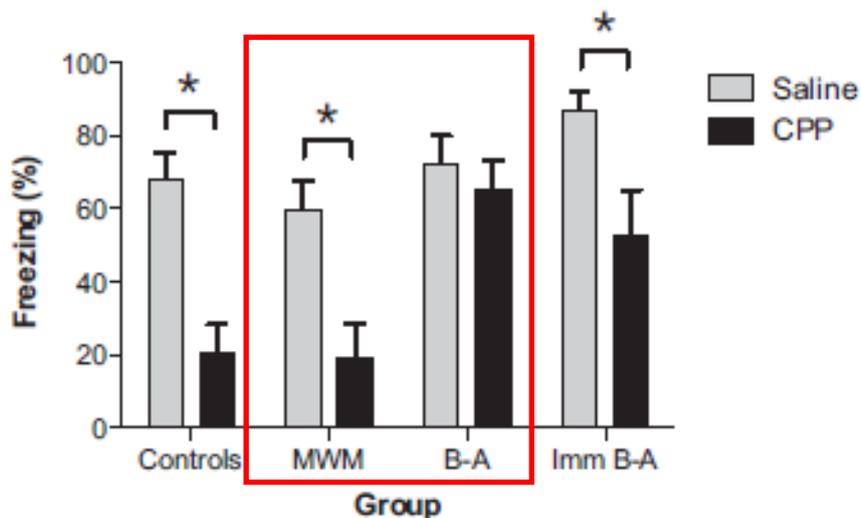


Figura 4 -. Teste no CAC após treinamento em diferentes tratamentos com infusão de CPP, antagonista dos receptores NMDA, após o treino. Mostrando que apenas os animais que passaram pelo CAC (Grupo B-A) aprenderam a segunda tarefa após o bloqueio dos receptores NMDA. (\*)  $P > 0,05$ . Adaptado de WILTGEN *et al.* 2011.

Todos os experimentos citados até agora, foram conduzidos em animais adultos, aos quais é conhecida a capacidade de formar memórias que persistem por longo período. Já animais muito jovens sofrem a influência da amnésia infantil.

Levando em consideração este tipo de amnésia, foram realizados experimentos em ratos de 17 dias de vida, onde estes passaram por uma experiência de condicionamento aversivo ao contexto. Foi demonstrado que os animais não lembram desta tarefa em teste realizado 10 dias após o treino (esse tipo de memória pode durar vários meses em animais adultos). Em um segundo treinamento, conduzido após o esquecimento, os animais são capazes de aprender essa tarefa mesmo sob efeito do antagonista dos receptores NMDA, MK801 (CHAN; BAKER; RICHARDSON, 2014). Esses resultados sugerem que apesar da amnésia infantil, os mecanismos moleculares ainda são independentes dos receptores NMDA, apontando a existência de um traço físico da memória, apesar de os animais não poderem mais evocá-la.

## 2 JUSTIFICATIVA

Ainda não há uma explicação exata de como essas memórias que não podem ser evocadas interferem nos aprendizados futuros, por isso é importante investigar os mecanismos biológicos por trás desse fenômeno, a fim de entender como essas memórias facilitariam, por exemplo, a formação de memórias mal adaptativas que levam ao desenvolvimento de psicopatologias como o transtorno de estresse pós-traumático. Um trabalho que avaliou crianças que sofreram estresse precoce, (neste caso, crianças que viveram em orfanatos nos primeiros dois anos de vida), mostrou que elas são mais suscetíveis a quadros de depressão na adolescência, (GOFF *et al.* 2013).

Foi publicado um estudo por nosso laboratório que avaliou a manutenção da memória da tarefa de localização de objetos em 1, 3, 5 e 7 dias após o treino. Ficou demonstrado que os animais esquecem essa tarefa dentro de cinco dias após o treino (SACHSER *et al.* 2016).

Contudo, ainda não há registro na literatura de algum trabalho que tenha avaliado os aprendizados subsequentes na tarefa de localização de objetos. Fizemos uso dessa tarefa por ela formar uma memória que não persiste, ou seja, é esquecida após alguns dias.

