

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

EFEITO FACILITADOR DA NIFEDIPINA , BLOQUEADOR
DE CANAIS DE CÁLCIO VOLTAGEM-DEPENDENTES DO
TIPO L, SOBRE A MEMÓRIA DE ESQUIVA INIBITÓRIA
QUANDO ADMINISTRADA NO HIPOCAMPO DE RATOS

MÔNICA RYFF MOREIRA ROCA VIANNA

Orientador:
Prof. JORGE ALBERTO QUILLFELDT

Dissertação apresentada ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, como
requisito para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas com
Ênfase em Biofísica.

Porto Alegre,
Dezembro de 1997

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que auxiliaram na elaboração deste trabalho,

À coordenação do curso de Bacharelado em Biofísica, pela oportunidade;

Ao Prof. Dr. Jorge Alberto Quillfeldt, pela orientação;

A Prof^ª. Dr^ª. Maria Beatriz Ferreira, pelos ensinamentos;

A todos que participaram deste trabalho, especialmente a Doriana Daroit, João Quevedo, Rafael Roesler, Antônio Born e Renato Kuyven, pelo indispensável auxílio e amizade;

Aos demais colegas do Laboratório de Psicobiologia e Neurocomputação, Lucas F. de Oliveira, Gabriel Arisi, Amâncio Oliveira, pelo estímulo e amizade;

Às minhas grandes amigas, Letícia Reichert e Patrícia Tobo, pelo apoio e amizade;

A todos os colegas dos Departamentos de Biofísica, Bioquímica e Farmacologia;

Aos funcionários da Biblioteca do Instituto de Biociências;

Ao CNPq e à FAPERGS, pelas bolsas concedidas.

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 MEMÓRIA	1
1.1.1 Conceituação	1
1.1.2 As fases da memória	2
1.1.3 Características anatômicas	3
1.1.4 Bases moleculares da memória	6
1.2 CANAIS DE CÁLCIO VOLTAGEM-DEPENDENTES	8
1.2.1 O íon cálcio	8
1.2.2 Canais de cálcio voltagem-dependentes	10
1.2.2.1 Canais ativados por pequenas variações de voltagem	11
1.2.2.2 Canais ativados por grandes variações de voltagem	11
1.2.2.3 Estrutura molecular e composição dos canais de cálcio voltagem dependentes do tipo L	13
1.2.3 As 1,4-Dihidropiridinas	16
2 – OBJETIVOS	21
3 – MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	22
3.2 CIRURGIA PARA IMPLANTAÇÃO DE CÂNULAS-GUIAS	22
3.3 PROCEDIMENTOS COMPORTAMENTAIS	23
3.4 PREPARAÇÃO E ADMINISTRAÇÃO DAS DROGAS	25
3.5 ANÁLISE MESOSCÓPICA	26
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	27
4 – RESULTADOS	28
4.1 AVALIAÇÃO DO APRENDIZADO DOS ANIMAIS	28
4.2 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE NIFEDIPINA IMEDITAMENTE APÓS O TREINO	29
4.3 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE NIFEDIPINA TRINTA MINUTOS APÓS A SESSÃO DE TREINO	30
5 – DISCUSSÃO	34
6 – CONCLUSÕES	40
7 - BIBLIOGRAFIA	41

Os resultados deste trabalho serão publicados no artigo "L-type voltage-dependent calcium channel blocker Nifedipine enhances memory when infused into the hippocampus" na revista *Neurobiology of Learning and Memory*.

RESUMO

Existem várias evidências do efeito benéfico que as dihidropiridinas, bloqueadores dos canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo L, têm sobre a capacidade cognitiva de indivíduos que sofreram desordens do sistema nervoso central como isquemia, doenças degenerativas, lesões e ainda aqueles que apresentam déficits de memória decorrentes da velhice. Por outro lado, os efeitos destas drogas sobre a capacidade cognitiva de animais neurologicamente intactos é bastante contraditória. Várias hipóteses tentam explicar o mecanismo de ação que suporta estes efeitos, embora nenhum trabalho até agora tenha sido capaz de apontar uma resposta definitiva para a base de tais efeitos.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da administração intrahipocampal de Nifedipina, uma dihidropiridina, sobre a memória de ratos adultos neurologicamente intactos na tarefa de esQUIVA inibitória. Para isto ratos wistar fêmeas foram bilateralmente canulados na região CA1 do hipocampo dorsal. Através das cânulas os animais receberam microinfusões de 0,5µl de Nifedipina nas concentrações de 28ng ou 280ng ou seu veículo (20% dimetilsulfóxido em salina). Os animais foram submetidos a sessões de treino e de teste na tarefa de esQUIVA inibitória, com um intervalo de 24 horas, e o efeito das drogas sobre a memória desta tarefa foi avaliada com administrações em diferentes tempos: 10 minutos antes do treino, imediatamente após ou ainda trinta minutos após o treino.

Os resultados obtidos confirmaram o efeito nootrópico das dihidropiridinas anteriormente descrito em animais adultos normais (Levy, 1991; McMonagle-Strucko, 1993; Quatermain, 1993), pois quando injetada imediatamente após a sessão de aprendizado a dose mais alta de nifedipina facilitou significativamente a memória dos animais em relação a seus controles.

Embora o mecanismo responsável por este efeito continue desconhecido, nossos resultados contribuem para delimitar os possíveis processos envolvidos. Devido às dimensões da área atingida pela microinfusão e à restrita vascularização presente no local, é extremamente improvável que o efeito vasodilatador, no qual baseia-se uma das atuais propostas de mecanismo, seja responsável por uma resposta tão intensa.

Outros estudos que busquem elucidar o mecanismo de ação destas drogas serão de grande importância devido ao grande potencial terapêutico que estas apresentam.

1- INTRODUÇÃO

1.1 MEMÓRIA

1.1.1 *Conceituação*

“Dentre os vários mecanismos de adaptação, um dos mais importantes é a capacidade que os organismos têm de aprender.” (McGaugh, 1971)

A capacidade de armazenar experiências decorre da necessidade dos indivíduos comportarem-se adequadamente frente a situações relevantes para suas sobrevivências quando apresentadas pelo ambiente. Tal adaptação requer, portanto, que os organismos sejam capazes não apenas de adquirir e armazenar, mas também de evocar as informações quando necessário.

Desta forma podemos definir memória como o traço duradouro deixado no cérebro de um animal por uma experiência (McGaugh, 1971).

Este traço deverá ser tão intenso quanto relevante for a experiência/informação adquirida, pois não faz sentido do ponto de vista econômico ou adaptativo que qualquer nova informação à qual o animal for exposto seja armazenada. Ao contrário de algumas experiências de extrema importância para sua sobrevivência, que não devem ser esquecidas. Por isso sistemas que modulem o armazenamento da memória são tão importantes quanto aqueles mecanismos que realmente armazenem a informação.

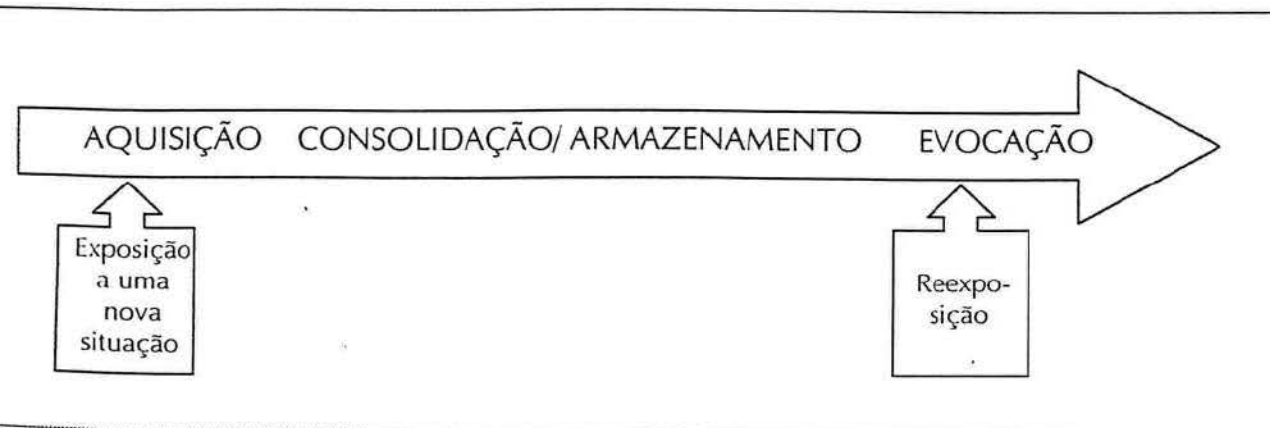
O conceito de modulação da memória tem sido objeto de interesse de muitos pesquisadores nas últimas três décadas, ao longo das quais muitas descobertas relevantes foram feitas. O fato de memórias recém formadas serem extremamente lábeis e passíveis de serem “aumentadas” ou “diminuídas” com tratamentos de diferentes naturezas logo após ter ocorrido o aprendizado, apontam para sistemas endógenos capazes de influenciar os processos de consolidação da memória.

Descobertas relativamente recentes têm confirmado isto, e um grande número de sistemas modulatórios, tanto centrais quanto periféricos têm sido descritos capazes de alterar a formação de memórias em intervalos recentes após o aprendizado. Dentre estes sistemas, os hormônios relacionados com o estresse, o complexo amigdalóide e sistemas de neurotransmissores como dopaminérgico, colinérgico, serotoninérgico, opióide, adrenérgico e outros já tiveram sua participação como moduladores caracterizada (McGaugh, 1996; Aigner, 1995; Izquierdo, 1995).

1.1.2 As fases da memória

O processo que envolve desde o aprendizado até a evocação de uma memória pode ser dividido em fases, que também apresentam características bioquímicas, anatômicas e fisiológicas distinguíveis (McGaugh, 1971; Izquierdo, 1995; Quillfeldt, 1994). Estas fases são a aquisição e a consolidação do traço (que juntas compreendem o que chamamos de formação da memória), o armazenamento, que pode ser simultâneo à consolidação, e a evocação (caracterizada pela alteração de um comportamento, única maneira pela qual pode-se confirmar que houve o aprendizado e que foi estabelecida a memória). A figura 1 apresenta um esquema disto

Figura 1 Representação Esquemática das Etapas do Processamento da Memória



Embora tenha estágios caracterizados, a memória é passível de constante transformação, seja por estímulos diretamente relacionados com o episódio de aprendizado, como a repetição da mesma situação, seja por associações de outras informações aprendidas.

O conteúdo de uma determinada experiência pode ser grandemente alterado, das mais variadas formas, caso algumas destas etapas sejam manipuladas. Pode-se, por exemplo, afetar a memória de uma experiência atuando sobre as diferentes fases, de acordo com o momento em que ocorrer a manipulação. A aquisição pode ser afetada por tratamentos dados antes da exposição à situação de aprendizado, a consolidação pode ser manipulada nos primeiros momentos depois do aprendizado e, por fim, a evocação pode ser até bloqueada com a interferência minutos antes da sessão na qual o animal deverá lembrar.

Estratégias como estas, utilizando manipulações farmacológicas, são muito úteis para estabelecermos quais os componentes bioquímicos que atuam em cada etapa do processo.

1.1.3 Características anatômicas

O tema da localização do traço mnemônico também têm sido objeto de estudo há muitas décadas. Devido à heterogeneidade das memórias, não apenas em parâmetros como os descritos anteriormente, mas também em relação ao conteúdo de cada uma, dificilmente estariam permanentemente localizados em uma única estrutura do cérebro.

A busca pela localização física da memória, o *engrama*, existe há mais de um século.

Na virada do século passado o famoso fisiólogo russo Ivan Pavlov, descobridor do reflexo condicionado, afirmava que os processos cognitivos estavam, todos, restritos ao neocórtex. Já na década de 20 Karl Lashley tentava descobrir a contribuição de diferentes regiões do córtex para o aprendizado

fazendo lesões seletivas no neocórtex de ratos, e postulou o princípio da equipotencialidade, defendendo que todas as áreas corticais contribuíam para a formação da memória. Algumas décadas depois, Hebb, aluno de Lashley, propunha que o traço de uma memória podia estar localizado nas conexões entre células nervosas associadas, e que a amnésia observada por Lashley com suas lesões devia-se ao rompimento da associação entre elas.

Apenas alguns anos mais tarde surgiam indícios da importância do Lobo Temporal para a memória, com o caso do paciente H.M., na década de 50 e 60. Devido à epilepsia H.M. foi submetido a uma cirurgia na qual parte do córtex, hipocampo e amígdala foram removidos, resultando em uma severa amnésica anterógrada. Contudo, pouco de sua memória dos anos que precederam a cirurgia foi afetado. Este paciente, um dos casos mais famosos e bem descritos de déficits cognitivos resultantes da remoção dos lobos temporais mediais de ambos hemisférios, serviu como base para muitos estudos realizados desde então.

