

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE
CREATINA SOBRE A MEMÓRIA EM RATOS**

Jociane de Carvalho Myskiw



Dissertação de Mestrado

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE
CREATINA SOBRE A MEMÓRIA EM RATOS**

Jociane de Carvalho Myskiw

PPGBT

Santa Maria, RS, Brasil

2005

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE
CREATINA SOBRE A MEMÓRIA EM RATOS**

Por

Jociane de Carvalho Myskiw

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica
Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria, como requisito parcial
para a obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica.

PPGBT

Santa Maria, RS, Brasil

2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA

**A comissão examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado**

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE
CREATINA SOBRE A MEMÓRIA EM RATOS**

Elaborada por

Jociane de Carvalho Myskiw

**como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica**

COMISSÃO EXAMINADORA

Carlos Fernando de Mello

(Orientador)

Cleide Cunha Moulin

Examinadora

Marino Muxfeldt Bianchin

Examinador

Santa Maria, 08 de Abril de 2005

***“Não se sabe verdadeiramente senão
aquilo que se sabe com a razão”
Silva (1997)***

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Carlos Mello, por ter me concedido a oportunidade de trabalhar sob sua orientação, oferecendo uma oportunidade única, e também por sua ajuda, dedicação, confiança no meu trabalho e principalmente pela amizade e experiência.

À Profa. Maribel Antonelo Rubin, por conceder um espaço em seu laboratório e pelos aparelhos, que sem eles a realização deste trabalho não seria possível.

Ao parceiro Nando, por ter me apresentado ao “mundo mágico da creatina” e por ter me deixado entrar em seu grupo, ou melhor, na “equipe show” da qual sempre vou fazer parte, mesmo à distância.

À Ana Fávia, Mauro, Nando e a Natasha, que me ajudaram na realização deste trabalho, foram amigos e parceiros em todos os momentos (inclusive nas festas), me ajudaram a entender o mundo da bioquímica, com muita paciência e companheirismo. Pelas risadas e brincadeiras nas horas de descontração e por todo o carinho que só a convivência traz, e só a falta mostra o quanto era importante.

As super poderosas Patrícia (Docinho), Daiane (Florzinha), e aos amigos Gustavo e Gabriela, pela amizade, por serem pessoas tão especiais. Meus queridos amigos que sempre que precisei estavam lá para me auxiliar, muito obrigado pelas risadas, fofocas, e por sempre estarem prontos para as festas.

Aos colegas do laboratório que sempre alegravam as festas no “espaço FAMA”, com sua presença transbordante de alegria. A todos aqueles que

de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho, pela sempre presente receptividade e acessibilidade, o meu muito obrigado!

E, finalmente, aos “quíqui”, vulgarmente conhecidos como ratos, que literalmente deram a vida pelo trabalho.

Agradeço a Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade e a CAPES, pelo apoio financeiro.

DEDICATÓRIA

Dedico a Deus pelo dom da vida, pelas oportunidades que me deste ao longo desta e por tê-la preenchido com pessoas tão maravilhosas.

Ao meu esposo Mauro, que me trouxe a Santa Maria e me ofereceu a oportunidade de realizar este mestrado, pelo exemplo de luta e dignidade, pelo amor, companheirismo, atenção, dedicação e paciência em todos estes anos. Obrigado por estar sempre ao meu lado e suportar as viagens semanais do trecho Pato Branco – Santa Maria.

Aos meus pais, Irene e Hélio, que nunca mediram esforços para que eu conseguisse alcançar os objetivos até hoje alcançados, por terem me dado condições materiais e morais e por serem exemplo de dedicação e renovação. Se hoje sou uma pessoa realizada, devo isso a vocês.

À minha irmã Jaqueline, pela coragem e determinação, que me influenciaram e por nunca deixar de torcer por mim, mesmo estando longe.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XII
1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Memória	14
1.2 Noções sobre a formação da memória	15
1.3 Creatina	19
1.4 Suplementação com creatina.....	22
2 OBJETIVOS.....	26
2.1 Objetivo Geral	27
2.2 Objetivos Específicos.....	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 Reagentes.....	29
3.2 Preparo das drogas e reagentes.....	29
3.3 Soluções	29
3.3.1 <i>Solução de Creatina</i>	29
3.3.2 <i>Solução de glutamato</i>	29
3.3.3 <i>Solução de MK-801</i>	30
3.4 Animais	30
3.4.1 <i>Cirurgia</i>	30
3.5 Testes comportamentais.....	30
3.5.1 <i>Esquiva inibitória</i>	30

3.5.2	<i>Teste do labirinto em cruz elevado, campo aberto e sensibilidade ao choque.</i>	31
3.5.3	<i>Análise estatística</i>	34
4	RESULTADOS	36
4.1	Efeito da administração de creatina nas fases da memória	37
4.2	Efeito da administração de creatina na atividade locomotora, ansiedade e sensibilidade ao choque.	39
4.3	Administração de creatina e dependência de estado	42
4.4	Administração de creatina e glutamato	45
4.5	Administração de MK-801 e dependência de estado	48
5	DISCUSSÃO	53
6	CONCLUSÕES	59
7	REFERÊNCIAS	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Síntese da creatina	20
Figura 2 – Efeito da administração pré-teste de creatina na latência do teste da esquiva inibitória..	37
Figura 3 – Efeito da administração pós-treino de creatina na latência do teste da tarefa de esquiva inibitória..	38
Figura 4 – Efeito da administração pré-teste de creatina na latência do teste da esquiva inibitória..	39
Figura 5 – Efeito da administração de creatina no teste de sensibilidade ao choque..	42
Figura 6 – Efeito da administração de creatina (1,87 mg/kg i.p.) pós-treino e pré-teste na latência do teste da esquiva inibitória (choque 0,7 mA)..	43
Figura 7 – Efeito da administração de creatina (1,87 mg/kg i.p.) pós-treino e pré-teste na latência do teste da esquiva inibitória (choque 0,5 mA)..	44
Figura 8 – Efeito da administração de glutamato pós-treino na latência do teste da esquiva inibitória..	46
Figura 9 – Efeito da administração de creatina (0,45 mg/kg, i.p.) pós-treino sobre a melhora da memória causada pelo glutamato (30 nmol; 0,5 μ l, intra-hipocampal) na latência do teste da esquiva inibitória..	47
Figura 10 – Efeito da administração de glutamato (3 nmol; 0,5 μ l, intra-hipocampal) pós-treino sobre o prejuízo da memória causada pela creatina (1,87 mg/kg, i.p.) na latência do teste da esquiva inibitória.....	48
Figura 11 – Efeito da administração de MK-801 pós-treino ou pré-teste na latência do teste da esquiva inibitória..	50
Figura 12 – Efeito da administração de MK-801 (0,03mg/kg i.p.) ou creatina (1,87 mg/kg i.p.) imediatamente pós-treino e 30 ou 15 minutos pré-teste na latência do teste da esquiva inibitória..	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeito da administração de creatina no comportamento de ratos no teste do campo aberto.....	40
Tabela 2 – Efeito da administração de creatina no comportamento de ratos no teste do labirinto em cruz elevado.....	41
Tabela 3 – Efeito da administração de creatina no comportamento de ratos no teste do campo aberto.....	44
Tabela 4 – Efeito da administração de creatina (0,45 mg/kg) ou glutamato (30 mmol) no comportamento de ratos no teste do campo aberto.	47
Tabela 5 – Efeito da administração de creatina (1,87mg/kg) ou glutamato (3 mM) no comportamento de ratos no teste do campo aberto.....	48
Tabela 6 – Efeito da administração de MK-801 no comportamento de ratos no teste do campo aberto.....	50
Tabela 7 – Efeito da administração de creatina (1,87 mg/kg) ou MK-801 (0,03 mg/kg) no comportamento de ratos no teste do campo aberto.	51