Desse modo, visamos avaliar qual é a natureza da amnésia. Queremos esclarecer se a amnésia é decorrente do enfraquecimento do traço físico da memória original (deficit de aquisição), fazendo com que o aprendizado subsequente seja novamente *dependente* dos receptores NMDA, ou decorrente de um deficit de evocação, mantendo o aprendizado *independente* dos receptores NMDA.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVOS GERAIS**

Avaliar se após o esquecimento de uma tarefa de localização de objeto, o segundo aprendizado volta a ser dependente dos receptores NMDA.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Verificar o aprendizado da tarefa de localização de objeto no contexto A, um dia após o treino;
2. Verificar a persistência do aprendizado da tarefa de localização de objeto no contexto A, cinco dias após o treino;
3. Avaliar o aprendizado subsequente na tarefa de localização de objeto no contexto B, após bloqueio dos receptores NMDA.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

Foram utilizados nestes experimentos ratos wistar machos adultos pesando entre 250-400g. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais foram mantidos no ratário do Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação em caixas plásticas contendo cinco animais cada, com temperatura ambiente entre 20–22°C, ciclo de 12 horas claro/ 12 horas escuro e com comida e água *ad libitum*.

### 4.2 PROCEDIMENTOS COMPORTAMENTAIS

Para a realização da tarefa de localização de objeto, foi usada uma arena quadrada de cor preta, feita de madeira, medindo (60 x 60 x 60 cm). Foram utilizados dois contextos, contexto A e contexto B.

No contexto A (fig. 5), esta arena possuía dicas visuais em suas paredes e os objetos explorados foram latas metálicas com superfície lisa, de forma retangular com os vértices arredondados.



Figura 5 - Imagem capturada pela câmera montada sobre o aparato, mostrando o contexto A.

No contexto B (fig. 6), a mesma arena possuía outras dicas visuais em suas paredes, sendo que em uma das paredes foi colocada uma superfície áspera. Além disso, a base da arena foi coberta com maravalha e os objetos foram substituídos por potes plásticos com tamanho e formato diverso do utilizado no contexto A.



Figura 6 - Imagem capturada pela câmera montada sobre o aparato, mostrando o contexto B.

Os animais passaram por sessões de habituações, treinos e testes para a realização desta tarefa conforme descrição abaixo.

**Habituação:** Os animais eram deixados explorando livremente a arena por 10 minutos, sem nenhum objeto no interior, apenas para o animal ambientar-se com as dicas visuais da arena e da sala do experimento.

**Treino:** os animais eram deixados explorando livremente a arena por 10 minutos, na presença de dois objetos, para que os animais pudessem reconhecer e aprender sua localização.

**Teste:** os animais eram deixados explorando livremente a arena por 5 minutos, na presença dos mesmos objetos, onde um dos objetos era deslocado para um local diverso do treino para que eles pudessem reconhecer e aprender sua nova localização.

Sobre o aparato, foi colocada uma câmera de vídeo que registrou os treinos e testes, com a finalidade de contabilizar o tempo de exploração de cada objeto.

A exploração dos objetos levada em consideração para o cálculo dos índices de exploração foram apenas os atos de farejar, observar e encostar com as patas anteriores os objetos alvos.

O índice de exploração consiste da somatória de tempo gasto na exploração do objeto que muda de lugar (ML), dividido pela soma das explorações no objeto que muda de lugar e objeto que não muda de lugar (NML). Resumidamente  $ML/(ML+NML)$ .

#### 4.3 DESENHO EXPERIMENTAL

##### 1. Verificação do aprendizado na tarefa de localização de objeto no contexto A:

Para isso, os animais passaram por duas sessões de habituação, uma sessão por dia seguido de uma sessão treino e uma sessão teste, separados também por um dia, cada sessão (fig. 7).

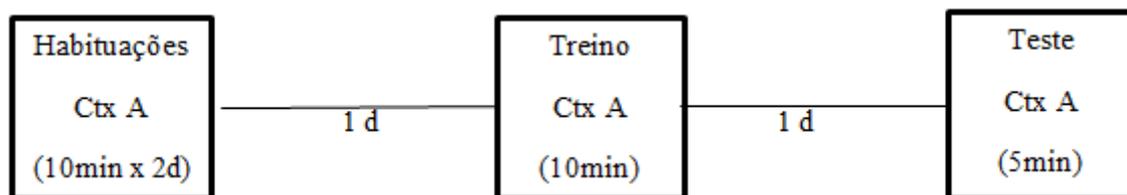


Figura 7 - Desenho esquemático para a verificação do aprendizado.

##### 2. Verificação da persistência do aprendizado na tarefa de localização de objeto no contexto A:

Para verificar a persistência, os animais também passaram por duas sessões de habituação, seguidos de uma sessão treino no dia seguinte a última habituação. O teste foi realizado cinco dias após o treino (fig. 8).