Estudos subseqüentes identificaram estruturas como do Lobo Temporal (como hipocampo e córtex entorrinal) e outras regiões com estas intimamente conectadas, como o córtex parietal, como cruciais para a formação, manutenção e expressão de memórias declarativas (Izquierdo, 1996). Porém, as contribuições de tais estruturas e regiões específicas, que interconectam-se por diferentes vias aferentes e eferentes, não são idênticas, desempenhando papéis diversos e em diferentes etapas do aprendizado e da memória.

A amígdala atua principalmente no processamento do componente emocional da memória (Gallagher & Chiba, 1996; Cahill, 1996) predominantemente aversivo, e também alerta. O septo medial, por sua vez, contribui com o processamento de memórias espaciais (junto com o hipocampo) e aversivas (junto com a amígdala). Esta região, aliada a demais regiões do neocórtex com as quais se comunica, têm papel importante no processamento de memórias do tipo memória de trabalho.

O córtex entorrinal, que junto com o hipocampo é uma das áreas iniciais e de maior acúmulo das placas neurofibrilares que caracterizam doenças neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer (que é acompanhada por

grande perda cognitiva), é uma região de grande importância para o processamento de variados tipos de memórias, e intimamente conectado ao complexo hipocampal (Kandel, 1991).

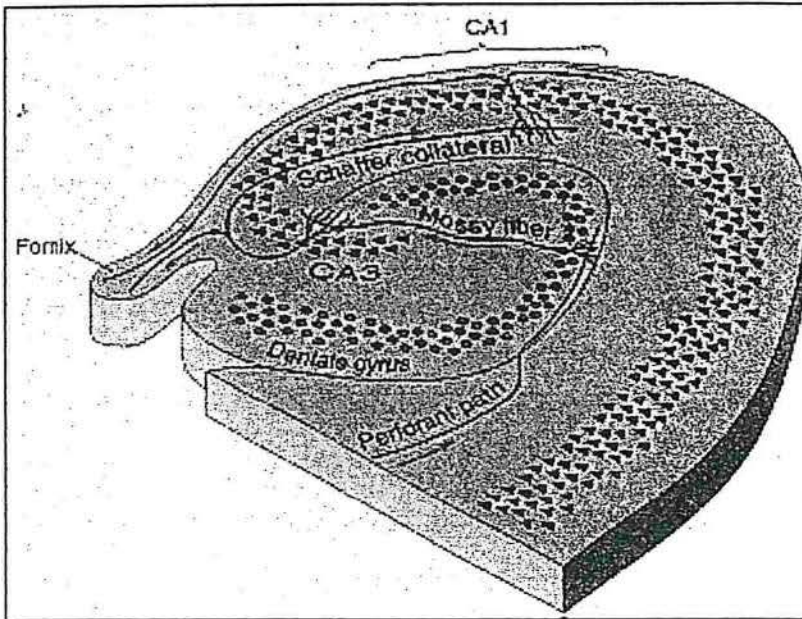
O Hipocampo, que acredita-se ser a estrutura-chave para a memória, é crucial para o processamento de memórias dos mais diversos tipos, desde informações espaciais e contextuais, até aquelas memórias que envolvem reflexões conscientes em humanos (Eichenbaum, 1996a; Eichenbaum, 1996b)

Lesões no hipocampo em humanos resultam em amnésia para todos os tipos de informações, tanto declarativas quanto proceduais. Atualmente também é aceito que esta estrutura temporal em animais processe memórias não apenas de caráter espacial, como acreditou-se por muito tempo. A noção de que o hipocampo tinha papel restrito à memória espacial devia-se, especialmente, à algumas características surpreendentes dos neurônios hipocampais identificadas por Jonh O'Keefe e outros pesquisadores. Com estudos que iniciaram-se na década de 70 O'Keefe demonstrou que muitos neurônios do hipocampo respondem seletivamente de acordo com a localização do rato no ambiente.

Outras regiões do neocórtex, como Córtex Parietal, Cingulado e Pré-frontal e algumas regiões subcorticais, como o Núcleo Caudado, têm sido apontadas como estruturas que também contribuem no processamento e armazenamento de memórias. A própria coluna vertebral é essencial para o aprendizado e evocação de reflexos condicionados.

Estes e outros argumentos suportam o conceito atual de que a memória é um fenômeno plástico que, ao longo das diferentes fases de seu processamento, envolve tanto regiões do neocórtex, como acreditava-se no início do século, e também estruturas subcorticais.

Figura 2 - Desenho esquemático do hipocampo



Fonte: Bear, Connors & Paradiso, 1995.

1.1.4 Bases moleculares da memória

Na busca do mecanismo fisiológico da memória algumas teorias foram propostas ao longo dos anos, tentando explicar como os indivíduos armazenam novas informações. Muitos acreditam que esta busca esteja encerrada desde que a descrição, há mais de 20 anos atrás, de um fenômeno chamado Potenciação de Longa Duração, ou LTP (do inglês "Long-Term potentiation").

A LTP, descoberta por Bliss e Lomo em 1966 e descrita com detalhe pelos mesmos autores em 1973 como um aumento nas respostas excitatórias pós-sinápticas do hipocampo, adequa-se perfeitamente ao tipo de modificação que o aprendizado deve produzir no cérebro de um animal. A LTP, assim como a memória, está relacionada com a atividade hipocampal, é rapidamente induzida e dura por um longo período, podendo ser novamente expressa em resposta a reiteração do estímulo inicial (Bliss & Collingridge, 1993).

Nos anos que seguiram a sua descrição muitas outras características comuns aos dois processos – LTP e memória – foram estabelecidas (Bliss e Collingridge, 1993; Eichenbaum, 1995; Izquierdo, 1995; Izquierdo, 1996).

Algumas das mais fortes evidências de ligação entre LTP e memória vêm de trabalhos nos quais o bloqueio da LTP resulta em severo prejuízo para a memória. Além disto, as propriedades que caracterizam a LTP, como a cooperatividade, a associatividade e o fato de ser um fenômeno sinapse-específico tornam-na um modelo extremamente adequado (Bliss & Collingridge, 1993).

Atualmente a idéia inicial de que a LTP seria a representação da memória a nível celular foi superada, mas resta a noção de que estes dois fenômenos plásticos têm muito em comum e que, ao menos para alguns tipos de memória, podem depender dos mesmos mecanismos.

Embora a natureza do engrama esteja apenas começando a ser conhecida, muito componentes envolvidos no processo de aprendizado já foram caracterizados, como os sistemas de neurotransmissores, as cascatas de segundos mensageiros envolvidos, as enzimas que são ativadas e elementos que possivelmente são os responsáveis pela manutenção da memória a longo prazo.

Desde que Morris e colaboradores demonstraram, em 1986, que a administração intracerebro-ventricular de D-2-amino-5-fosfonevalerato (AP5), um antagonista dos receptores glutamatérgicos do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), também capaz de bloquear a indução da LTP, impedia o aprendizado de ratos na tarefa de labirinto aquático, vários outros autores confirmaram o envolvimento do sistema de receptores glutamatérgicos no aprendizado. Em realidade a transmissão sináptica excitatória no hipocampo é mediada por receptores glutamatérgicos, e a ativação dos receptores do tipo Alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4 isoxazola ácido propínico (AMPA) em resposta ao estímulo do neurônio pós-sináptico é o passo desencadeador do processo. A ativação dos receptores AMPA permite a entrada de íons Na^+ no terminal pós-sináptico, e a despolarização resultante, junto às moléculas de glutamato liberadas do terminal pré-sináptico atuam ativando também os receptores do tipo NMDA. Os

receptores NMDA, por sua vez, quando ativados por estes dois fatores permitem a entrada de cálcio no neurônio pós-sináptico.

A elevação das concentrações de cálcio intracelular mediadas por este mecanismo é suficiente para a indução da LTP, assim como para a ativação de proteínas quinases e outras enzimas que serão responsáveis pela durabilidade do processo (Ghosh, 1995; Simpson, 1995).

Os eventos desencadeados pela entrada massiva de cálcio no terminal pós-sináptico vão ainda além, atuando positivamente também sobre o terminal pré-sináptico, via mensageiros sinápticos, estimulando a liberação de mais neurotransmissores (Ghosh, 1995; Izquierdo, 1995).

Porém a manutenção de um fenômeno tão duradouro como sabemos ser a memória não seria possível apenas pelo aumento da atividade de proteínas citoplasmáticas. Recentemente foi confirmado o aumento também da atividade nuclear, com a ativação de fatores de transcrição, "early genes" e a transcrição de novas proteínas, estes sim fatores capazes de explicar a manutenção da memória por longos períodos (Cole, 1989; Ghosh, 1995; Izquierdo, 1994, Izquierdo, 1995).

1.2 CANAIS DE CÁLCIO VOLTAGEM-DEPENDENTES

1.2.1 O íon cálcio

Íons cálcio servem como importantes segundos mensageiros em todas as células eucarióticas, também desempenhando funções mais elaboradas em células excitáveis, como as musculares e neuronais.

Em condições de repouso a concentração intracelular do íon cálcio é mantida em níveis extremamente baixos ($10^{-7}M$), cerca de quatro ordens de magnitude menores do que no meio extracelular ($10^{-3}M$). Concentrações iônicas

tão baixas são obtidas graças à ação de bombas de cálcio (cálcio adenosina trifosfatases) ou pela atividade do trocador iônico de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$, que bombeiam íons cálcio para dois espaços, o extracelular e os reservatórios intracelulares.

Quando as células nervosas são ativadas ocorrem alterações na concentração de cálcio citoplasmática, pela entrada através de canais presentes na membrana plasmática e pela liberação dos estoques internos. O aumento do cálcio citosólico permite que este íon atue como segundo mensageiro, mediando um enorme número de respostas celulares, como excitabilidade, liberação de neurotransmissores, plasticidade sináptica, transcrição gênica, crescimento do cone axonal e sobrevivência celular, entre outras (Ghosh, 1995; Simpson, 1995).

As oscilações de cálcio iônico, contudo, são rapidamente revertidas por vários mecanismos celulares que removem o cálcio do citosol, seja pelo seqüestro para organelas internas ou pela extrusão para o meio celular (Michaelis, 1994; Simpson, 1995).

De qualquer maneira, estas alterações momentâneas na concentração são suficientes para ativar cascatas de transdução do sinal, responsáveis pela mediação de inúmeras funções, como algumas anteriormente citadas. A manutenção do seu efeito, mesmo quando já removido do citosol, dá-se pela ação que o cálcio desempenha sobre muitas proteínas. A principal delas é a calmodulina, uma proteína à qual o íon se liga e que é capaz de modular a atividade de inúmeras outras proteínas, como quinases, fosfatases e adenilato ciclases (Ghosh, 1995; Disterhoft, 1994).

Estas enzimas, por sua vez, podem atuar ao nível da sinapse, sobre a atividade de proteínas presentes no terminal sináptico, ou mediando respostas mais duradouras, ativando moléculas envolvidas com a transcrição gênica (Ghosh, 1995).

Esta ação abrangente explica a importância do cálcio como mediador central de respostas adaptativas no sistema nervoso, como a plasticidade sináptica, a diferenciação e a memória. Como já foi citado, tanto o aprendizado quanto a indução da LTP são fenômenos plásticos dependentes da entrada de cálcio na célula nervosa.

Porém, efeitos tão diversos quanto os que o cálcio desempenha não podem ser iniciados por um mesmo padrão de estímulo, e a heterogeneidade das respostas obtidas por sua ação dá-se por múltiplas rotas, com diferentes padrões espaciais e temporais de oscilações de concentração. Modos distintos de entrada de cálcio podem levar à ativação de diferentes rotas intracelulares e atualmente sabe-se que são duas as principais vias de entrada de cálcio extracelular em neurônios: os receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, centrais na indução da LTP e que não estudaremos aqui, e os canais de cálcio voltagem-dependentes (Ghosh, 1995).

1.2.2. Canais de cálcio voltagem-dependentes

Os canais de cálcio voltagem-dependente correspondem à via de entrada de cálcio na célula melhor caracterizada do ponto de vista eletrofisiológico. Estes canais ativados por voltagem desempenham um papel crucial na associação dos potenciais de membrana com as respostas celulares, sendo a via de entrada daqueles íons envolvidos em muitas das funções anteriormente endereçadas ao cálcio, como a excitabilidade da membrana, a transmissão sináptica, a neurosecreção e a diferenciação celular. (Tsien, 1983; Hofmann, 1994).

Os canais de cálcio voltagem-dependentes, que pertencem à mesma família de canais de membrana dos canais de sódio e potássio, podem ser classificados em diferentes tipos segundo suas propriedades funcionais, tais como condutância, cinética voltagem e tempo-dependentes, farmacologia, eletrofisiologia e ainda distribuição celular (Tsien, 1991).

Os avanços de técnicas de clonagem molecular recentemente revelaram uma diversidade ainda maior do que aquela conhecida para este tipo de canal, resultante da transcrição de múltiplos genes e de mecanismos pós-transcricionais como o "splicing alternativo" (Tsien, 1991; Smith, 1996).