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADP – Adenosina difosfato
- AGAT – L-arginina: glicina amidino transferase
- ATP – Adenosina trifosfato
- AMPA – Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico
- ANOVA – Análise de variância
- AP-5 – Ácido D-2-amino-5-fosfonopentanóico
- CaMKII – Proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina do tipo II
- CK – Creatina quinase
- CK-Mi – Creatina quinase mitocondrial
- CPG – Ácido DL-beta-clorofenil glutâmico
- CREB – Proteína ligante do elemento responsivo ao AMPc
- Cr – Creatina
- GABA – Ácido δ -aminobutírico
- GAMT – S-adenosina L-metionina: N-guanidinoacetato metiltransferase
- mRGLU – Receptor glutamatérgico metabotrópico
- MK-801 – (+)5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,b]-ciclohepteno-5-10-amino
- MMA – Ácido metilmalônico
- NMDA – N-metil-D-aspartato
- MPTP – 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
- mPTP – Poro de transição de permeabilidade mitocondrial
- NaCl – Cloreto de sódio
- PCr – Fosfocreatina
- PO₄ – Tampão fosfato
- PKA – Proteína quinase A
- PKC – Proteína quinase dependente de cálcio
- PKG – Proteína quinase dependente de GMPc
- TCE – Trauma crânio-encefálico
- TNA – Translocase de nucleotídeos da adenina
- 3-NPA – Ácido 3-nitropropiônico

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DE CREATINA SOBRE A MEMÓRIA EM RATOS

Autora: Jociane de Carvalho Myskiw

Orientador: Carlos Fernando de Mello

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 08 de abril 2005.

A glicose é o substrato energético mais importante para as funções cerebrais, e possui um efeito benéfico sobre a memória de ratos. Outro substrato energético importante para as funções cerebrais é a creatina, produzida endogenamente e convertida em fosfocreatina, uma fonte imediata e importante de fosfato de alta energia, através da creatina quinase. Este suplemento é utilizado pelos atletas para melhorar a performance em exercícios de alta intensidade e curta duração, têm efeito neuroprotetor contra convulsões induzidas por ácido metilmalônico e N-metil-D-aspartato. Os objetivos do presente trabalho foram verificar os possíveis efeitos da administração aguda de creatina sobre as fases de aquisição, consolidação e evocação da memória de ratos na tarefa de esquiva inibitória; verificar se a creatina altera a ansiedade, a atividade locomotora e a sensibilidade ao choque de ratos; verificar se a creatina causa dependência de estado na tarefa de esquiva inibitória em ratos, verificar se os mecanismos glutamatérgicos estão envolvidos no efeito deletério da creatina sobre a memória dos ratos na tarefa de esquiva inibitória. Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que a creatina, quando administrada 15 minutos antes do treino (3,75 mg/kg, i.p.), imediatamente após o treino (1,87 mg/kg, i.p.) e 15 minutos antes do teste (7,5 mg/kg, i.p.), prejudica a memória dos ratos na tarefa de esquiva inibitória, e que este efeito não é devido a alterações na ansiedade, atividade locomotora e na sensibilidade dos animais ao choque. Observou-se que a creatina (1,87 mg/kg, i.p.) quando administrada imediatamente após o treino, causa dependência de estado na tarefa de esquiva inibitória. Tendo em vista a falta de estudos na literatura que mostram possíveis vias de ação da creatina sobre a memória, decidiu-se inferir possíveis mecanismos de ação para a creatina pela manipulação dos efeitos observados com o glutamato e bloqueador NMDA. A administração intra-hipocampal de glutamato, em uma dose que não apresenta efeito *per se*, reverte o prejuízo da memória causado pela administração de creatina, e a creatina em uma dose que não apresenta efeito *per se*, reverte a melhora da memória causada pela administração intra-hipocampal de glutamato na tarefa de esquiva inibitória. Verificou-se que a administração sistêmica de MK-801 pós-treino causa dependência de estado, e que a administração de creatina causa dependência de estado cruzada com o MK-801 na tarefa de esquiva inibitória. Com base nos resultados obtidos no presente trabalho pode-se concluir que a creatina prejudica a memória dos ratos nas fases de aquisição, consolidação e evocação. Tal déficit é devido a uma dependência de estado na tarefa de esquiva inibitória induzido pela creatina que envolve a via glutamatérgica, uma vez que a manipulação deste sistema pela injeção intra-hipocampal de glutamato reverte os efeitos da creatina e a creatina causa dependência de estado cruzada com MK-801 na tarefa de esquiva inibitória.

ABSTRACT

Post Graduate Program in Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

EFFECT OF THE SYSTEMIC INJECTION OF CREATINE ON THE MEMORY OF RATS

Author: Jociane de Carvalho Myskiw

Advisor: Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello

Place and date: Santa Maria, April 08th, 2005.

Glucose is the most important energy substrate for the central nervous system. Besides its energetic function, glucose facilitates memory in experimental animals, an effect that has been related to its energy functions. Other important cerebral energy substrate is creatine, which is endogenously synthesized and converted to phosphocreatine, an immediate and important source of high-energy phosphates, in a reaction catalysed by the enzyme creatine kinase. Athletes use this supplement to improve high intensity exercise performance. In addition creatine protects against convulsions induced by methylmalonic acid and N-methyl-D-aspartate. The aims of the present work, were to verify the possible effects of the acute administration of creatine on the acquisition, consolidation and evocation of the memory of the inhibitory avoidance task in rats; to verify whether creatine alters anxiety, locomotor activity and footshock sensitivity in rats; to determine whether creatine causes state dependence in the inhibitory avoidance task and whether glutamate-mediated mechanisms are involved in the deleterious effects of creatine on inhibitory avoidance memory. The results obtained in the current work show that creatine, administered 15 minutes before training (3.75 mg/kg, i.p.), immediately after training (1.87 mg/kg, i.p.) and 15 minutes before testing (7.5 mg/kg, i.p.), impaired animal performance at testing, and that these effects were not due to alterations in anxiety, locomotor activity or footshock sensitivity. Creatine (1.87 mg/kg, i.p.) administration, immediately after training, caused state dependence in the inhibitory avoidance task.

Since creatine protects against the glutamate-mediated neurotoxicity, we decided to investigate whether glutamate receptors are involved in the deleterious effects of creatine on memory. The intra-hippocampal administration of glutamate, at a dose that had no effect on memory, prevented the amnesic effect of systemically administered creatine. Accordingly, creatine at a dose that had no effect on memory per se, reverted the facilitatory effects of glutamate on the memory of the inhibitory avoidance task. Moreover, MK-801 and creatine caused cross-state dependence in the inhibitory avoidance task, providing additional pharmacological basis for a putative action of creatine on the glutamatergic system, particularly the NMDA receptor. Considering the results obtained in the present work we conclude that creatine impairs the acquisition, consolidation and evocation of inhibitory avoidance task. The effects of creatine on memory seems to be due state dependence associated with NMDA receptor blockade.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Memória

A memória é a capacidade que temos de armazenar informações que possam ser recuperadas e utilizadas posteriormente (Lent, 2004). O acervo de nossas memórias faz com que cada um de nós seja o que é, com que sejamos, cada um, um indivíduo, um ser para o qual não existe outro idêntico (Izquierdo, 2002).

Não somos aquilo que somos simplesmente porque pensamos. Somos aquilo que somos porque podemos lembrar aquilo que pensamos. Cada pensamento que temos, cada palavra que falamos, cada ação na qual nos engajamos, devemos a memória, a capacidade do nosso cérebro de registrar e armazenar nossas experiências. A memória é o cimento que une nossa vida mental, o arcabouço que mantém nossa história pessoal e torna possível crescermos e mudarmos ao longo da vida (Squire & Kandel, 2003).

A maior parte daquilo que sabemos sobre o mundo não estava em nosso cérebro ao nascer, mas foi adquirida por meio da experiência e mantida pela memória. Cada um, ao longo da vida, vai acumulando informações – o nome e o rosto de nossos amigos e das pessoas que amamos, álgebra e geografia, política e esportes (Squire & Kandel, 2003; Lent, 2004) e, como resultado, somos quem somos em grande parte porque lembramos; não podemos fazer aquilo que não sabemos como fazer, nem comunicar nada que desconheçamos, isto é, nada que não esteja em nossa memória (Izquierdo, 2002; Squire & Kandel, 2003).