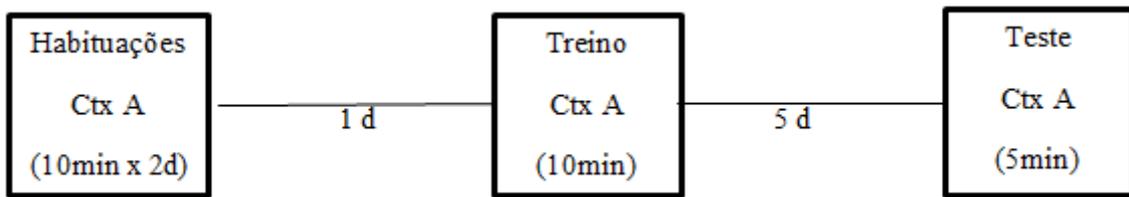


Figura 8 - Desenho esquemático para a verificação da persistência da memória.

3. *Avaliação do aprendizado subsequente na tarefa de localização de objeto no contexto B, após o bloqueio dos receptores NMDA.*

Para esta avaliação, os animais passaram pelo experimento anterior, com teste no 5º dia após o treino. Um dia depois, passaram por duas habituações, já no contexto B, seguidas de um treino, onde foram injetados 30 minutos antes o fármaco MK-801 ou seu veículo e um teste, também separados pelo período de um dia (fig. 9).

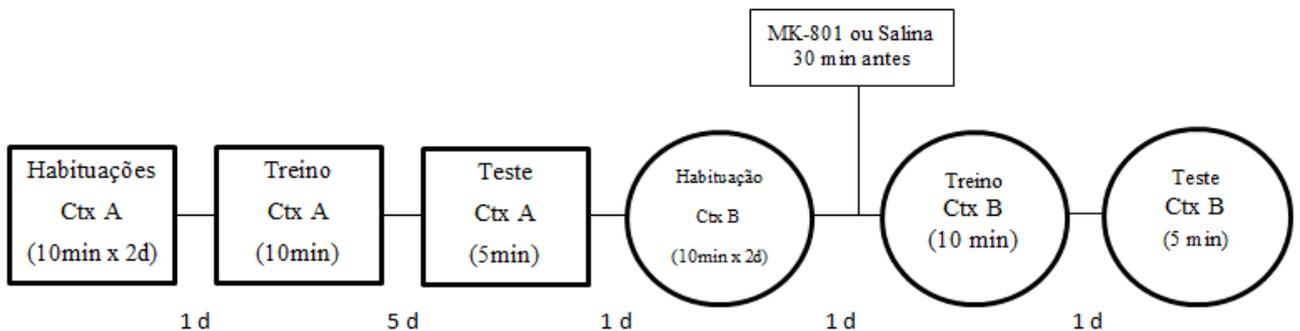


Figura 9 - Desenho esquemático para verificação do aprendizado subsequente.

#### 4.4 FÁRMACO

Foi utilizado o antagonista dos receptores NMDA, MK-801 (Sigma) (0,1 mg/kg) dissolvido em 0,9% de salina isotônica estéril. A droga foi injetada intraperitonealmente, 30 minutos antes do treino no contexto B. Os ratos do grupo controle foram injetados, com a mesma quantidade e da mesma forma que o grupo MK-801, com salina isotônica estéril.

Sessão em embargo enquanto o artigo não estiver publicado.

Sessão em embargo enquanto o artigo não estiver publicado.

Sessão em embargo enquanto o artigo não estiver publicado.

Sessão em embargo enquanto o artigo não estiver publicado.

Sessão em embargo enquanto o artigo não estiver publicado.

Sessão em embargo enquanto o artigo não estiver publicado.

## 7 CONCLUSÃO

1. Foi constatado que o protocolo não foi totalmente efetivo para que os animais aprendessem a tarefa de localização de objeto no contexto A;
2. Foi verificado que após 5 dias, os animais não conseguem diferenciar os objetos, ou seja, não lembram da tarefa;
3. No contexto B, o grupo salina não foi capaz de aprender a tarefa, enquanto que o grupo MK-801 mostrou êxito na tarefa.

Portanto, vimos que o protocolo necessita de ajustes, mas os resultados são promissores. Se obtivermos o resultado de que os aprendizados subsequentes na tarefa de localização de objeto, é independente da ativação dos receptores NMDA, usando injeções sistêmicas, isso possibilitaria experimentos futuros que ajudariam na compreensão da natureza destas memórias, que apesar de não serem evocadas, ainda interferem em novos aprendizados, uma vez que existem traços persistentes.

## 8 REFERÊNCIAS

BANNERMAN, D. M., GOOD, M. A., BUTCHER, S. P., RAMSAY, M., & MORRIS, R. G. Distinct components of spatial learning revealed by prior training and NMDA receptor blockade. **Nature**. v. 378, p. 182–186, 1995.