Os canais de cálcio são classificados, em uma primeira etapa, de acordo com suas sensibilidades às variações nos potenciais de membrana, como aqueles

canais ativados/inativados por potenciais de membrana pequenos -ativados por baixa voltagem- ou ativados/inativados por grandes potenciais de membrana -ativados por alta voltagem.

1.2.2.1- Canais ativados por pequenas variações de voltagem

O principal canal de cálcio ativado e desativado por baixa voltagem, resultante de potenciais de repouso relativamente pequenos (-70 a -40 mV), até hoje caracterizado, é o canal do tipo T, do inglês "tiny", também é chamado rápido, por ser rapidamente inativado (Snutch, 1997).

Os canais do tipo T estão presentes em vários tipos celulares, excitáveis ou não, embora também sejam completamente ausentes em algumas linhagens celulares, como neurônios simpáticos. Sua principal função é promover a entrada de cálcio durante potenciais de membrana negativos, mantendo o equilíbrio iônico (Tsien, 1991; Hofman, 1994).

1.2.2.2 – Canais ativados por grandes variações de voltagem

Em contraste, os canais de cálcio dependentes de grandes variações de voltagem foram subdivididos em quatro classes, de acordo com suas propriedades farmacológicas e cinéticas. Os subtipos B, L, N e P, integrantes desta classe, são ativados por potenciais de membrana de cerca de -30mV e geralmente permanecem bastante tempo ativados (Tsien, 1991; Hofman, 1994).

O subtipo B, do inglês "brain", recebeu este nome devido à sua localização, restrita ao sistema nervoso. Experimentos de clonagem demonstraram que este é o mais abundante subtipo de canais de cálcio (Tsien, 1991; Hofman, 1994).

O tipo N distribui-se preferencialmente em neurônios, embora sua presença entre células de diferentes estruturas ou funções possa variar bastante. Estes canais são proeminentes entre neurônios corticais, sensoriais e simpáticos, embora estejam pouco presentes nas células de Purkinje. Os canais N distinguem-se farmacologicamente por serem bloqueados por ω -conotoxina

GVIA, e por terem grande tendência à inativação em potenciais despolarizados. Estes canais são apontados como os principais envolvidos na liberação de vesículas de neurotransmissores e podem ter sua atividade modulada pela toxina Pertussis. Estas funções podem explicar o bloqueio da memória em animais que recebem ω -conotoxina GVIA durante o aprendizado (Tsien, 1991; Hofman, 1994).

Os canais de tipo L (L de "long-lasting"), por sua vez, são chamados assim devido ao longo tempo que permanecem ativados, permitindo uma grande entrada de cálcio na célula. São farmacologicamente distintos dos demais canais ativados por alta voltagem por serem seletivos à classe de fármacos chamada 1,4 Dihidropiridinas (dihidropiridinas), também bloqueados por fenilalquilaminas, como o Verapamil, e por benzotiazepinas, como Diltiazepam. Estes canais, primeiramente descritos em células cardíacas e em neurônios periféricos, encontram-se amplamente distribuídos em células nervosas, endócrinas, musculares, renais e em fibroblastos (Tsien, 1991; Hofman, 1994).

Nas células musculares os canais do tipo L desempenham um papel essencial na associação da excitação com a contração da célula, enquanto no coração são necessários para a geração e propagação dos impulsos elétricos e também para o início da contração dos músculos atriais e ventriculares. Devido a estas ações, drogas como as dihidropiridinas têm amplo uso clínico, em doenças cardiovasculares, como será discutido mais adiante.

Embora tenha outras funções nas diversas linhagens celulares em que são expressos, os canais do tipo L não são essenciais para a liberação das vesículas de neurotransmissores das células nervosas e neuroendócrinas, função desempenhada principalmente por canais do tipo N. Em contrapartida, foi demonstrado que os canais do tipo L, ao concentrarem-se em regiões específicas do cone de crescimento axonal de um neurônio durante a sinaptogênese, são capazes de promover alterações bastante específicas e localizadas nas concentrações de cálcio intracelular, cruciais para o estabelecimento dos padrões de conexão neural durante a ontogenia do SNC (Silver, 1990; Stúart, 1997).

O canal de tipo P recebeu este nome por estar presente nas células de Purkinje do cerebelo, mas também é encontrado em outras células nervosas e neuroendócrinas. Foram identificados também no túbulo contorcido de rim de ratos. Canais deste tipo são sensíveis ao bloqueio pelo veneno da aranha *Agelenopsis aperta*, chamado toxina ω -Aga-IVA. São ativados com potenciais menos negativos do que -50mV , e sofrem inativação bastante lentamente (Tsien, 1991; Hofman, 1994).

Recentemente as técnicas de biologia molecular permitiram a identificação de outros dois tipos de canais de cálcio voltagem-dependentes, o tipo Q e o tipo R, sobre os quais não nos deteremos devido ainda pouca informação disponível.

1.2.2.3 - Estrutura Molecular e composição dos canais de cálcio voltagem-dependente - especialmente dos Canais do tipo L

Os canais de cálcio voltagem-dependentes são associações protéicas hetero-oligoméricas de diferentes subunidades que contribuem de maneira distinta para a formação do canal.

Foram identificadas até agora cinco diferentes subunidades α_1 , α_2 , δ , β , e γ . Contudo, estas subunidades não contribuem igualmente na formação de todos os tipos de canais descritos anteriormente, e algumas têm sua expressão restrita à tecidos específicos (Tsien, 1991; Hofman, 1994; Westenbroek, 1990; Mills, 1994).

Além da existência de cinco subunidades diferentes outros fatores contribuem para a grande diversidade de canais de cálcio ativados por voltagem, entre elas os múltiplos genes que codificam as subunidades, o splicing alternativo nos transcritos de um mesmo gene e até a combinação preferencial de isoformas variantes das subunidades (Tsien, 1991).

Restringiremos nossa descrição aos canais do tipo L, que, além de serem melhor descritos, serão o objeto de nosso estudo.

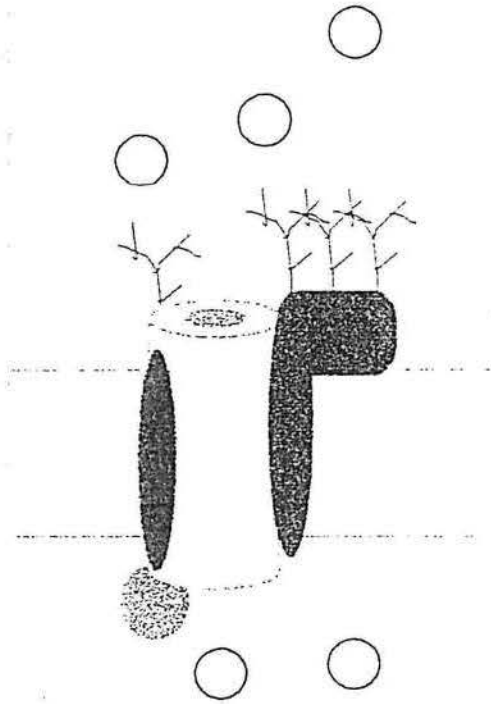
Os canais do tipo L presentes em músculos esqueléticos são compostos por duas subunidades de grande massa molecular, α_1 e α_2 , associadas à três

subunidades menores, β (57 kDa), γ (25kDa) e δ (que forma um dímero de 125 kDa ao unir-se com α_2 , através de ligações dissulfeto) (Hofman, 1994 e Smith, 1996), como mostra a figura 4. Em células nervosas os canais L não incluem a subunidade γ , sendo formados apenas por α_1 , α_2 - δ e β (Starr, 1991).

Figura 4 – Representação da estrutura molecular do canal do tipo L na membrana plasmática de uma célula muscular.

A subunidade α_1 , que está representada em amarelo é responsável pelo poro através do qual passam os íons cálcio (em azul claro). A subunidade β fica na parte intracelular do canal (em laranja) enquanto a subunidade γ (em vermelho) e o complexo α_2 - δ (em azul escuro) contêm porções transmembrana.

Em rosa estão representados grupamentos glicídicos extracelulares associados às cadeias polipeptídicas das subunidades α_1 e α_2 - δ .



Adaptado de Snutch, 1997.

A elaboração de cDNAs da subunidade α_1 a partir de diversos tecidos, como os músculos esquelético, cardíaco e liso, glândulas endócrinas e cérebro, demonstrou que pode haver variação da massa de 212 a 273 kDa, com homologia variável (Hofman, 1994).

Trabalhos de clonagem demonstraram que a subunidade α_1 destes canais têm grande homologia com outros canais ativados por voltagem, especialmente os canais de sódio (Tsien, 1991). Sabe-se que esta subunidade é a responsável pela formação do poro através do qual passam cátions (Tsien, 1991; Hofman, 1994).

Embora haja controvérsias entre os autores quanto ao número de segmentos hidrofóbicos α -hélices (de 6 a 8) aceita-se a existência de um segmento anfipático (S4) em cada um dos quatro domínios homólogos que formam a subunidade $\alpha 1$. Este segmento S4, acreditam os pesquisadores, é o sítio responsável pela detecção da voltagem, responsável pela indução da alteração conformacional que o potencial de membrana acarretará no canal e que permitirá a abertura do poro (Tsien, 1991; Hofman, 1994; Starr, 1991).

A subunidade $\alpha 1$ ainda contém os sítios de modulação sobre os quais podem agir diferentes fatores celulares, como as proteínas quinase A (AMP_C-dependente) e C (cálcio-dependente) e diversos subtipos de proteínas G (Hille, 1994; Pearson, 1994; Liu, 1994; Skattebol, 1989).

Também estão localizados na subunidade $\alpha 1$ os sítios de ligação daquelas drogas que alteram a atividade do canal, como as dihidropiridinas, fenilalquilaminas e benzotiazepinas (para revisão ver Tsien, 1991)

Embora estudos empregando ligantes marcados tenham apontado as sequências de aminoácidos que fazem parte do sítio de ligação das dihidropiridinas, existem diferentes modelos para a localização deste sítio na estrutura do canal. Nakayama e colaboradores (1991) propõem que as dihidropiridinas liguem-se a um sítio acessível pelo lado externo da membrana, enquanto outros grupos (Tsien 1991; Hofman, 1994) propõem que o sítio localize-se em um "loop" intracelular do segmento quatro, perto da região carbono terminal.

A subunidade β , que associa-se com grande afinidade por um segmento altamente conservado da subunidade $\alpha 1$, é capaz de alterar muitas das propriedades do canal, como taxas de ativação/inativação, alterações na dependência de voltagem para ativação/inativação, aumentar a probabilidade de abertura do canal e a afinidade por ligantes (Snutch, 1997)

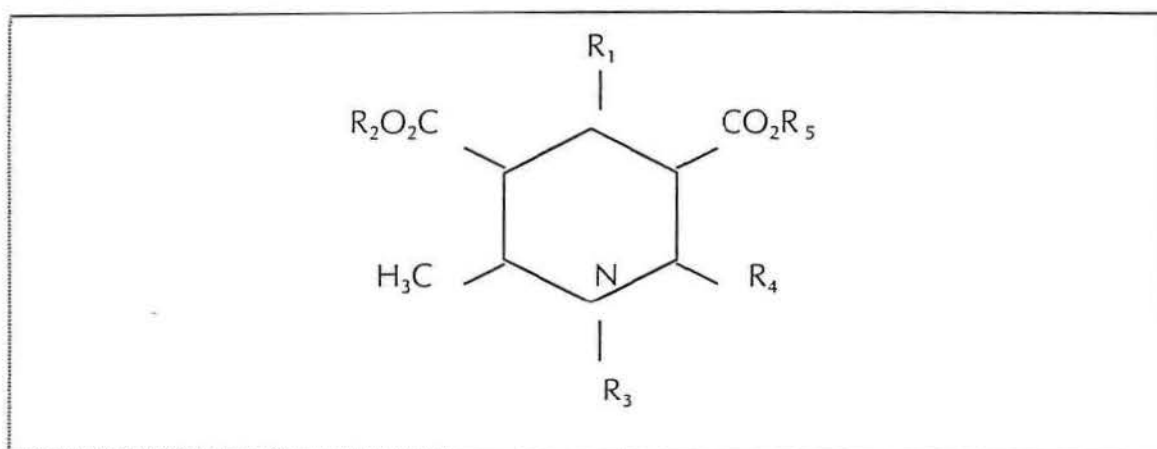
As subunidades $\alpha 2$ e δ , por sua vez, são resultado da transcrição e tradução de um mesmo gene, cujo produto posteriormente sofre clivagem (hofman, 1994).