A memória pode ser classificada quanto à sua natureza em explícita ou declarativa e implícita ou não-declarativa. A **memória explícita** reúne tudo o que podemos evocar (lembrar) por meio de palavras (daí o termo “declarativa”), sendo esta feita de modo consciente. Enquanto que a **memória implícita** refere-se àquelas memórias que não conseguimos verbalizar e não envolve evocação consciente (Lees & Jones, 2000; Kandel, 2001; Bear *et al.*, 2002; Lent, 2004).

O aprendizado e a formação desses dois tipos de memória dependem de estruturas cerebrais diferentes. As memórias explícitas requerem o lobo temporal medial e o hipocampo, e as memórias implícitas envolvem diferentes estruturas como a amígdala, gânglio basal e o cerebelo (Albright *et al.*, 2000; Lees & Jones, 2000).

A memória também pode ser classificada quanto ao seu tempo de retenção em memória de trabalho, memória de curta e longa duração e memória remota. A memória de **trabalho** é aquela que usamos para entender a realidade que nos rodeia. Este tipo de memória não forma "arquivos", e parece depender da atividade elétrica de células de uma região cerebral denominada córtex pré-frontal (Izquierdo, 2002; Izquierdo, 2004). As **memórias de curta duração** duram poucos minutos ou horas enquanto a **memória de longa duração** está sendo formada, se estas memórias durarem muitas meses ou anos costumam ser denominadas de **memórias remotas** (McGaugh, 1968; Mayford & Kandel, 1999; Lees & Jones, 2000; Izquierdo, 2002). As memórias de curta e de longa duração requerem as mesmas estruturas nervosas, mas envolvem mecanismos separados (Izquierdo *et al.*, 1998), e formam "arquivos". O período em que ocorre a formação da memória é chamado de período de "consolidação". Durante este período, a memória é lábil e sensível a vários tratamentos (fármacos e drogas de abuso, por exemplo) ou eventos, como um traumatismo craniano (Carew & Sutton, 2001; Taubenfeld *et al.*, 2001; Izquierdo, 2002; Squire & Kandel, 2003).

1.2 Noções sobre a formação da memória

Codificar é, literalmente, converter informações em códigos. Podemos dizer então, que o cérebro converte a realidade em códigos e a evoca por meio de códigos. Durante a evocação, ao reverter essa informação para o meio que nos rodeia, os neurônios reconvertem sinais bioquímicos ou estruturais em elétricos, de maneira que novamente nossos sentidos e nossa consciência

possam interpretá-los como pertencendo a um mundo real (Izquierdo, 2002; Squire & Kandel, 2004).

Há evidências de que os mecanismos bioquímicos pelos quais formamos a memória são diferentes dos mecanismos pelos quais a evocamos (Abel & Lattal, 2001; Izquierdo, 2004). Na formação das memórias de longa duração participam a expressão gênica, a síntese protéica, e várias vias metabólicas celulares vinculadas com esses processos. Na memória de curta duração não ocorre expressão gênica nem síntese protéica, pois sua formação ocorre em poucos segundos ou minutos, a partir da memória de trabalho, e seus mecanismos moleculares são mais simples que os da memória de longa duração (Abel & Kandel, 1998; Mayford & Kandel, 1999; Albright, *et al.*, 2000; Cammarota *et al.*, 2000; Kandel, 2001). Na evocação das memórias, participam algumas das vias bioquímicas utilizadas na formação das memórias de longa duração, mas não a ativação gênica e a síntese protéica (Izquierdo, 2004).

O processo de formação da memória envolve uma miríade de eventos moleculares, que ocorrem em lugares e estruturas diferentes no sistema nervoso central (Wyse *et al.*, 2004). Alterações na liberação de neurotransmissores pelos neurônios, e eficiência na comunicação entre tais neurônios no hipocampo, córtex cerebral e outras estruturas encefálicas, parecem ser eventos neuroquímicos primários para a formação da memória (McGaugh, 2000; McGaugh & Izquierdo, 2000).

Um dos principais neurotransmissores liberados pelos neurônios localizados nas estruturas cerebrais envolvidas na formação da memória é o glutamato. Este, quando liberado, se liga a receptores específicos: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA), cainato, N-metil-D-aspartato (NMDA) e receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mRGLU), que estão localizados no neurônio que recebe a informação (neurônio-alvo). Quando o glutamato se liga a tais receptores, provoca alterações no neurônio-alvo, abrindo canais iônicos, modificando segundos mensageiros, ativando proteína quinase C (PKC), proteína quinase G (PKG), proteínas quinase cálcio-calmodulina dependente (CAMK II), proteínas quinase A (PKA) e proteína ligante do elemento responsivo ao AMPc (CREB), etc, que por sua vez ativam

mecanismos intracelulares, culminando com a síntese protéica e no aumento na efetividade da transmissão de informações entre estes e outros neurônios, com os quais o neurônio-alvo se comunica. Todos esses processos estão sujeitos à modulação, inclusive por outros neurotransmissores diferentes do glutamato, entre estes, dopamina, noradrenalina, serotonina, acetilcolina, ácido γ -aminobutírico (GABA), que são liberados por neurônios presentes na própria estrutura ou em estruturas adjacentes (Bliss & Collingridge, 1993; Izquierdo, 1993; Cahill & McGaugh, 1998, McGaugh, 2000, Abel & Lattal, 2001; McGaugh, 2002).

A evocação da memória não é somente a "reativação" da memória. No momento da evocação, o cérebro deve recriar, em instantes, memórias que levaram horas para serem formadas. Frequentemente, quando evocamos uma dada memória, somente restituímos parte dela, não é como olhar um álbum de fotografias ou assistir a uma fita de vídeo do passado. Além disso, o processo de evocação da memória implica também em uma "reconsolidação" da memória prévia, uma vez que a informação armazenada é modificada durante a sua evocação (Taubenfeld *et al.*, 2001; Izquierdo, 2002; Dalmaz & Netto, 2004).

Muitas vezes não conseguimos evocar algumas memórias, e para conseguirmos realizar sua evocação é necessário reproduzir o "estado" neurohumoral, hormonal ou farmacológico, vigente no momento de sua aquisição, fenômeno este chamado de dependência de estado (Jackson *et al.*, 1992; Slot & Colpaert, 1999; Shulz *et al.*, 2000). As memórias ficam inacessíveis à evocação, a menos que as vias de acesso a elas sejam ativadas por alguma experiência que cause as mudanças neuroquímicas apropriadas para esse determinado contexto, estas memórias requerem certos estímulos que compreendam pelo menos parte da reprodução do estado em que foram originalmente adquiridas (Izquierdo, 2004).

Perder a memória leva a perda de si mesmo, a perda da história de uma vida e das interações duradouras com outros seres humanos. Quando a memória é perdida, perdemos a capacidade de recriar nosso passado e, em

conseqüência, perdemos a conexão com nós mesmos e com os outros (Squire & Kandel, 2003).

Das memórias adquiridas nem todas serão preservadas, e mesmo estas apresentarão diferentes níveis de detalhamento e intensidade. Existem alguns compostos que podem prejudicar ou facilitar a formação da memória (Squire & Kandel, 2003), como é o caso de antagonistas e agonistas do receptor NMDA, um subtipo de receptor glutamatérgico que desempenha um papel fundamental para os processos de aprendizagem e memória, uma vez que a administração sistêmica ou intracerebral de antagonistas ou bloqueadores do receptor NMDA altera o aprendizado e a memória de ratos em diversas tarefas (Izquierdo & Medina, 1995, 1997). Este é o caso do ácido-D-2-amino-5-fosfonopentanóico (AP5), antagonista do receptor NMDA que, quando administrado intracerebro-ventricular, causa prejuízo no desempenho dos ratos no labirinto aquático de Morris (Morris *et al.*, 1986). Outro exemplo é o (+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo{a,b}ciclohepteno-5,10-amino maleato (MK-801), um antagonista não-competitivo do receptor NMDA que, quando administrado sistemicamente, causa prejuízo na memória de ratos na tarefa de esquiva inibitória, assim como dependência de estado (Venable & Kelly, 1990; Harrod *et al.*, 2001).