BEAR, M. F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. Desvendando o sistema nervoso. Terceira edição. Porto Alegre: Artmed, 2008.

BRESSAN, RODRIGO A.; PILOWSKI LYN S. Hipótese glutamatérgica da esquizofrenia. **Revista Brasileira de Psiquiatria**. v. 25, p. 177-183, 2003.

CAIN, D. P.; SAUCIER, D.; HALL, J.; HARGREAVES, E. L.; BOON, F. Detailed behavioral analysis of water maze acquisition under APV or CNQX: Contribution of sensorimotor disturbances to drug-induced acquisition deficits. **Behavioral Neuroscience**. v. 110, p. 86–102, 1996.

CAMPBELL, B.A.; CAMPBELL, E.H. Retention and extinction of learned fear in infant and adult rats. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**. v. 55, p. 1–8, 1962.

CERCATO, M. C.; COLETTIS, N.; SNITCOFSKY, M.; AGUIRRE, A. I.; KORNISIUK, E. E.; BAEZ, M.V.; JERUSALINSKY, D. A. Hippocampal NMDA receptors and the previous experience effect on memory. **Journal of Physiology**. v. 108, p. 263–269, 2014.

CHAN, D.; BAKER, K.D.; RICHARDSON, R.. Relearning a context-shock association after forgetting is an NMDAr-independent process. **Physiology & Behavior**. v. 148, p. 29–35, 2014.

FANSELOW, M. S.; KIM, J. J.; YIPP, J.; DE OCA, B. Differential effects of the N-methyl-D-aspartate antagonist DL-2-amino-5-phosphonovalerate on acquisition of fear of auditory and contextual cues. **Behavioral Neuroscience**. v. 108, p. 235–240, 1994.

GOFF, B.; GEE, D.G.; TELZER, E.H.; HUMPHREYS, K.L.; GABARD-DURNAM, L.; FLANNERY, J.; TOTTENHAM, N.. Reduced nucleus accumbens reactivity and adolescent depression following early-life stress. **Neuroscience**. v. 249, p. 129–138, 2013.

IZQUIERDO, I. Memória. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M.; SIEGELBAUM, S. A.; HUDSPETH, A.J. Principles of neural science. Fifth edition. New York: McGrill-Hill, 2012.

PEREIRA, N. A. L.; SANTOS, M. M. M. Antagonistas do Receptor NMDA: três décadas de evolução no combate às doenças neurodegenerativas. **Revista Portuguesa de Química**. v. 135, p. 55-60, 2014.

ROESLER, R.; VIANNA, M.; SANT'ANNA, M. K.; KUYVEN, C. R.; KRUEL, A. V.; QUEVEDO, J.; FERREIRA, M. B.. Intrahippocampal infusion of the NMDA receptor antagonist AP5 impairs retention of an inhibitory avoidance task: Protection from impairment by pretraining or preexposure to the task apparatus. **Neurobiology of Learning and Memory**. v. 69, p. 87–91, 1998.

SACHSER, R.M.; SANTANA, F.; CRESTANI, A.P.; LUNARDI, P.; PEDRAZA, L.K.; QUILLFELDT, J.A.; HARDT, O.; DE OLIVEIRA ALVARES, L.. Forgetting of long-term memory requires activation of NMDA receptors, L-type voltagedependent Ca<sup>2+</sup> channels, and calcineurin. **Scientific Reports**. 6, número do artigo 22771, 2016.

TAYLER, K. K.; LOWRY, E.; TANAKA, K.; LEVY, B.; REIJMERS, L.; MAYFORD, M.; WILTGEN, B. J. Characterization of NMDAR-independent learning in the hippocampus. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**. v. 5, art. 28, 2011.

TAYLOR, S.E; WAY, B.M; SEEMAN, T.E. Early adversity and adult health outcomes. **Development and Psychopathology**. v. 23 p. 939–954, 2011.

TSIEN, J. Z.; HUERTA, P. T.; TONEGAWA, S. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. **Cell**. v. 87, p. 1327–1338, 1996.

WILTGEN, B. J.; ROYLE, G. A.; GRAY, E. E.; ABDIPRANOTO, A.; THANGTHAENG, N.; JACOBS, N.; VISSEL, B.. A role for calcium-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and learning. **PLoS ONE**. v. 5 e12818, 2010.

WILTGEN, B.J.; WOOD, A.N.; LEVY, B. The cellular mechanisms of memory are modified by experience. **Learning & memory**. v. 18, p. 747-750, 2011.