1.2.3 As 1,4-Dihidropiridinas

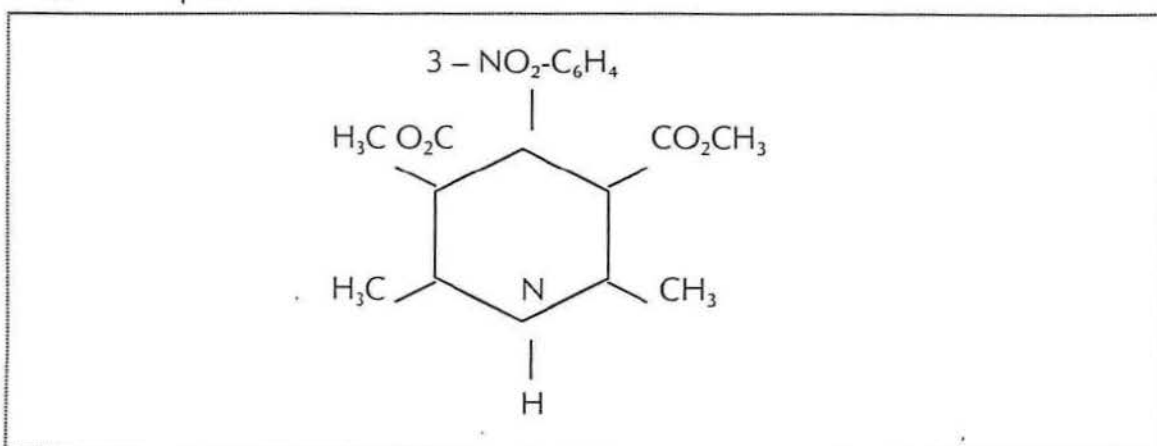
As dihidropiridinas são uma classe de moléculas extremamente seletivas aos canais de cálcio do tipo L. Estas moléculas, ao ligarem-se ao sítio receptor presente na estrutura protéica do canal modulam sua atividade, podendo bloquear completamente a passagem de íons cálcio através do poro do canal (no caso dos antagonistas) ou potenciar sua atividade (no caso do ativador Bay k 8644) (Skattebol, 1989).

Muitos antagonistas desta classe foram desenvolvidos e encontram-se disponíveis atualmente, como Nimodipina, Nitrendipina, Nisodipina, Nifedipina, Amlodipina (Morón, 1990).

Figura 3 – (a) Estrutura básica das dihidropiridinas



(a) Nifedipina



Baseado em: Morón, 1990 e Disterhoft, 1994.

As dihidropiridinas têm sido amplamente utilizadas no tratamento de doenças cardiovasculares como hipertensão e angina, devido a sua habilidade de relaxar vasos sanguíneos e inibir arritmias cardíacas (Morón, 1990; Scriabine, 1989).

Devido a sua ação como potentes vasodilatadores os bloqueadores da classe das dihidropiridinas também são utilizados no tratamento de problemas cerebrovasculares, como o espasmo após hemorragia subaracnoidea, isquemia e outras patologias relacionadas (Scriabine, 1989).

Foi também amplamente demonstrado o efeito anticonvulsivante das drogas desta classe. A Nimodipina, comumente utilizada nestes estudos devido a sua capacidade de cruzar a barreira hemato-encefálica alcançando concentrações ativas no tecido cerebral, mostrou-se efetiva no bloqueio de convulsões induzidas por eletrochoque, isquemia, reperfusão, bicuculina, pentilenotetrazol e muitos outros agentes utilizados artificialmente para a indução de crises convulsivas em animais (Morón, 1990). Além da Nimodipina, todas as dihidropiridinas até hoje testadas demonstraram o mesmo efeito anticonvulsivante, ainda que com diferentes potências, o que se atribui a diferenças de afinidade com o sítio de ligação. Atualmente acredita-se que o mecanismo da ação anticonvulsivante das dihidropiridinas seja o bloqueio dos canais de cálcio voltagem-dependentes, embora alguns autores acreditem que parte de sua atividade anticonvulsivante deva-se possa dever-se a outros sítios de ação.

Ainda foi sugerida a ação efetiva da nimodipina no tratamento de distúrbios afetivos como mania e hipomania, embora o mecanismo de ação não seja claro (Zupan, 1996).

Recentemente estes antagonistas dos canais de cálcio passaram a ter seus efeitos no tratamento de déficits sensorimotores, comportamentais e cognitivos grandemente estudados em animais idosos, e os resultados que vêm apresentando apontam um grande potencial terapêutico na melhoria de prejuízos relacionados com o envelhecimento em humanos (Scriabine, 1989).

Entre as drogas desta classe disponíveis no mercado, e já comercializadas para o tratamento de doenças cardiovasculares, algumas são mais conhecidas, e suas características melhor descritas: Nimodipina, Nifedipina, Amlodipina.

Estudos de diversos grupos demonstraram que Nimodipina, em doses não muito altas, facilitam o aprendizado e a memória (Mc-Monagle-Strucko, 1993; Isaacson, 1988; Deyo, 1989), sendo ainda capazes de reverter a amnésia induzida por choque eletroconvulsivo (Zupan, 1996) e hipóxia (Zupan, 1993). Resultados semelhantes foram encontrados para Nifedipina, outra dihidropiridina estruturalmente bastante semelhante à Nimodipina, quando administrada em animais igualmente idosos (Zupan, 1993).

Embora apresente diferenças estruturais bastante significantes, e capazes de alterar vários parâmetros funcionais, estudos utilizando Amlodipina, um derivado das dihidropiridinas, também apontaram para efeitos facilitadores na consolidação e evocação da memória.

Estas evidências apontam para a ação facilitadora das dihidropiridinas sobre a capacidade cognitiva de animais com déficits neurológicos, sejam decorrentes do envelhecimento, abuso de drogas (álcool, maconha, cocaína e heroína) (Herning, 1994), demência ou a danos neurais acarretados por episódios isquêmicos ou lesões.

Entretanto, ainda não se conhece o mecanismo responsável pela ação das dihidropiridinas, embora algumas especulações já sejam feitas.

Existem várias evidências de que os mecanismos normais do metabolismo do cálcio são alterados com o envelhecimento, o que resultaria em um aumento inadequado das concentrações intracelulares deste íon (Michaelis, 1994; Verkhratsky, 1994). Lanfield (1994) dá evidências eletrofisiológicas destas alterações em fatias de hipocampus de ratos velhos, nas quais foi identificado um aumento excessivo da entrada de cálcio através de canais voltagem-dependentes. Outros trabalhos apontam, ainda, para déficits nos processos de extrusão, sequestro e tamponamento dos íons cálcio em sinaptossomas obtidos do tecido cerebral de animais idosos (Michaelis, 1994).

Estas alterações na homeostase do cálcio são apontadas como um dos fatores responsáveis pelos prejuízos neurais associados com a velhice, pois levariam, entre outras coisas, à atrofia de dendritos e morte celular, interrompendo a circuitaria neural (Anderson, 1996).

Embora os mecanismos responsáveis pela ação nootrópica das dihidropiridinas não sejam, ainda, conhecidos, a detecção de tais alterações na homeostase do cálcio nos animais idosos suportam a hipótese de que a ação nootrópica destas drogas dê-se pelo reestabelecimento dos níveis basais de cálcio. Alguns trabalhos, como o de Mervis e colaboradores (1994), que demonstraram que a Nimodipina era capaz de melhorar a memória em coelhos idosos e ainda reverter a atrofia dendrítica neocortical, ajudam a fortalecer esta teoria.

Porém, enquanto em animais que apresentam danos neurais os resultados facilitador das dihidropiridinas sugerem um efeito consistente, os trabalhos com animais adultos normais e neurologicamente intactos são bastante discrepantes, variando do bloqueio total da aquisição (Lee, 1991) à facilitação da memória em diversas tarefas comportamentais (Levy, 1991; McMonagle-Strucko, 1993; Quatermain, 1993).

Esta constatação levou muitos pesquisadores a defenderem a teoria de que a ação das drogas da classe das dihidropiridinas sobre a capacidade cognitiva tanto de animais com prejuízos neural quanto intactos devia-se à ação vascular destas drogas. Esta teoria é apoiada pelo fato de grande parte dos experimentos utilizar injeções intra-peritoneais como meio de administração das drogas. Além disso, algumas das drogas da classe das dihidropiridinas não são capazes de cruzar a barreira hemato-encefálica, como a Nifedipina (Conceição, 1994).

A variação nos resultados obtidos com animais intactos também poderia dever-se ao fato de as dihidropiridinas apresentarem uma curva dose-resposta em forma de U invertido, como já foi constatado para algumas drogas desta classe, como a Nimodipina (Deyo, 1990).

Os resultados já obtidos com as drogas da classe das dihidropiridinas demonstram grande potencial como agentes terapêuticos. Porém, serão

necessários estudos capazes de estabelecer o mecanismo de ação destas drogas para que seu potencial possa ser aproveitado no tratamento de déficits neurais. Para que se esclareça a base de sua ação é necessário que se conheça não apenas o mecanismo em animais com prejuízos neurais, mas também que se possa explicar sua ação em animais jovens e intactos.

2 - OBJETIVOS

Baseados nos dados anteriormente apresentados, esta dissertação tem como objetivo

Avaliar o efeito da administração de Nifedipina, injetada imediatamente ou trinta minutos após, ou, ainda, dez minutos antes do aprendizado, diretamente sobre a região CA1 do Hipocampo de ratos adultos, sobre a memória da tarefa de esquiã inibitória.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- ANIMAIS COMPORTAMENTAIS:

Foram utilizados cento e oito ratas Wistar albinas provenientes do Biotério do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais tinham entre dois e três meses de vida e pesavam de 210 a 300 g.

Segundo Cuomo (1987) o sistema nervoso central de ratos atinge a completa maturação aos 60 dias e devido a isto animais desta idade têm sido utilizados em vários estudos que objetivam avaliar o efeito de drogas psicotrópicas em adultos. Como nosso objetivo foi avaliar o efeito da droga sobre animais adultos jovens, a idade escolhida foi 60-90 dias de vida.

Os animais foram mantidos em caixas plásticas de dimensões 65 x 25 x 15 cm, em número de quatro a cinco animais por caixa. Eram submetidos a um ciclo claro/escuro de 12 horas, em temperatura constante de 23°C e dispunham de água e comida "ad libitum".

3.2- CIRURGIA PARA IMPLANTAÇÃO DE CÂNULAS-GUIAS:

Antes do início dos procedimentos comportamentais os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica, na qual eram implantadas bilateralmente cânulas guias intracerebrais de calibre 27.

Para isto os animais foram previamente anestesiados com tiopental monossódico (Thionembatal, de fabricação Abbot), na dose de 50mg/kg, podendo ser suplementada em até um quarto da dose.

Após a implantação as cânulas ficavam 1mm acima da região CA1 do hipocampo dorsal, de acordo com Paxinos e Watson (1986). As coordenadas, a partir do bregma, eram as seguintes: A(antero-posterior):-4.3, L(látero-lateral):⁺4.0, DV(dorso-ventral):2.0.

3.3- PROCEDIMENTOS COMPORTAMENTAIS:

Uma vez que a única maneira de aferirmos a memória dos animais é medindo uma alteração comportamental, utilizamos tarefas comportamentais já padronizadas nas quais quantificamos algum aspecto que possa demonstrar o aprendizado do animal.

Nestas tarefas o animal é exposto a mesma situação duas vezes. Na primeira vez, que chamamos de sessão de treino, o animal adquire a informação, isto é, aprende um novo comportamento. Depois de certo intervalo, que pode variar de algumas horas até meses, o animal é recolocado no local de aprendizado e reexposto à situação. Neste segundo momento, chamado sessão de teste, são novamente avaliados os parâmetros escolhidos e que também haviam sido medidos na primeira exposição.

A diferença entre os índices obtidos na sessão de treino e de teste é a medida da memória do animal.

Neste trabalho foi utilizada a tarefa de esquivar inibitória, que desenvolve-se em uma caixa operada automaticamente (Figura 4).

A caixa na qual foi realizada a tarefa é de acrílico, com dimensões de 50 cm de largura, 25 cm de altura e 25 cm de profundidade. A parede voltada para o experimentador era de acrílico transparente. Dentro da caixa uma pequena lâmpada permanecia acesa durante todo o procedimento, tornando a caixa extremamente clara.

O assoalho da caixa era formado por uma grade de barras de bronze paralelas, de 0,1 cm de calibre e separadas por 1 cm, passível de receber uma diferença de potencial elétrico. A extremidade esquerda da caixa era ocupada por uma plataforma de madeira revestida de fórmica, com 7 cm de largura e 5 cm de altura.

Depois de recuperados da cirurgia (entre 48 e 72 horas), os animais eram submetidos às sessões de treino e teste da tarefa.