Por outro lado, agonistas do receptor NMDA, como o glutamato (Izquierdo & Medina, 1995; Rubin *et al.*, 1997) e o ácido DL-beta-clorofenil glutâmico (CPG) melhoram a performance dos ratos na tarefa de esquiva inibitória e de camundongos no labirinto em T, respectivamente (Flood *et al.*, 1990).

Existem compostos que podem exercer efeito benéfico sobre a memória, como os substratos energéticos e outros, que facilitam a utilização destes substratos. A glicose é o principal substrato energético do sistema nervoso, sendo utilizado tanto pelos neurônios como pela glia. A administração sistêmica de glicose melhora a memória dos ratos na tarefa de esquiva inibitória (Gold, 1986), melhora a memória de ratos velhos no labirinto radial de 8 braços (Winocur & Gagnon, 1998) e reverte o prejuízo causado pela idade, em tarefas de alternância espontânea, como o labirinto em T (Stone *et al.*, 1992).

O vinpocetine exerce uma influência nos processos de aprendizado e memória, ele é capaz de aumentar o transporte e a captação de glicose pelos

neurônios, e aumentar o fluxo sanguíneo cerebral (McDaniel *et al.*, 2003), e melhora a evocação da memória dos ratos na tarefa de esQUIVA inibitória (DeNoble, 1987).

A acetil-L-carnitina, um éster de L-carnitina (ácido gama trimetilamino- β -hidroxibutírico), é um composto endógeno (Shug *et al.*, 1982) que possui um papel importante no metabolismo aeróbico. Sua função é de transportar ácidos graxos, sob a forma de ésteres de CoA, para o interior da mitocôndria para a β -oxidação (Fritz & Marquis, 1965). Tal transporte, acoplado à beta-oxidação, permite aumentar a concentração intramitocondrial acetil-CoA, ativando a fosforilação oxidativa pelo maior fornecimento de substratos energéticos (Dolezal & Tucek, 1981). Este suplemento melhora a utilização do oxigênio pela mitocôndria (Siliprandi *et al.*, 1965) e aumenta a produção de energia neural (McDaniel *et al.*, 2003). A suplementação crônica com acetil-L-carnitina melhora a função cognitiva e aumenta a longevidade de ratos idosos, assim como aumenta a performance de ratos em algumas tarefas de aprendizado e memória, como labirinto radial de 8 braços e o labirinto em T (Angelucci *et al.*, 1986; Caprioli *et al.*, 1989; Barnes *et al.*, 1990).

1.3 Creatina

A creatina é um substrato energético produzido endogenamente (1-2 g/dia) a partir dos aminoácidos glicina, arginina e metionina (Walker, 1979; Wyss & Kaddurah-Daouk, 2000 - Figura 1). A glicina e arginina formam guanidinoacetato e ornitina, em uma reação catalisada pela L-arginina: glicina amidino transferase (AGAT). O guanidinoacetato é formado no rim e transferido via corrente sanguínea para o fígado. No fígado, o grupo metil da S-adenosilmetionina é doado para o guanidinoacetato pela S-adenosilmetionina: N-guanidinoacetato metiltransferase (GAMT), formando creatina (Persky & Brazeau, 2001).

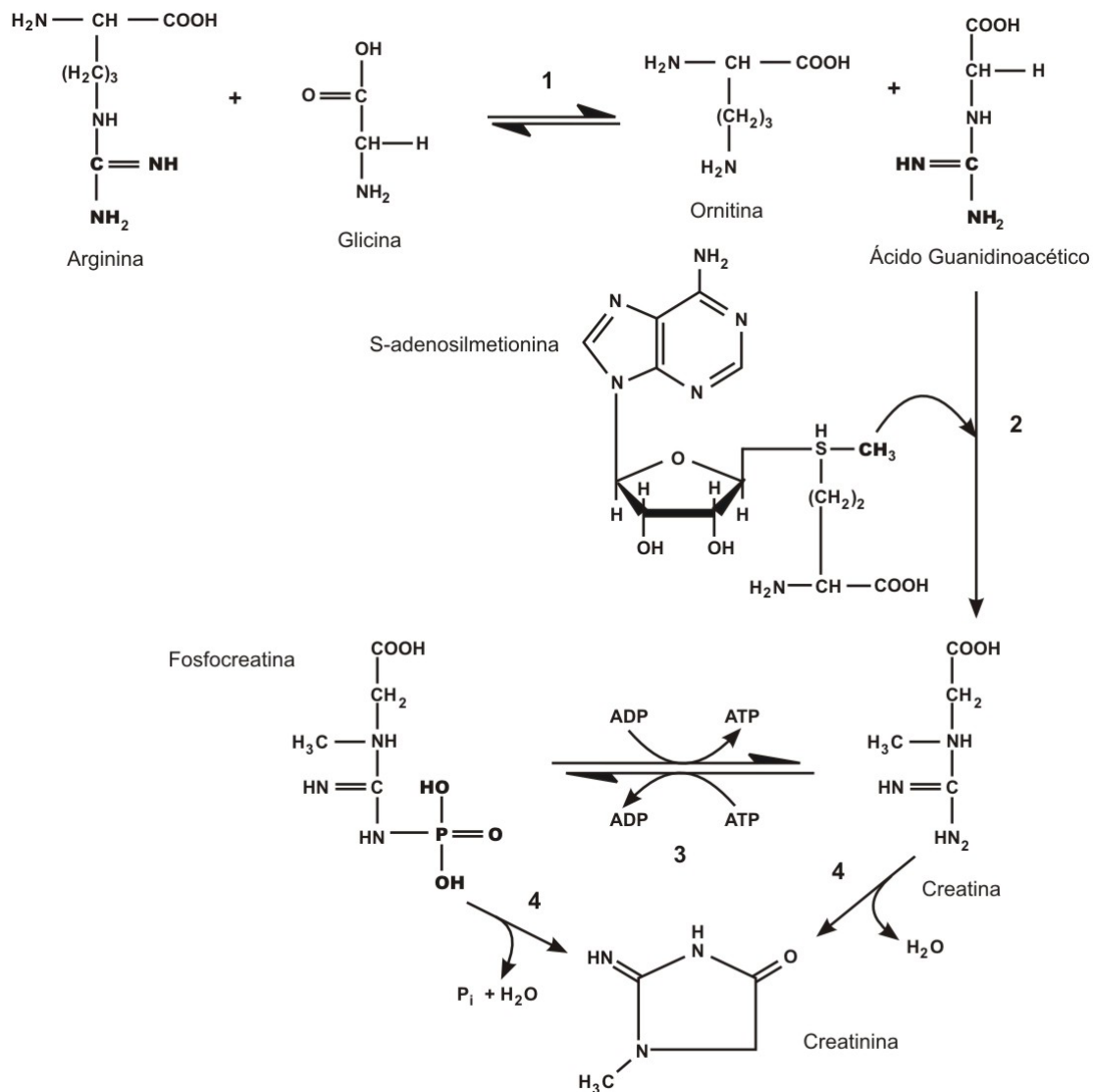
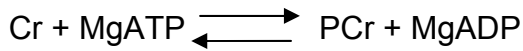


Figura 1 – Síntese da creatina

Uma vez formada, a creatina entra na circulação por difusão e pode ser eliminada pela filtração glomerular. A creatina pode, também, ser eliminada na forma de creatinina, que é o produto final da degradação da creatina, formada por uma reação não-enzimática e irreversível (Greenhaff, 1997). Parte da creatina plasmática é transportada para o interior dos tecidos contra um gradiente de concentração através de um transportador Na⁺/Cl⁻ dependente (Guerrero-Ontiveros & Wallimann, 1998). Nos tecidos com alta demanda de energia (Dechent *et al.*, 1999), a creatina pode ser armazenada tanto na forma

livre (Cr), quanto na forma fosforilada (PCr). A enzima creatina quinase (EC 2.7.3.2) catalisa a transferência reversível do grupo N-fosforil da adenosina trifosfato (ATP) para a creatina, formando fosfocreatina (PCr) e adenosina difosfato (ADP). Esta enzima é dependente de magnésio (Mg^{2+}) (Wyss *et al.*, 1992):



A creatina quinase (CK) possui diferentes isoformas, sendo estas citosólicas ou mitocondriais. Apesar de estar distribuída por todo o sistema nervoso central (Matthews *et al.*, 1999), estas isoformas são encontradas em maiores quantidades nas regiões do cérebro mais ricas em conexões sinápticas (Kaldis *et al.*, 1996).