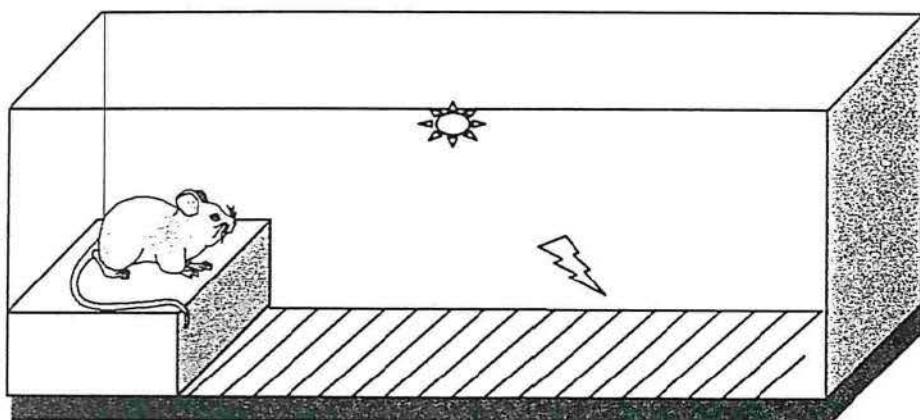
Na sessão de treino os animais eram gentilmente colocados sobre a plataforma, com a cabeça voltada para o canto superior esquerdo da caixa. O

tempo de descida do animal da plataforma era cronometrado. Quando o animal colocava as quatro patas sobre a grade, recebia um choque com intensidade de 0,45 mA e duração de três segundos. Em seguida os animais eram retirados da caixa e recolocados em suas caixas moradia.

Na sessão de teste, realizada 24 h depois, os animais eram recolocados na caixa da tarefa, sobre a plataforma, na mesma posição. Novamente era cronometrado o tempo que o animal demorava para descer com as quatro patas na grade do assoalho. Nesta segunda exposição não havia choque e os animais dispunham de um tempo máximo de 300 s para descer da plataforma. Caso não descessem eram retirados e computados com o valor de 300 segundos.

A diferença entre as latências de descida da plataforma na sessão de treino e na sessão de teste eram tomados como os índices de memória da tarefa.

Figura 4: Representação da Esquiva Inibitória



3.4- PREPARAÇÃO E ADMINISTRAÇÃO DAS DROGAS:

Nifedipina foi dissolvida em solução veículo (20% dimetilsulfóxido em salina) nas concentrações de 56ng/ μ l e 560ng/ μ l. As soluções foram mantidas em "ependorfs" protegidas da luz, armazenadas em local escuro ou envoltas em papel alumínio durante a utilização.

Os animais dos grupos controle receberam apenas a solução veículo (20% dimetilsulfoxido em salina).

No momento da administração das drogas uma agulha de microinfusão de calibre 30 (mizzy) era colocada dentro da cânula guia. Através dela os animais recebiam bilateralmente infusões de 0,5 μ l de droga ou veículo, bombeadas lentamente durante 1,5 min. A agulha de infusão era 1 mm mais longa do que a cânula guia, atingindo a formação hipocampal exatamente na região desejada (CA1).

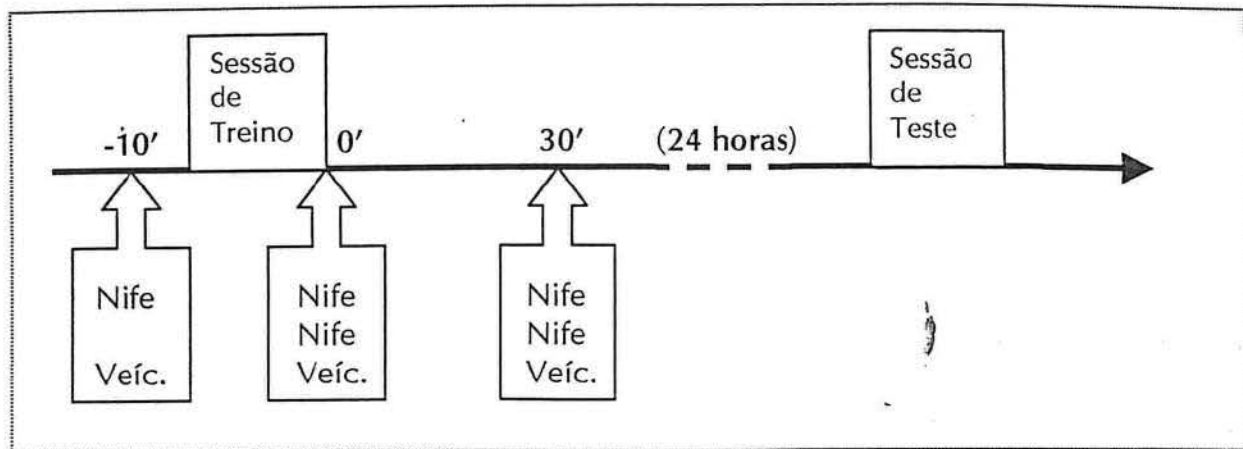
Foram realizados três experimentos nos quais os animais foram divididos em grupos de acordo com a droga, concentração e tempo de administração: (Fig 5)

- Os animais do primeiro experimento foram divididos em três grupos: O primeiro grupo recebeu injeções de Nifedipina na dose de 28 ng/0,5 μ l, o segundo recebeu a mesma droga na dose de 280 ng/0,5 μ l, e o terceiro recebeu apenas veículo. Todas as injeções foram realizadas imediatamente após a sessão de treino.

- O segundo experimento também incluiu três grupos, que receberam as mesmas injeções que os animais do primeiro experimento, porém 30 min após a sessão de treino.

- O terceiro e último experimento incluiu apenas dois grupos, um que recebeu a dose mais alta de Nifedipina (280 ng/0,5 μ l) e o grupo controle, que recebeu veículo, ambos 10 min antes da sessão de treino.

Figura 5:



3.5- ANÁLISE MESOSCÓPICA:

Para nos certificarmos de a droga havia atingido a região desejada com precisão, foi realizado um exame mesoscópico para verificação da correta localização das cânulas-guia. Para isto, após o término dos procedimentos comportamentais, os animais eram mortos por decapitação em guilhotina e imediatamente recebiam microinfusões de 0,5 μ l de azul de metileno através das cânulas guias.

Os cérebros eram então dissecados e colocados em solução de formaol 10%, onde permaneciam por uma semana. Após este período era feita a análise histológica utilizando uma lupa, na qual os animais que não apresentavam a marca com azul no local correto eram descartados.

Do total de cento e oito animais utilizados 99 foram aproveitados e incluídos nos dados para a análise estatística, o que corresponde a um aproveitamento de mais de noventa por cento.

3.6- ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS:

Todos os dados obtidos neste trabalho serão expressos em mediana e intervalos interquartis.

As diferenças entre as latências de descida da plataforma no treino e no teste de cada grupo foram avaliadas, para nos certificarmos de que os animais haviam aprendido. Esta avaliação foi feita utilizando o teste H de Kruskal-Wallis para variáveis independentes, ou o teste U de Mann-Whitney para duas variáveis independentes, quando apenas uma dose da droga havia sido utilizada (caso da injeção 10 pré-treino).

Os dados então eram avaliados pela reiteração do teste U de Mann-Whitney para compararmos os efeitos da administração das drogas em relação a seus veículos.

Neste trabalho utilizamos estatística não-paramétrica, uma vez que na sessão de teste havia um tempo máximo estabelecido, a partir do qual os animais eram retirados da caixa e computados com o valor máximo. Este procedimento impossibilita o uso de estatística paramétrica devido a possível alteração que acarreta na distribuição dos dados.

4- RESULTADOS

O resultado da análise dos dados obtidos na tarefa de esquiva inibitória, para os grupos tratados com as drogas em diferentes tempos em relação a seus controles, serão utilizados como modelos de medição de memória.

Desta maneira, comparando-se cada grupo com seu respectivo controle, os resultados indicarão o efeito da droga sobre a memória. Caso os animais tratados apresentem uma performance melhor do que seu controle, será considerado um efeito facilitador da droga sobre a memória. Caso ocorra o oposto, um prejuízo no desempenho do grupo de animais tratados, isto será interpretado como um efeito negativo da droga sobre a memória dos animais.

Os valores serão expressos por medianas e intervalos interquartis por ter sido utilizada estatística não-paramétrica.

4.1- AVALIAÇÃO DO APRENDIZADOS DOS ANIMAIS:

Em uma primeira etapa foi avaliado o aprendizado dos animais de todos os grupos, para que nos certificássemos de que todos haviam sido capazes de aprender de maneira uniforme, pressuposto básico para realizarmos a comparação de seus testes.

A tabela I compara os valores de treino e teste e mostra os valores de significância desta comparação, evidenciando o aprendizado de todos os grupos. valor de p para cada grupo

Tabela 1: Comparação dos Treinos e Testes de cada grupo:

Grupo	Tempo de injeção	Latência de descida (s)		Valor de p
		Treino	Teste	
Controle (DMSO)	0' pós-treino.	6,25 (4,50/9,60)	31,95 (17,60/216,70)	0,0012
Nife 28 ng/lado	0' pós-treino	6,45 (4,10/9,20)	105,85 (48,90/300,00)	0,0051
Nife 280 ng/lado	0' pós-treino	11,10 (4,40/13,20)	300,00 (122,60/300,00)	0,0077
Controle (DMSO)	30' pós-treino	6,80 (2,40/12,50)	38,80 (21,50/205,00)	0,0030
Nife 28 ng/lado	30' pós-treino	6,60 (3,60/14,40)	33,90 (13,00/211,00)	0,0019
Nife 280 ng/lado	30' pós-treino	5,60 (3,80/7,70)	300,00 (28,00/300,00)	0,0047
Controle (DMSO)	10' pré-treino	7,50 (4,60/15,80)	27,50 (7,00/61,20)	0,0159
Nife 280 ng/olado	10' pré-treino	6,20 (3,80/15,00)	35,30 (16,40/155,80)	0,0045

Também comparamos entre os grupos os valores obtidos na sessão de treino de cada um (Kruskal-Wallis), para nos certificarmos que a administração pré-treino não havia afetado o desempenho dos animais durante a sessão de aprendizado. O valor de $p = 0,7798$ confirma que não houve diferença.

4.2 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE NIFEDIPINA IMEDIATAMENTE APÓS O TREINO:

Quando a administração das drogas foi realizada imediatamente após o aprendizado, isto é, após a sessão de treino, houve um efeito facilitador da Nifedipina. Os animais que receberam a microinfusão de 280 μ g de nifedipina por cânula apresentaram retenção, na sessão de teste, estatisticamente melhor do que os animais controle ($p=0,0264$).

O aumento observado no grupo que recebeu a dose menor, de 28 ng/lado não foi significativo em relação ao grupo controle ($p=0,753$).

Os resultados são mostrados na figura 5.

4.3- EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE NIFEDIPINA TRINTA MINUTOS APÓS A SESSÃO DE TREINO:

Após obtermos os resultados da administração de Nifedipina imediatamente após o aprendizado, decidimos avaliar a contribuição dos canais voltagem-dependentes do tipo L em um período mais tardio da consolidação da memória, administrando as mesmas duas doses de Nifedipina trinta minutos após a aquisição da tarefa.

Neste tempo apenas a dose mais alta apresentou efeito facilitador, mas este efeito não foi estaticamente significativo ($p=0,2869$). A dose mais baixa não teve efeito ($p=0,8911$).

Estes dados estão representados graficamente na figura 6.

4.4- EFEITO FACILITADOR DA ADMINISTRAÇÃO DA DOSE MAIS ALTA DE NIFEDIPINA ANTES DA SESSÃO DE TREINO:

Na última etapa do trabalho passamos a avaliar o efeito da administração da dose mais alta, por ser esta a única que havia apresentado efeito significativo em outros tempos de administração, quando administrada dez minutos antes do aprendizado.

A administração de fármacos antes de procedimentos pode acarretar efeitos indesejáveis, prejudicando a aquisição da tarefa e assim impossibilitando uma avaliação isenta de seu efeito sobre a memória. Neste caso, porém, não houve prejuízo, uma vez que o desempenho na sessão de treino dos animais deste grupo foi semelhante ao dos animais que receberam apenas veículo. Contudo, não realizamos outros testes para aferir outros parâmetros mais específicos.

Neste tempo também não houve efeito do tratamento com a droga em relação a performance dos animais controle ($p=0,4956$) (Figura 7).

Figura 7 - Administração imediatamente após sessão de treino.