As isoformas citosólicas formam dímeros, e são compostas pelas subunidades M (tipo muscular) e B (tipo cerebral). A isoforma MM-CK é encontrada predominantemente em músculo esquelético; a isoforma BB-CK no cérebro e músculo liso; e a isoforma MB-CK no músculo cardíaco (Wallimann *et al.*, 1992; Wyss *et al.*, 1992; Boehm *et al.*, 1996).

As isoformas da creatina quinase mitocondrial (CK-Mi), devido à sua localização, são chamadas de ubíqua (CK-Mia) e sarcomérica (CK-Mib). A isoforma sarcomérica é expressa no músculo cardíaco e no músculo esquelético, enquanto que a outra está expressa no cérebro e no músculo liso (Kanemitsu *et al.*, 2003). As isoenzimas mitocondriais estão localizadas no espaço intermembrana, na forma livre, ou então ligadas à membrana mitocondrial interna. Essas isoenzimas, distintamente das isoformas citosólicas, podem se apresentar tanto na forma dimérica quanto octamérica (Wyss *et al.*, 1992; Wallimann & Hemmer, 1994).

As diferentes isoenzimas da creatina quinase estão associadas com a transferência de energia dos sítios de produção de ATP para os sítios de consumo (Wyss *et al.*, 1992; O'Gorman *et al.*, 1996). A CK-Mi, na forma octamérica, interage simultaneamente com as membranas mitocondriais interna e externa, que está acoplada a translocase de nucleotídeos da adenina

(TNA), que transporta o ATP produzido pela fosforilação oxidativa. Dessa forma, a energia produzida no interior da mitocôndria, na forma de ATP, é transferida para o citosol na forma de PCr, pela da união cinética das três enzimas TNA, CK-Mi e porina (proteína poro-mitocondrial) formando um importante microcompartimento para o transporte de energia mitocondrial e metabolismo energético celular (Wallimann *et al.*, 1992). A creatina é considerada um excelente estimulador da respiração mitocondrial através da geração de PCr (O'Gorman *et al.*, 1996; Kerneć *et al.*, 1996).

A CK também está associada com a melhora da eficiência termodinâmica da hidrólise do ATP (Wallimann *et al.*, 1994), mantendo o equilíbrio global das razões de ATP/ADP e PCr/Cr, como no músculo esquelético onde as proporções destes metabólitos são aproximadamente 3-5 mM/10-20 μ M e 20-40 mM/10-15 mM respectivamente (Wallimann *et al.*, 1998).

Esta enzima também serve como tampão de energia, mantendo as concentrações de ATP e ADP estáveis, e tamponando H^+ . Essa função tamponante impede a rápida queda de ATP durante o trabalho celular e, ao mesmo tempo, evita uma acidificação intracelular esperada pela hidrólise do ATP durante o trabalho (Wallimann *et al.*, 1992).

A CK parece estar acoplada ao processo de energia requerida para a homeostase do Ca^{2+} (Wallimann *et al.*, 1992; Steeghs *et al.*, 1997), uma vez que a PCr que é essencial para a regulação normal do Ca^{2+} pelo retículo endoplasmático liso (de Groof *et al.*, 2002; Yang & Steele, 2002).

Evidências substanciais suportam um acoplamento funcional direto da creatina quinase com a Ca^{2+} -ATPase e Na^+,K^+ -ATPase, bem como com a manutenção e restauração do gradiente iônico antes e depois de uma despolarização (Dunant *et al.*, 1988; Hemmer & Wllimann, 1993).

1.4 Suplementação com creatina

A creatina (Cr), é um suplemento alimentar amplamente utilizado por atletas, para melhorar a performance em exercícios de alta intensidade e curta

duração (Persky & Brazeau, 2001), diminuir a fadiga muscular, proporcionar uma recuperação mais rápida após o exercício (Mujika & Padilla, 1997) e aumentar a massa muscular (Feldan *et al.*, 1999; Poortmans & Francaux, 2000).

Como consequência do consumo contínuo deste suplemento, ocorre um aumento do conteúdo de creatina total no músculo esquelético em ~20%, levando a uma melhora da performance muscular (Harris *et al.*, 1992; Balsom *et al.*, 1993) e diminuição do consumo de oxigênio durante o exercício (Nelson *et al.*, 2000).

Os benefícios da suplementação com creatina vão além destes obtidos pelos atletas, pois ela exerce efeito neuroprotetor dose-dependente contra depleção de dopamina induzida por MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) (Matthews *et al.*, 1999). Além disso, a creatina protege contra as lesões cerebrais induzidas por trauma crânio-encefálico (TCE), reduzindo a extensão do dano cortical em 36% nos camundongos e 50% nos ratos por um mecanismo envolvendo a manutenção da bioenergética mitocondrial e preservação dos níveis de ATP (Sullivan *et al.*, 2000).

Durante a suplementação de creatina, ocorre uma redução da produção endógena da mesma em humanos. Contudo, a produção endógena volta aos níveis normais após o término da suplementação (Walker, 1979). O aumento dos níveis de PCr no cérebro de ratos tratados com creatina tem sido apontado como o provável responsável pelo o efeito neuroprotetor deste aminoácido contra as convulsões induzidas por ácido metilmalônico (MMA) e NMDA (N-metil-D-aspartato). Contudo, um possível papel neuromodulador agudo, não-metabólico, deste composto sobre a transmissão glutamatérgica não pode ser descartado (Royes *et al.*, 2003).

Experimentos *in vitro* também mostram que a creatina pode prevenir o cérebro de disfunções mitocondriais, como a exposição ao ácido 3-nitropropionico (3-NPA, um inibidor da succinato desidrogenase), que diminui a síntese do ATP e causa stress oxidativo em neurônios (Brewer & Wallimann, 2000; Vis *et al.*, 2004). Este suplemento é capaz de retardar a depleção de ATP induzida por 3-NPA e prevenir a formação do poro de transição de

permeabilidade mitocondrial (mPTP) e a apoptose induzida por 3-NPA (Shiraishi *et al.*, 2001).

A creatina pode manter a transmissão sináptica e o potencial de ação via Na^+/K^+ -ATPase *in vitro*, durante situações de anóxia (Lipton & Wittingham, 1982), e proteger contra a queda nos níveis de ATP mantendo a transmissão sináptica excitatória e inibitória, após breves períodos de hipóxia (Luhmann & Heinemann, 1992). A susceptibilidade de humanos recém nascidos e ratos com até 2 dias de idade à hipóxia, está relacionada com uma baixa concentração de creatina e PCr no cérebro ainda em formação. Assim, a administração de creatina em filhotes de ratos por 3 dias, aumenta os níveis de PCr, diminuindo as convulsões e a morte induzida por hipóxia (Hotzman *et al.*, 1998). Sabe-se que a creatina passa a barreira placentária de ratas grávidas (Davis *et al.*, 1995), podendo ser utilizada para prevenir possíveis danos cerebrais em recém-nascidos, e também para o tratamento da deficiência congênita de creatina cerebral, que está associada a convulsões e fraqueza muscular (Stöckler *et al.*, 1994).

Estudos com camundongos transgênicos, em um modelo de esclerose lateral amiotrófica, mostram que suplementação com creatina protege os neurônios motores contra o dano oxidativo (Klivenyi *et al.*, 1999) e contra o aumento de Ca^{2+} intracelular e lipoperoxidação em modelos de doenças como Huntington e Parkinson (Matthews *et al.*, 1998).