(★ = significante)

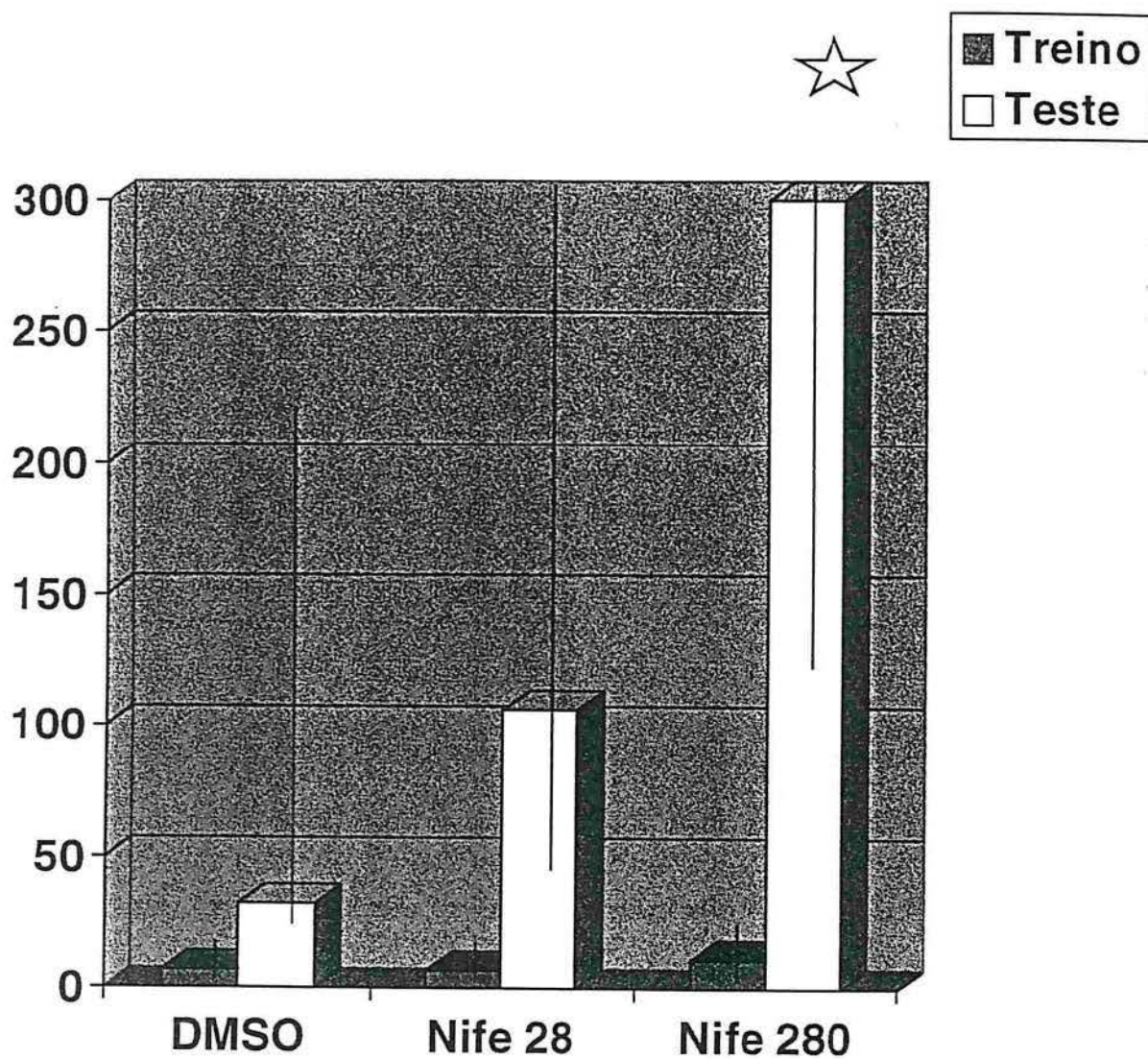


Figura 8 - Administração trinta minutos após o treino

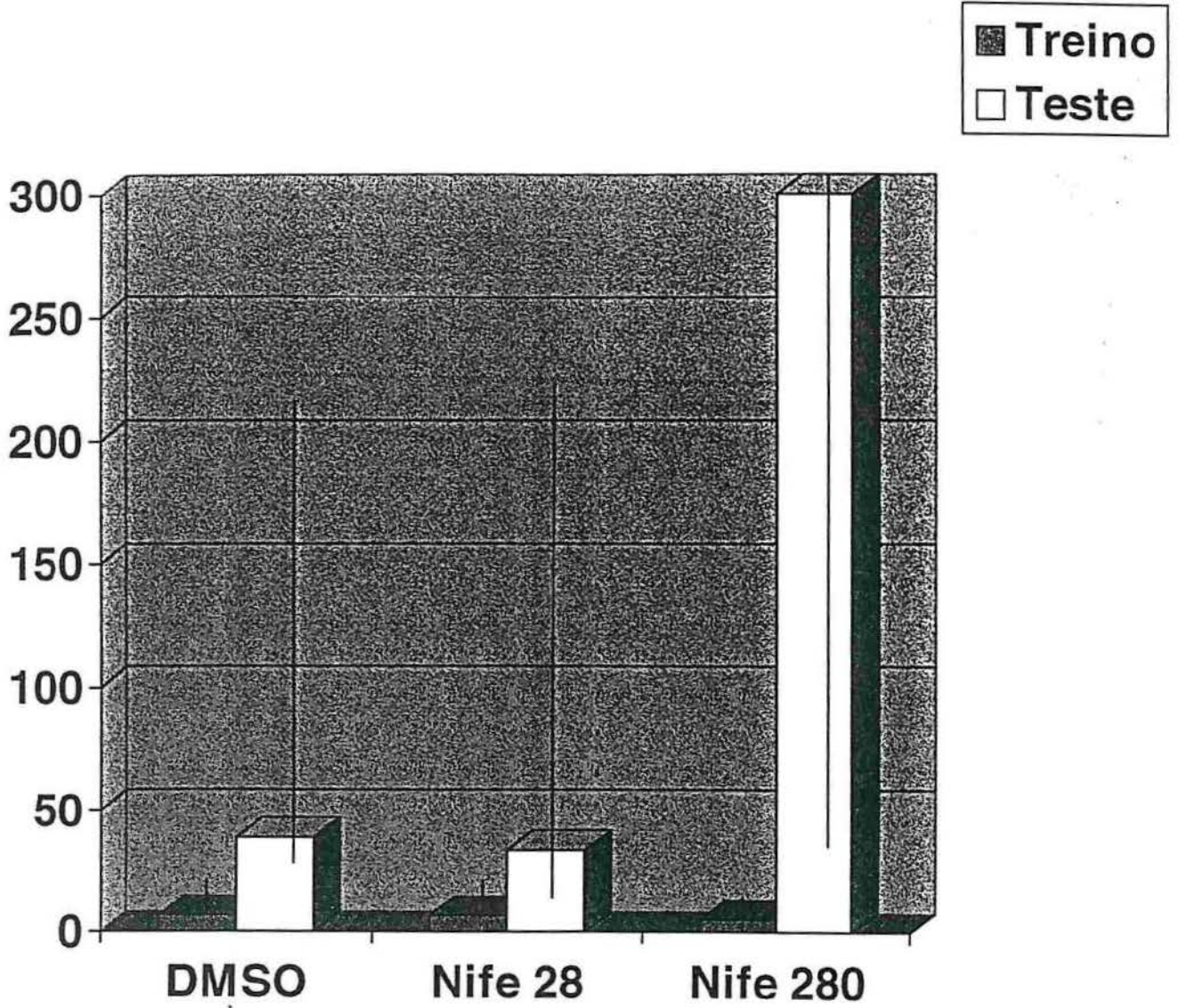
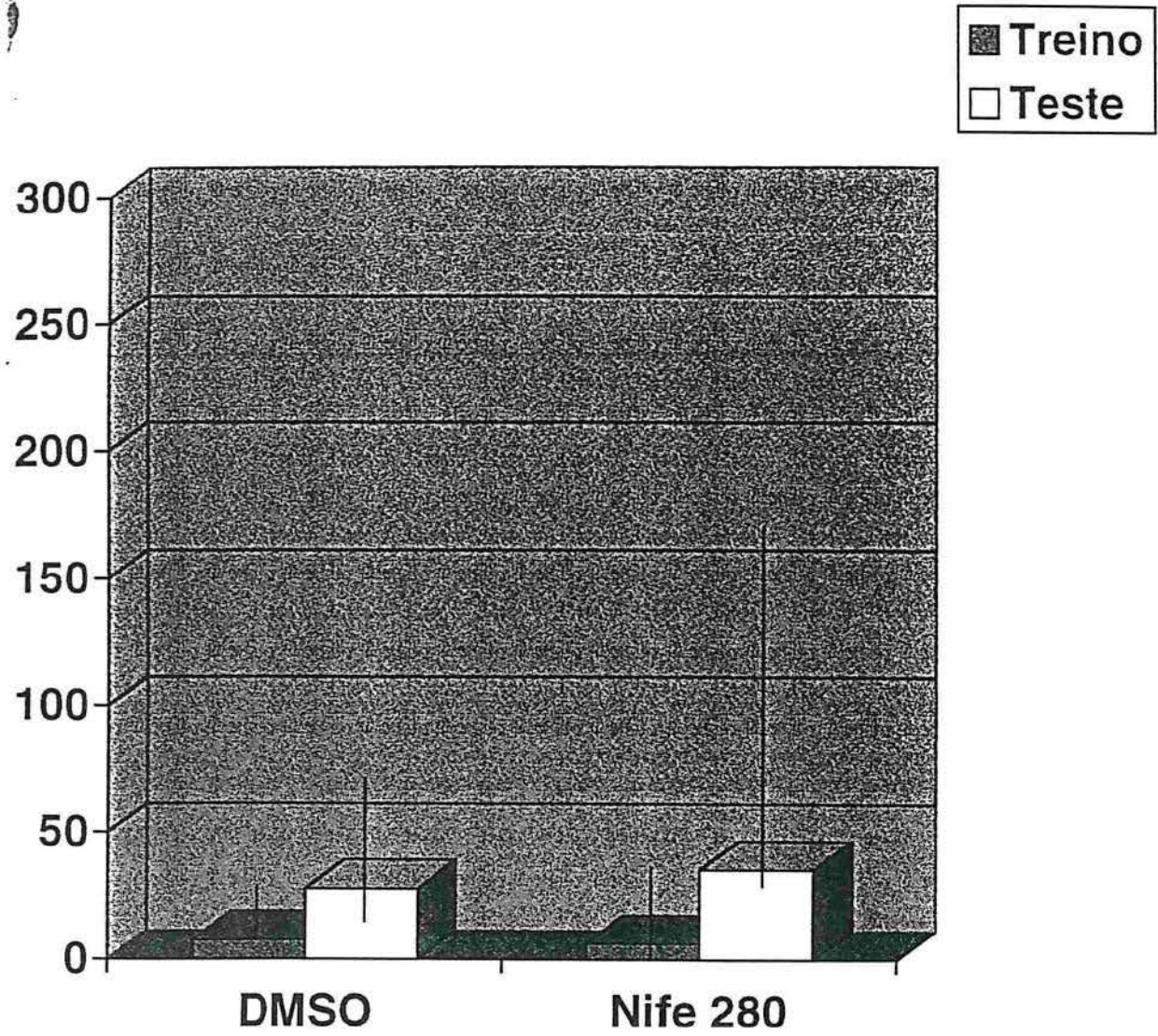


Figura 9 - Administração dez minutos antes da sessão de treino



5- DISCUSSÃO

Neste trabalho estudamos o efeito da Nifedipina, um bloqueador específico dos canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo L, sobre a memória de ratos adultos jovens. Com isto procurávamos levantar evidências que ajudassem a determinar o mecanismo de ação do efeito nootrópico que esta e outras drogas da classe das 1,4-Dihidropiridinas têm sobre a memória de animais de diferentes idades e estados fisiopatológicos.

Como já foi descrito, uma grande variedade de sistemas está envolvida no processamento da memória, tanto em sua base quanto em sua modulação. Foi visto também que os períodos iniciais que seguem o aprendizado de determinada informação são extremamente lábeis e passíveis de sofrer alterações, levando tanto ao aumento da memória quanto à sua supressão (McGaugh & Dawson, 1971).

Efeitos como estes sugerem que as drogas facilitam o aprendizado por influenciarem os processos neurobiológicos envolvidos com esta memória, o que nos permite determinar, muitas vezes, quais os mecanismos envolvidos no processamento natural da memória.

Os resultados que obtivemos nestes experimentos sugerem que os canais de cálcio do tipo L são capazes de influenciar o processo de consolidação da memória, sobre os quais provavelmente atuam como moduladores negativos. Contudo, nossos resultados não nos permitem afirmar que este seja um mecanismo de modulação endógeno.

Como vimos na introdução, existe um significativo número de trabalhos que demonstram os efeitos positivos das dihidropiridinas sobre a memória (Levy, 1991; Mervis, 1994), capacidade de processamento de informações (Herning, 1994) e recuperação da amnésia induzida (Zupan, 1993; McMonagle-Strucko, 1993; Zupan, 1996) em indivíduos cujo sistema nervoso encontra-se alterado devido à velhice ou a condições patológicas. Contudo, os resultados acerca do

efeito das mesmas drogas sobre o desempenho de indivíduos adultos e cujo sistema nervoso encontra-se intacto é bastante contraditório.

Enquanto Deyo e colaboradores (1992) observaram um efeito amnésico de Nifedipina quando administrada intracerebroventricularmente em pintos jovens, o mesmo grupo encontrou efeitos facilitadores da nimodipina nos mesmos animais (Deyo, 1990). Deyo (1989) também demonstrou facilitação em coelhos jovens e velhos, nos quais a administração de Nimodipina acelerou o aprendizado.