É interessante que a creatina protege contra neurotoxicidade induzida pelo MPTP em camundongos transgênicos deficientes de CK-Mi_a, sugerindo que o efeito neuroprotetor da creatina não depende da creatina quinase mitocondrial. De fato, a creatina causa aumento significativo nas concentrações cerebrais de Cr e PCr, mantendo os níveis normais de ADP e ATP, mas reduz os níveis de AMP, sugerindo, neste caso, que o aumento da atividade da adenilato quinase possa contribuir para manutenção dos níveis de ATP pela creatina. A mitocôndria isolada do cérebro do camundongo mutante não mostrou nenhuma anormalidade na captação do Ca^{2+} , no potencial de membrana ou alteração no volume da matriz mitocondrial, sugerindo que o efeito neuroprotetor da creatina não seja mediado pela Mia-CK ou da inibição

do mPTP (Klivenyi *et al.*, 2004). Estes achados são confirmados no trabalho *in vitro* de Brustovetsky *et al.* (2001), no qual foi verificado que a creatina não tem efeito significativo sobre a formação do mPTP de mitocôndrias isoladas de cérebro de ratos. Estes resultados sugerem que a manutenção dos níveis de PCr e ATP, induzidos pela creatina, pode representar o primeiro e mais importante evento para o efeito neuroprotetor deste composto. Portanto, a administração de creatina é uma das estratégias promissoras para o tratamento de doenças em que ocorre déficit energético, como as doenças neurodegenerativas (Tarnopolsky & Beal, 2001).

Existem vários estudos mostrando os diferentes benefícios da suplementação com creatina. Contudo, pouco se sabe sobre o efeito da creatina no aprendizado e na memória de ratos.

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da administração aguda de creatina sobre a memória de ratos.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar o efeito da administração de creatina nas fases de aquisição, consolidação e evocação da memória em ratos na tarefa de esquiva inibitória;
- Verificar se a creatina causa ansiedade no labirinto em cruz elevado, altera a atividade locomotora no teste de campo aberto e causa sensibilidade ao choque.
- Verificar se a administração de creatina causa dependência de estado em ratos, na tarefa de esquiva inibitória;
- Inferir possíveis mecanismos de ação para a creatina pela manipulação dos efeitos observados com antagonista NMDA e glutamato.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Para a realização do presente estudo foram utilizados os seguintes reagentes:

- Cloreto de Sódio (NaCl), Ecibra;
- Creatina monoidratada, Dellaware;
- L-Glutamato foi adquirido, Sigma;
- MK-801, Sigma;
- Fosfato de sódio monobásico, Vetec.
- Fosfato de sódio dibásico, Vetec

3.2 Preparo das drogas e reagentes

A creatina foi preparada no mesmo dia da realização do experimento. O glutamato e o MK-801 foram preparados e congelados em alíquotas, e descongelados momentos antes de serem utilizados.

3.3 Soluções

3.3.1 Solução de Creatina

A creatina foi solubilizada em água ultrapurificada do tipo 1. O pH das soluções foi medido e ficou em torno de 7,4.

3.3.2 Solução de glutamato

O glutamato foi solubilizado em tampão fosfato 200 mM, pH 7,4.

3.3.3 Solução de MK-801

O MK-801 foi solubilizado em cloreto de sódio 0,9%.

3.4 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos (200 – 250 g), fornecidos pelo Biotério Central da UFSM, mantidos em ciclo claro-escuro natural, em temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, com alimento e água *ad libitum*.

3.4.1 Cirurgia

Os animais foram anestesiados com tionembutal (30 mg/kg, i.p.), e colocados em um aparelho estereotáxico para a inserção bilateral de uma cânula no hipocampo, nas coordenadas relativas ao bregma (A 4.0, L 3.0, V 2.0). Antes da anestesia os animais receberam uma injeção de cloranfenicol (200 mg/kg, i.p.).

Após quatro dias de recuperação, os animais foram utilizados para os testes comportamentais.

3.5 Testes comportamentais

3.5.1 Esquiva inibitória

Os animais foram submetidos a uma única sessão de treino em uma caixa de esquiva inibitória, e foram testados 24 horas depois. O aparelho consistiu de uma caixa de 30 X 25 X 25 cm com o assoalho formado por barras de metal (3 mm diâmetro, 1 cm entre elas) que conduzem corrente elétrica. A caixa possuía uma plataforma de madeira no lado esquerdo (7 X 25 X 2.5 cm) que isolava o animal das grades. Os animais foram colocados gentilmente

sobre a plataforma com a face voltada para o canto esquerdo da caixa. No momento que o rato descia da plataforma e colocava as quatro patas sobre as grades, recebia um choque elétrico de 0,5 mA ou 0,7 mA, por 3 segundos. A latência de descida da plataforma na sessão do teste foi tida como medida de retenção, e o tempo limite estabelecido para o teste foi de 360 ou 480 segundos, dependendo do experimento.

Efeito da administração de creatina nas diferentes fases da memória.

Os animais foram submetidos a uma única sessão de treino em uma caixa de esquiva inibitória, e testados 24 horas depois. Para estes experimentos o choque foi de 0,7 mA, e o tempo limite estabelecido para a descida na sessão de teste foi de 360 segundos.

No primeiro experimento, os animais receberam creatina (1,87; 3,75; 7,5 ou 15 mg/kg, i.p.) ou NaCl (0,9% - 10 ml/kg, i.p.), 15 minutos antes do treino ou 15 minutos antes do teste da esquiva inibitória.

No segundo experimento, os animais receberam creatina (0,45; 0,9; 1,87; 3,75; 7,5 ou 15 mg/kg, i.p.) ou NaCl (0,9% - 10 ml/kg, i.p.) imediatamente após o treino da esquiva inibitória.

3.5.2 Teste do labirinto em cruz elevado, campo aberto e sensibilidade ao choque.

Os animais receberam creatina (0,45; 0,9; 1,87; 3,75; 7,5 ou 15 mg/kg, i.p.) ou NaCl (0,9% - 10 ml/kg i.p.) 15 minutos antes dos testes, e foram testados seqüencialmente no labirinto em cruz elevado, campo aberto e sensibilidade ao choque.

O aparelho para o teste do labirinto em cruz elevado consistiu em uma estrutura de madeira elevada 50 cm do chão, incluindo dois braços abertos opostos, 50 x 10 cm, cruzados por dois braços fechados das mesmas dimensões, mas, com 40 cm de paredes. Os animais foram inicialmente

colocados no centro do labirinto com a face voltada para o braço aberto (File *et al.*, 1996). Os comportamentos registrados foram: número total de entradas e tempo gasto em cada braço e número total de “mergulhos” (movimento exploratório que o animal faz com a cabeça, olhando da borda do labirinto para o chão). O tempo de observação para cada animal foi de 5 minutos e, entre cada sessão de comportamento, o aparelho era limpo com solução de etanol a 30%.

Imediatamente após o teste no labirinto em cruz elevado, os animais foram transferidos para a área central de um campo aberto (56 cm de diâmetro), com seu assoalho dividido em 11 áreas iguais. Durante 5 minutos foi avaliado o número de áreas cruzadas com as quatro patas (cruzamentos) e o número de vezes que o animal ficava sobre as duas patas traseiras (levantar). Entre as sessões o aparelho foi limpo com solução de etanol 30%.

Imediatamente após o teste no campo aberto os animais foram transferidos para o mesmo aparelho utilizado para a tarefa de esquiva inibitória, exceto pela ausência da plataforma, com a finalidade de realizar o teste de sensibilidade ao choque. O protocolo utilizado foi adaptado de Roesler *et al.* (1999), os animais eram colocados no aparelho e após 3 minutos de habituação iniciava-se uma série de choques (1s) com 10 segundos de intervalo entre cada um. Os comportamentos observados foram: quando o animal tirava uma ou duas patas das grades (retirada da pata); quando o animal vocalizava (vocalização); e quando o animal retirava três ou quatro patas das grades (salto). A intensidade do choque variava de 0,1 em 0,1 mA até no máximo 1,10 mA. O ajuste da intensidade do choque foi feito de acordo com a resposta de cada animal. A intensidade do choque era elevada em uma unidade quando não obtínhamos nenhuma resposta, e diminuído uma unidade de choque quando uma resposta era obtida. Realizou-se duas medidas de cada comportamento, então foi feita uma média entre as duas medidas. O aparelho foi limpo com solução de etanol 30%.

Creatina e dependência de estado.

Os animais foram submetidos a uma única sessão de treino em uma caixa de esquiva inibitória, e foram testados 24 horas depois. Este experimento foi realizado com choque 0,7 mA e o mesmo experimento também foi realizado com choque 0,5 mA.

Para este experimento, os animais receberam creatina (1,87 mg/kg, i.p.) ou NaCl (0,9% - 10 ml/kg, i.p.) imediatamente após o treino e 15 minutos antes do teste da esquiva inibitória. O tempo limite estabelecido para o teste foi de 360 segundos.

Glutamato e creatina

Os animais foram submetidos a uma única sessão de treino em uma caixa de esquiva inibitória, e foram testados 24 horas depois. Para estes experimentos o choque foi de 0,7 mA, e o tempo limite estabelecido para o teste foi de 480 segundos.

No primeiro experimento, os animais receberam glutamato (3, 10 ou 30 nmol, 0,5 µl intra-hipocampal) ou veículo (tampão fosfato, 200 mM, 0,5 µl intra-hipocampal), 15 minutos após o treino da esquiva inibitória.

No segundo experimento, os animais receberam creatina (1,87 mg/kg) ou NaCl (0,9% - 10 ml/kg, i.p.), imediatamente após o treino da esquiva inibitória e 15 minutos depois, os mesmos animais receberam glutamato (3 nmol, 0,5 µl intra-hipocampal) ou veículo (tampão fosfato 200 mM, 0,5 µl intra-hipocampal). Imediatamente após o teste os animais foram submetidos ao teste do campo aberto.

No terceiro experimento, os animais receberam creatina (0,45 mg/kg) ou NaCl (0,9% - 10 ml/kg, i.p.) imediatamente após o treino da esquiva inibitória e, 15 minutos depois, os mesmos animais receberam glutamato (30 nmol, 0,5 µl intra-hipocampal) ou veículo (tampão fosfato 200 mM, 0,5 µl intra-hipocampal). Imediatamente após o teste os animais foram submetidos ao teste do campo aberto.

MK-801 e dependência de estado

Os animais foram submetidos a uma única sessão de treino em uma caixa de esquiva inibitória, e foram testados 24 horas depois. Para este experimento o choque foi de 0,5 mA.

Os animais receberam MK-801 (0,03 mg/kg, i.p.) ou veículo (0,9% NaCl - 10 ml/kg, i.p.) imediatamente após o treino e 30 minutos antes do teste da esquiva inibitória. O tempo limite estabelecido para o teste foi de 360 segundos. Imediatamente após o teste os animais foram submetidos ao teste do campo aberto.

Dependência de estado cruzada entre creatina e MK-801

Os animais foram submetidos a uma única sessão de treino em uma caixa de esquiva inibitória, e foram testados 24 horas depois. Para estes experimentos, o choque foi de 0,5 mA, e o tempo limite estabelecido para o teste foi de 360 segundos.

Os animais foram injetados com creatina (1,87 mg/kg, i.p.) ou NaCl (0,9% - 10 ml/kg, i.p.) ou MK-801 (0,03 mg/kg, i.p.) imediatamente após o treino. 30 minutos antes do teste os animais receberam MK-801 (0,03 mg/kg, i.p.) ou NaCl (0,9% - 10 ml/kg, i.p.) e, 15 minutos antes do teste da esquiva inibitória, os animais receberam creatina (1,87 mg/kg, i.p.) ou NaCl (0,9% - 10 ml/kg, i.p.). Imediatamente após o teste os animais foram submetidos ao teste do campo aberto.

3.5.3 Análise estatística

Os dados do teste da tarefa de esquiva inibitória foram analisados por Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn. Os dados do teste do campo aberto, labirinto em cruz elevado e de sensibilidade ao choque foram analisados por

análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido do teste de Student-Newman-Keuls (SNK).

4 RESULTADOS

4.1 Efeito da administração de creatina nas fases da memória

A Figura 2 mostra o efeito da administração pré-treino de creatina (1,87; 3,75; 7,5 ou 15 mg/kg i.p.) sobre a latência de descida da plataforma na sessão de teste na tarefa de esQUIVA inibitória. A análise estatística (teste de Kruskal-Wallis) revelou um efeito significativo do tratamento ($H=18,31$; $df=4$; $p<0,05$). Análise de comparações múltiplas (teste de Dunn) mostrou que a administração de creatina (3,75 mg/kg) diminuiu a latência de descida da plataforma na sessão de teste na tarefa de esQUIVA inibitória. Interessantemente, as outras doses de creatina testadas, não tiveram efeito na latência de descida da plataforma no teste.

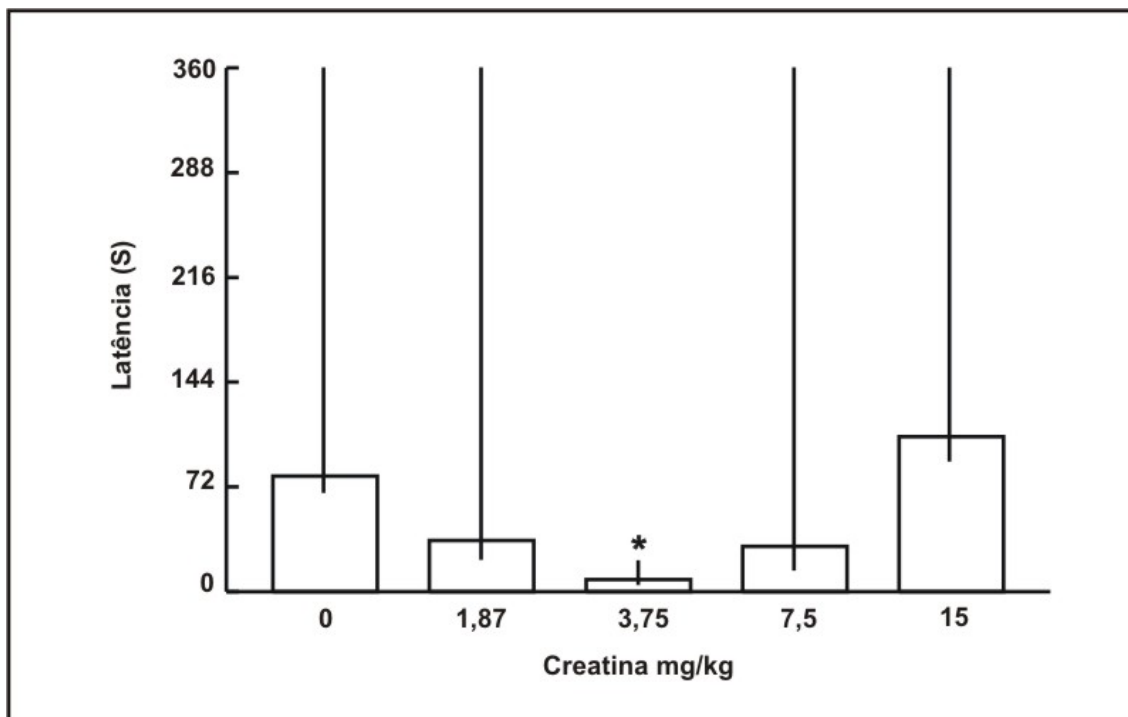


Figura 2 – Efeito da administração pré-treino de creatina (1,87; 3,75; 7,5 ou 15 mg/kg i.p.) sobre a latência de descida da plataforma na sessão de teste na tarefa de esQUIVA inibitória. Os dados são mostrados em mediana e intervalo interquartil. $n=14-15$ para cada grupo. *Indica diferença significativa ($p<0,05$) comparado com o grupo controle (Teste de Dunn).