Lee & Lin (1991), utilizando uma metodologia bastante semelhante à empregada neste trabalho, encontraram um efeito bloqueador da memória em ratos que receberam Nifedipina na região do giro denteado do hipocampo. Contudo, podemos sugerir alguns fatores responsáveis pela discrepância entre os resultados deste trabalho e aqueles obtidos por nós. Provavelmente o principal fator seja a diferença nas doses de Nifedipina empregadas, uma vez que a dose administrada por Lee & Lin para encontrar o efeito amnésico foi de 8µg, enquanto em nosso trabalho a dose que ocasionou facilitação do aprendizado foi de 280ng. Isto é congruente com o fato de, como sugerido pelos próprios autores, serem efeitos dose-dependentes ocasionados por uma curva dose-resposta em forma de "U" invertido. Este tipo de curva dose-resposta já foi demonstrado para outras dihidropiridinas, como a Nimodipina (Deyo, 1990). De acordo com Izquierdo (1990), a maior parte das drogas nootrópicas apresentam este tipo de curva. Por fim, as diferenças em relação à região atingida pela droga poderiam contribuir para a diferença dos resultados.

Outros trabalhos utilizando administração subcutânea de bloqueadores da classe das dihidropiridinas encontraram um efeito facilitador sobre a memória de animais jovens e normais. McMonagle-Strucko (1993) utilizaram Nimodipina em ratos de várias idades e observaram o efeito facilitador da droga em todos os grupos tratados. Levy e colaboradores (1991) utilizando um procedimento bastante semelhante obtiveram o mesmo resultado em animais adultos. Por fim, Quatermain e colaboradores (1993) estudaram o efeito da administração subcutânea de Amlodipina sobre a memória de duas tarefas e observaram um

efeito facilitador da droga nos dois procedimentos quando administrada imediatamente após a sessão de aprendizado.

Algumas hipóteses são propostas para explicar o mecanismo de ação das drogas da classe das dihidropiridinas, embora existam autores que acreditem que o efeito nootrópico observado em animais idosos ou com défices decorrentes de lesões ou doenças degenerativas possa dever-se a mecanismos diferentes daqueles que medeiam o mesmo efeito em animais neurologicamente intactos (Mcmonafle-Strucko, 1993). Acreditamos que, embora existam significativas diferenças entre o sistema nervoso intacto e aquele lesionado, o mecanismo de ação que leva a um mesmo efeito destas drogas nos diferentes grupos de animais deva ser, no mínimo, muito semelhante.

Uma possibilidade de mecanismo de ação das DHP é vascular. Devido ao fato de as drogas desta classe serem potentes vasodilatadores muitos autores apontam um aumento no fluxo sanguíneo cerebral como responsável pelo efeito das dihidropiridinas na memória. Esta proposta explicaria os resultados tanto em animais jovens e intactos, quanto em idosos e lesionados (Zupan, 1993).

Como já foi citado, o fato de a maior parte dos experimentos utilizarem meios de administração periféricos, como injeções intra-peritoneais ou "pelets" subcutâneos de liberação prolongada, impossibilita que se descarte o efeito vascular. Embora muitos sejam favoráveis a esta hipótese, um efeito cerebral mais específico não pode ser descartado, devido ao fato de mesmo quando a administração é periférica, o fármaco utilizado ser capaz de cruzar a barreira hemato-encefálica alcançando o sistema nervoso central.

Em nosso estudo utilizamos microinfusões de droga diretamente sobre uma estrutura reconhecidamente envolvida com o aprendizado, o que, devido às dimensões da área atingida e sua vascularização limitada, nos possibilita considerar extremamente improvável que o efeito vascular seja responsável pelos resultados obtidos.

Uma segunda hipótese é a de os bloqueadores de canais de cálcio sejam capazes de restabelecer a homeostase celular deste íon, perdida devido a velhice e aos danos ocasionados por lesões, processos isquêmicos ou alterações como as

induzidas pelo choque eletroconvulsivo. Embora esta hipótese seja capaz de explicar os efeitos em situações patológicas não se mostra adequada para os resultados positivos observados em animais intactos. Trabalhos como os de McMonagle-Strucko (1993) e Deyo (1989), nos quais a mesma metodologia é empregada para avaliar o efeito da administração de nimodipina em animais jovens, de meia idade e idosos, e os resultados obtidos são de facilitação em todos os grupos, contradizem hipóteses que postulem um mecanismo restrito como esta.

Embora não haja muitos dados disponíveis, recentemente outros efeitos tem sido atribuídos às dihidropiridinas e podem levar-nos a postular outros mecanismos de ação responsáveis pelos efeitos facilitadores observados.

Levy e colaboradores, trabalhando com animais jovens, demonstraram que a administração subcutânea crônica de nimodipina, além de melhorar a performance dos animais em uma tarefa de memória espacial, o labirinto aquático, induz um aumento na liberação de acetilcolina na região do hipocampo (Levy, 1991). Sabendo que o sistema colinérgico, atuando através de receptores muscarínicos, é um importante sistema modulador de memória (Izquierdo & Chaves), podemos supor uma ação das dihidropiridinas como moduladores indiretos dos processos de aprendizado e memória. Nordstrom e colaboradores (1986), cujo trabalho é citado por Levy, obtiveram resultados opostos, onde a Nimodipina foi capaz de inibir a liberação de acetilcolina em fatias de tecido cerebral enquanto induziu um aumento na liberação de Dopamina, outro neurotransmissor sabidamente envolvido com a modulação dos processos de memória.

Outros trabalhos, como de O'rgan e colaboradores (1991) citado em Mcmonagle-Strucko, demonstraram um aumento da transmissão sináptica por dihidropiridinas detectado por medições de potenciais intracelulares em fatias de hipocampo de ratos normais.

Embora ainda sejam necessários trabalhos mais detalhados acerca destes efeitos das dihidropiridinas sobre a transmissão sináptica, tais resultados nos

permitem vislumbrar mecanismos alternativos para explicar o efeito nootrópico destas drogas nos animais dos diferentes grupos.

Outro ponto a ser discutido é como um bloqueador da entrada de cálcio pode resultar na facilitação do aprendizado quando este íon é essencial tanto para a indução da LTP quanto para as primeiras etapas do processamento da memória.

Em primeiro lugar é necessário analisarmos a contribuição dos canais de cálcio para a indução da LTP. Como discutido por Nicoll e Malenka (1995), os canais de cálcio voltagem-dependentes não são essenciais na indução da LTP na região CA1 do hipocampo, onde os receptores do tipo NMDA são os principais responsáveis pelo influxo de cálcio no terminal pós-sináptico. Outros trabalhos ainda apontam uma contribuição significativa dos canais de cálcio na indução da LTP, embora esta não seja essencial a ponto de a administração de Nifedipina bloquear a indução do fenômeno (Huber, 1995).

Outro aspecto importante é a localização dos canais do tipo L nos neurônios. Foi demonstrado que este tipo de canal localiza-se em regiões densas preferencialmente no soma e nos dendritos proximais (Huber, 1995), tornando estes canais pouco adequados da mediação de fenômenos sinapse-específicos como a LTP. Em um trabalho detalhado Westenbroek e colaboradores (1990) demonstraram que os canais do tipo L localizam-se abundantemente nos dendritos proximais dos neurônios piramidais do hipocampo, na base de dendritos maiores e na região do corpo celular. Neste trabalho os autores sugerem que enquanto os receptores do tipo NMDA medeiam a entrada de cálcio na região da sinapse e dendritos proximais, os canais do tipo L poderiam mediar respostas ao mesmo estímulo nos dendritos proximais e no soma, iniciando outros eventos regulatórios intracelulares. Com isto os canais do tipo L teriam um papel crucial na integração neural e no processamento dos sinais a nível celular. O resultado da atividade destes canais seria a ativação de eventos como fosforilação de proteínas e regulação gênica, e isso poderia ocorrer somando-se aos efeitos da estimulação na sinapse ou atuando como um mecanismo de regulação negativa, contrapondo parte do efeito que o estímulo teve na sinapse. Esta segunda

hipótese explicaria o fato de o bloqueio destes canais por nifedipina, como fizemos, facilitar a memória, pois o mecanismo de autoregulação negativa do estímulo estaria contraposto.

Outra hipóteses que poderia ser justificada por sua localização é que a presença destes canais no soma torna-os primeiramente envolvidos com a toxicidade decorrente de um aumento exagerado nos níveis intracelulares de cálcio, o que poderia explicar o efeito benéfico de seu bloqueio (Fanelli, 1994).

Embora sua localização os torne inadequados para a regulação local de fenômenos sinápticos, trabalhos recentes têm demonstrado outras propriedades funcionais das células piramidais do hipocampo que poderiam envolver a atividade dos canais de cálcio do tipo L (Jonhston et al, 1996). Foi demonstrado que a atividade elétrica originada no soma e nos dendritos proximais, onde localizam-se predominantemente estes canais, pode sofrer retropropagação em direção aos dendritos distais (Jonhston et al, 1996; Stuart et al, 1997). Desta maneira um estímulo retrógrado oriundo de regiões mais centrais do corpo neuronal poderia influenciar padrões específicos de alterações plásticas a nível sináptico, como aquelas decorrentes do aprendizado (Jonhston et al, 1996; Stuart et al, 1997). Este fenômeno poderia explicar o envolvimento dos canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo L em fenômenos plásticos, como sugerem nossos resultados.

6- CONCLUSÕES

Os resultados que obtivemos nos permitem concluir que:

- (1) – Quando administrada imediatamente após o aprendizado a Nifedipina é capaz de proporcionar um melhor desempenho dos animais da sessão de teste, indicando um efeito facilitador da droga. Este efeito é maior e estatisticamente significativo na dose mais alta (280ng/lado).
- (2) – Os efeitos facilitadores observados quando a administração da droga ocorre imediatamente após o aprendizado já não são estatisticamente significativos quando a administração é realizada trinta minutos após o treino.
- (3) – A Nifedipina não tem efeito quando administrada antes da sessão de treino, na dose estudada.

Nossos resultados não permitem selecionar apenas uma dentre várias hipóteses para explicar o efeito encontrado e outros trabalhos que busquem definir o mecanismo de ação do efeito nootrópico das dihidropiridinas serão de grande interesse devido ao potencial terapêutico destes fármacos.

7 BIBLIOGRAFIA

1. ANDERSON, B., RUTLEDGE, V. Age and Hemisphere effects on dendritic structure. **Brain**. V. 119, p. 1983-1990, 1996.
2. BANNERMANN, D.M., GOOD, M.A., BUTCHER, S.P., RAMSAY, M., MORRIS, G.M. Distinct components of spatial learning revealed by prior training and NMDA receptor blockage. **Nature**. V. 378, p. 182-186, 1995.
3. BEAR, M.F., CONNORS, B.W., PARADISO, M.A. neuroscience: Exploring the Brain. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996.
4. BLISS, T.V.P., COLLINGRIDGE, G.L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**. V. 361, p. 31-38, 1993.
5. BUNSEY, M., EICHENBAUM, H. Conservation of hippocampal memory function in rats and humans. **Nature**. V. 379, p. 255-257, 1996.
6. BURGOYNE, R.D., MORGAN, A. Calcium and secretory-vesicle dynamics. **TINS**. V. 18, n. 4, p. 191-195, 1995.
7. CAHILL, L. McGAUGH, J.L. Modulation of memory storage. **Current opinion in neurobiology**. V. 6, p. 237-242, 1996.
8. CLEMENTS, M.P., ROSE, S.P.R., TIUNOVA, A. ω -Conotoxin GVIA disrupts memory formation in the day-old chick. **Neurobiology of Learning and Memory**. V. 64, p. 276-284, 1995.
9. COLE, A.J., SAFFEN, D.W., BARABAN, J.M., WORLEY, P.F. Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neurons by synaptic NMDA receptor activation. **Nature**. V. 340, p. 474-476, 1989.
10. CONCEIÇÃO, I.M., MAIOLINI Jr, M. MATTIA, N.F. ET AL. Effects of withdrawal from long-term nifedipine administration on open-field habituation in the rat. **Brazilian J Med Biol Res**. V. 27, p. 1363-1367, 1994.
11. DEYO, R.A., PANKSEPP, J., CONNER, R.L. Nimodipine alters acquisition of a visual discrimination task in chicks. **Behavioral and Neural Biology**. V. 53, p. 149-152, 1990.
12. DEYO, R.A., NIX, D.A., PARKER, T.W. Nifedipine blocks retention of a visual discrimination task in chicks. **Behavioral and Neural Biology**. V. 57, p. 260-262, 1992.

13. DEYO, R.A., PANKSEEP, J., CONNER, R.L. Nimodipine alters acquisition of a visual discrimination task in chicks. **Behavioral and neural biology**. V. 53, P. 149-162, 1990.
14. DEYO, R.A., STRAUBE, K.T., DITERHOFT, J.F. Nimodipine facilitates associative learning in aging rabbits. **Science**. V. 243, p. 809-811, 1989.
15. DISTERHOFT, J.F., MOYER, J.R. THOMPSON, L.T. The calcium rationale in aging and Alzheimer's disease (Evidence from an animal model of normal aging). **Annals New York Academy of Sciences**. V.747, p. 382-406, 1994.
16. EDMONDS, B., KLEIN, M., DALE, N., KANDEL, E.R. Contributions of two types of calcium channels to synaptic transmission and plasticity. **Science**. V. 250, p.1142-1147, 1990.
17. EDWARDS, F.A. LTP- a structural model to explain inconsistencies. **TINS**. V. 18, n. 6, p. 250-255, 1995.
18. EICHENBAUM, H. Is the rodent hippocampus just for "place"? **Current opinion in Neurobiology**. V. 6, p. 187-195, 1996.
19. EICHENBAUM, H. The LTP-Memory connection. **Nature**. V. 378, p. 131-132, 1996.
20. FANELLI, R.J., RICHARD, T.M., CHISHOLM, J. Neuropharmacology of Nimodipine: From single channels to behavior. **Annals New York Academy of Sciences**. V. 747, p. 336-350, 1994.
21. GALLAGHER, M., CHIBA, A.A. The amigdala and emotion. **Current Opinion in Neurobiology**. V. 6, p. 221-227, 1996.
22. GHOSH, A., GREENBERG, M.E. Calcium signalling in neurons: molecular and cellular consequences. **Science**. V. 268, p. 239-247, 1995.
23. GROVER, L. M. & TEYLER, T.J. Two patterns of Long-Term Potentiation induced by different patterns of afferent activation. **Nature**. V. 347, 477-479, 1990.
24. HERING, R.I., GUO, X., LANGE, W.R. Nimodipine improves information processing in substance abusers. **Annals of New York Academy of Sciences**. V. 747, p. 153-162, 1994.
25. HILLE, B. Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors. **TINS**. V. 17, n. 12, p. 531-535, 1994.
26. HOFMANN, F., BIEL, M., FLOCKERZI, V. Molecular basis for calcium channel

- diversity. **Annu. Ver. Neurosci.** V. 17, p. 399-418, 1994.
27. HUBER, K.M., MAUK, M.D., KELLY, P.T. Distinct LTP induction mechanisms: contribution of NMDA receptors and voltage-dependent calcium channels. **Journal of Neurophysiology.** V. 73, n. 1, p. 270-270, 1995.
28. ISAACSON, R.L., JONHSTON, J.E., VARGAS, D.M. The effect of a calcium antagonist on the retention of simple associational learning. **Physiology & Behavior.** V. 42, P. 447-452, 1988.
29. ISAACSON, R.L., MAIER, D.L., MANDEL, A.H. Posttraining or Pretest administration of nimodipine fails to affect retention of a simple learned association. **Physiology & Behavior.** V. 46, p. 191-193, 1989.
30. IZQUIERDO, I. CHAVES, M. Synaptic mechanisms in hippocampus, amygdala and entorhinal cortex involved in memory formation, storage and expression. **Synaptic Mechanisms.**
31. IZQUIERDO, I. Nimodipine and the recovery of memory. **TIPS.** V. 11, p. ?, 1990.
32. IZQUIERDO, I. Pharmacological evidence for the role of long-term potentiation in memory. **The FASEB Journal.** V. 8, p. 1139-1145, 1994.
33. IZQUIERDO, I., MEDINA, J.H. Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. **Neurobiology of learning and memory.** V. 63, p. 19-32, 1995.
34. IZQUIERDO, I., MEDINA, J.H. The biochemistry of memory formation and its regulation by hormones and neuromodulators. **Psychobiology.** V. 25, n.1, p. 1-9, 1997.
35. JOHNSTON, D. A Missing Link? LTP and Learning. **Science.** V. 278, p. 401-402, 1997.
36. JONHSTON, D., MAGEE, J., COLBERT, C.M., CHRISTIE, B. Active Properties of Neuronal Dendrites. **Annual Review of Neuroscience.** V. 19, p. 165-186, 1996.
37. KANDEL, E.R., SCHWARTZ, J.H., JESSEL, T.M. Principles of Neural Science. 3 ed. EUA: Appleton & Lange, 1991.
38. LANDFIELD, P. W. increased hippocampal calcium activity in brain aging and dementia. **Annals New York Academy of Sciences.** V. ?, p. 351-362., ?.

39. LEVY, A.R., KONG, R.M., STILLMANN, M.J. ET AL. Nimodipine Improves Spatial Working Memory and elevates hippocampal acetylcholine in young rats. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**. V. 39, p. 781-786, 1991.
40. LIU, J., RUTLEDGE, A. TRIGGLE, D.J. Short-Term regulation of neuronal calcium channels by depolarization. **Annals New York Academy of Sciences**. V. 747, p. 119-133, 1994.
41. LYNCH, G., BAUDRY, M. The Biochemistry of Memory: A New and Specific Hypothesis. **Science**. V. 224, p. 1057-1063, 1984.
42. McGAUGH, J.L. DAWSON, R.G. Modification of memory storage processes. **Behavioral Sciences**. V. 16, p. 45-63, 1971.
43. McGAUGH, J.L. Time-Dependent Processes in Memory Storage. **Science**. V. 153, p. 1351-1358, 1966.
44. McMONAGLE-STRUCKO, K. AND FANELLI, R.J. Enhanced acquisition of reversal training in a spatial learning task in rats treated with cronic nimodipine. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. V. 44, p. 827-835, 1993.
45. MERVIS, R., KUNTZ, N., BURTON, D. ET AL. Structural-Functional correlates of neuroprotection in the aging rabbit by a calcium blocker (Nimodipine reverdses neocortical dendritic atrophy and improves memory retention). **Annals of New York Academy of Sciences**. V. 747 , p. 312-313, 1994.
46. MICHAELIS, M.L. Ion transport systems and calcium regulation in aging neurons. . **Annals New york Academy of Sciences**. V. 747, p. 407-417, 1994.
47. MILLS, L.R., NIESEN, C.E., SO, A.P. ET AL. N-type calcium channels are located on somata, dendrites and a subpopulation of dendritic spines on live hippocampal pyramidal neurons. **The journal of Neuroscience**. V. 14, n. 11, p. 6815-6824, 1994.
48. MORÓN, M.A, STEVENS, C.W., YAKSH, T.L. The antisuizure activity of dihydropyridine calcium channel antagonist in the conscous rat. **The journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. V. 252, n. 3, p. 1150-1155, 1990.
49. MORRIS, R.G.M., ANDERSON, E., LYNCH, G.S., BAUDRY, M. Selective impairment of learning and blockage of long term potentiation by N-metyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. **Nature**. V. 319, p. 774-776, 1986.
50. NAKAYAMA, H., TAKI, M., STREISSNIG, J., GLOSSMANN, H. CATTERALL, W.A., KANAOKA, H. Identification of 1,4-dihydrpyridine binding regions

- within the alfa1 subunit of skeletal muscle calcium channels by photoaffinity labeling with diazepam. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** V. 88, p. 9203-9207, 1991.
51. NICOLL, R.A., MALENKA, R.C.. Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. **Nature.** V. 377, p. 115-118, 1995.
52. PEARSON, H.A., CAMPBELL, V., BERROW, N. ET AL. Modulation of Voltage-dependent calcium channels in cultured neurons. **Annals New York Academy of Sciences.** V. ?, p. 324-334, ?.
53. QUATERMANN, D., HAWXHURST, A., ERMITA, B. Effects of the calcium channel blocker amlodipine on memory in mice. **Behavioral and neural biology.** V. 60, p. 211-219, 1993.
54. QUILLFELDT, J.A. Título Papel dos receptores glutamatérgicos do tipo AMPA na expressão da memória no córtex entorrinal e estruturas relacionadas . Porto Alegre : UFRGS, 1994. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1994.
55. RIEDEL, G. Function of metabotropic glutamate receptors in learning and memory. **TINS.** V. 19, n. 6, p. 219-224, 1996.
56. ROESLER, R. Efeito do diazepam sobre a memória de ratos jovens e adultos: Evidências farmacológicas de alterações nos receptores GABAa/Benzodiazepínicos durante o desenvolvimento. Porto Alegre : UFRGS. 40 p. Dissertação de bacharelado em Biofísica) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1994.
57. SAUCIER, D., CAIN, D. Spatial learning without NMDA receptor-dependent long-term potentiation. **Nature.** V. 378, p. 186-188, 1995.
58. SCRIBINE, A., SCHUURMAN, T., TRABER, J. Pharmacological basis for the use of nimodipine in central nervous system disorders. **FASEB journal.** V. 3, p. 1799-1806, 1989.
59. SILVER, R.A., LAMB, A.G., BOLSOVER, S.R. Calcium hotspots caused by L-channel clustering promote morphological changes in neuronal growth cone. **Nature.** V. 343, p. 751-754, 1990.
60. SIMPSON, P.B., CHALLISS, R.A.J., NAHORSKI, S.R. Neuronal calcium stores: activation and function. **TINS.** V. 18, n. 7, p. 299-306, 1995.
61. SKATTEBOL, A, BROWN, A.M., TRIGGLE, D.J. Homologous regulation of voltage-dependent calcium channels by 1,4-dihydropyridines. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** V. 160, n. 2, p. 929-936, 1989.

62. SMITTH, L.A., WANG, X., PEIXOTO, A.A., NEUMANN, E.K., HALL, L.M., HALL, J.C. A drosophila calcium channel alfa1 subunit gene maps to a genetic locus associated with behavioral and visual defects. **The Journal of Neuroscience**. V. 16, n. 24, p. 7868-7879, 1996.
63. SNUTCH, T.P., GILBERT, M.M. Molecular Structure of Ca⁺⁺ Channels. Receptor and Ion Channel nomenclature suplement. **Elsevier Trends Journals. Suplemento Especial**, 1997.
64. SOSSIN, W.S. Mechanisms for the generation of synapse specificity in long-term memory: the implications of a requirement for transcription. **TINS**. V. 19, n. 6, p. 215-218, 1996.
65. STARR, T.V.B., PRYSTAY, W. SNUTCH, T. Primary structure of calcium channel that is highly expressed in the rat cerebellum. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. V. 88, p. 5621-5625, jun. 1991.
66. STREISSNIG, J., MURPHY, B.J., CATTERALL, W.A. Dihydropyridine receptor of L-type calcium channels: Identification of binding domains for [³H](+)-PN200-110 and [³H]azidopine within the alfa1 subunit. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. V. 88, p. 10769-10773, 1991.
67. STUART, G., SPRUSTON, N., SAKMANN, B., HAUSSER, M. Action potential initiation and backpropagation of the mammalian CNS. **TINS**. V. 20, No, 3, p. 125-131, 1997.
68. THOMPSON, R.F., KRUPA, D.J. Organization of memory traces in the brain. **Annu. Ver. Neurosci**. V. 17, p. 519-549, 1994.
69. TSIEN, R.W. Calcium channels in excitable membranes. **Annu. Ver. Physiol**. V. 45, p. 341-358, 1983.
70. TSIEN, R.W., ELLINOR, P.T., HORNE, W.A. Molecular diversity of voltage-dependent Ca⁺² channels. **TIPS**. V. 12, p. 349-354, 1991.
71. TURNER, R.W., BAIMBRIDGE, K.G., MILLER, J.J. Calcium-Induced long-term potentiation in the hippocampus. **Neuroscience**. V. 7, n. 6, p. 1411-1416, 1982.
72. VERKHRATSKY, A., SHMIGOL, A., KIRISCHUK, S. ET AL. Age-dependent changes in calcium currents and calcium homeostasis in mammalian neurons. **Annals New York Academy of Sciences**. V. ?, p. 365-3380, ?.
73. WEINSTEIN, G.B. Effects of nimodipine and verapamil on cerebral blood flow and cerebrovascular reactivity in conscious rabbits. **Annals New York**

Academy of Sciences. V. 747, p. 334-335, 1994.

74. WESTENBROEK, R.E., AHLIJANIAN, M.K., CATTERALL, W.A. Clustering of L-type Ca^{++} channels at the base of major dendrites in hippocampal pyramidal neurons. **Nature**. V. 347, p. 281-284, 1990.
75. ZUPAN, G., MRSIC, J., SIMONIC, A. Effects of nicardipine, felodipine and nifedipine on passive avoidance behavior of intact and hipoxia exposed rats. **Arch. Int. Pharmacodyn**. V. 325, p. 61-69, 1993.
76. ZUPAN, G., VITEZIC, D., MRSIC, J. ET AL. Effects of nimodipine , felodipine and amlodipine on eletroconvulsive shock-induced amnesia in rats . **European Journal of Pharmacology**. V. 310, p. 103-106, 1996.