A Figura 3 mostra o efeito da administração pós-treino de creatina (0,45; 0,9; 1,87; 3,75; 7,5 ou 15 mg/kg i.p.) sobre a latência de descida da plataforma na sessão de teste na tarefa de esquiva inibitória. Análise estatística (teste de Kruskal-Wallis) revelou um efeito significativo do tratamento ($H=23,92$; $df=6$; $p<0,05$). Análise de comparações múltiplas (teste de Dunn) mostrou que a administração de creatina (1,87 mg/kg) prejudicou a performance dos animais na tarefa de esquiva inibitória, sendo que altas doses de creatina (3,75-15 mg/kg) não tiveram efeito sobre a performance dos animais.

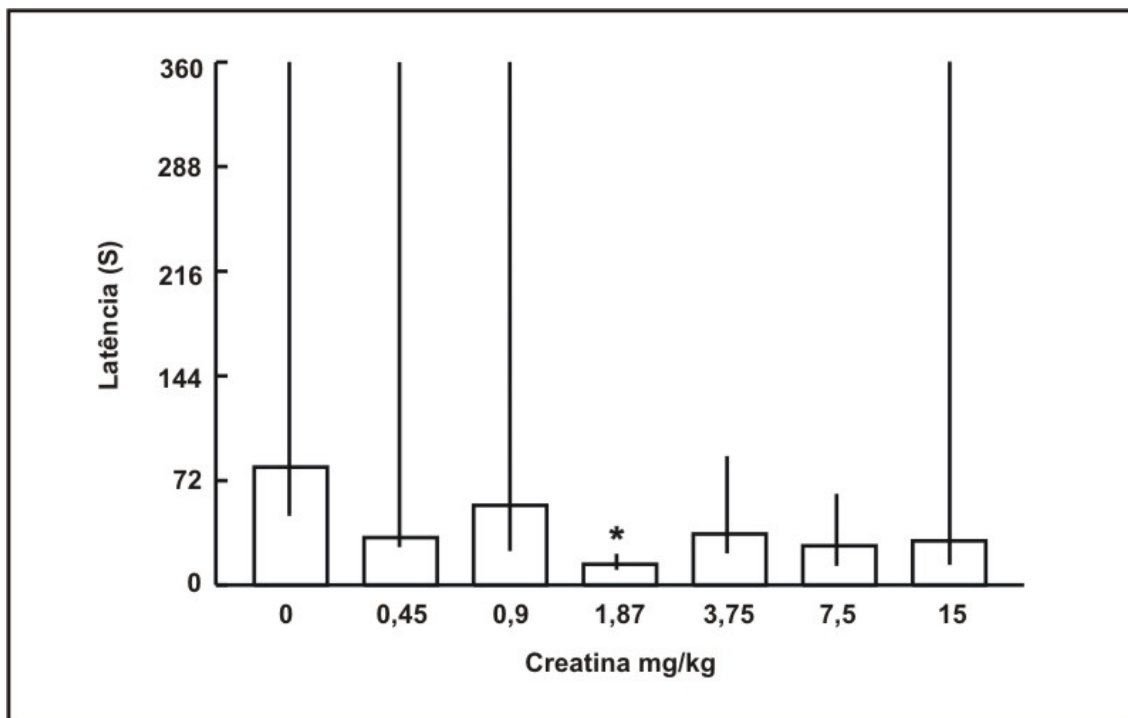


Figura 3 – Efeito da administração pós-treino de creatina (0,45; 0,9; 1,87; 3,75; 7,5 ou 15 mg/kg i.p.) sobre a latência de descida da plataforma na sessão de teste na tarefa de esquiva inibitória. Os dados são mostrados em mediana e intervalo interquartil. O $n=14-16$ para cada grupo. *Indica diferença significativa ($p<0,05$) comparado com o grupo controle (Teste de Dunn).

A Figura 4 mostra o efeito da administração pré-teste de creatina (1,87; 3,75; 7,5 ou 15 mg/kg, i.p.) sobre a latência de descida da plataforma na sessão de teste na tarefa de esquiva inibitória. Análise estatística (teste de Kruskal-Wallis) revelou um efeito significativo do tratamento ($H=18,15$; $df=4$;

$p < 0,05$). A análise de comparações múltiplas (teste de Dunn) mostrou que a creatina (7,5 mg/kg) diminuiu a latência de descida da plataforma na sessão de teste na tarefa de esquiva inibitória.

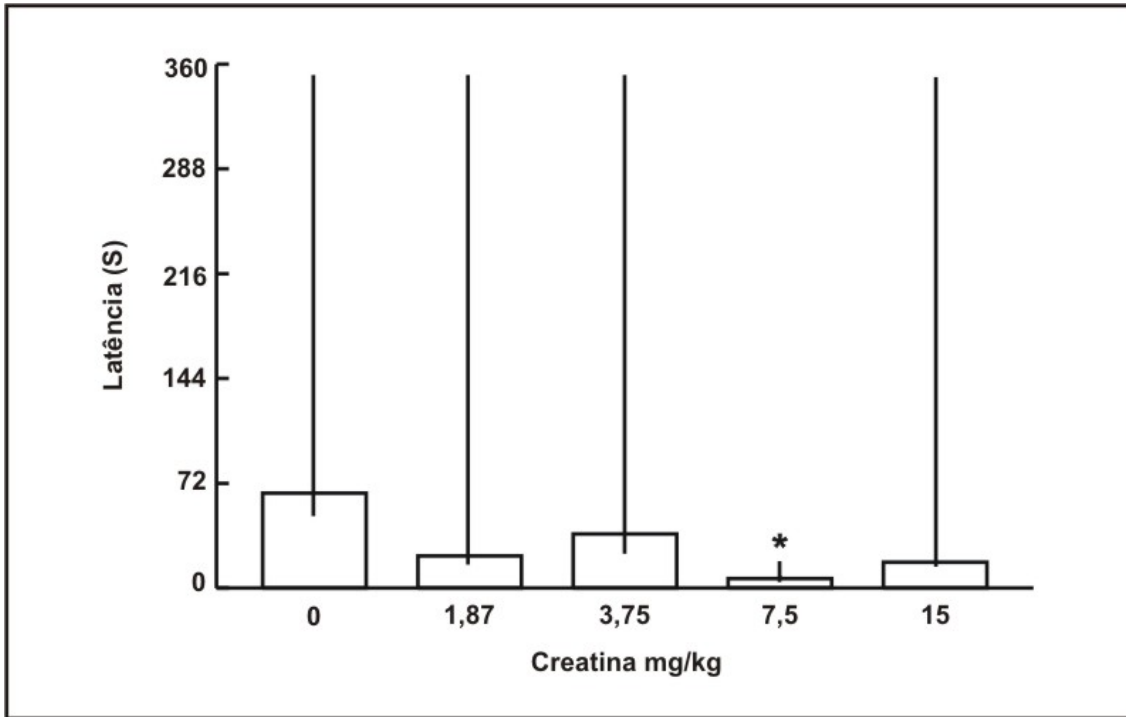


Figura 4 – Efeito da administração pré-teste de creatina (1,87; 3,75; 7,5 ou 15 mg/kg i.p.) sobre a latência de descida da plataforma na sessão de teste na tarefa de esquiva inibitória. Os dados são mostrados em mediana e intervalo interquartil. O $n=16$ para cada grupo. *Indica diferença significativa ($p < 0,05$) comparado com o grupo controle (Teste de Dunn).

4.2 Efeito da administração de creatina na atividade locomotora, ansiedade e sensibilidade ao choque.

Uma preocupação importante em tarefas motivadas pelo choque, particularmente naquelas em que se investigam o efeito de drogas na sua aquisição, é se o tratamento farmacológico afeta aspectos motivacionais do aprendizado, como atividade locomotora, ansiedade e a sensibilidade ao choque. Para avaliar se havia alguma alteração nestes possíveis fatores, uma

série de experimentos foram realizados para avaliar se a creatina afeta a atividade locomotora, ansiedade e a sensibilidade ao choque dos animais. A Tabela 1 mostra que a administração de creatina (0.45; 0.9; 1.87; 3.75; 7.5 ou 15 mg/kg i.p.), não alterou a atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto, como foi visto através do número de cruzamentos e o número das respostas de levantar. Além disso, administração de creatina não alterou o estado de ansiedade dos animais, como foi observado no teste do labirinto em cruz elevado (Tabela 2). A Figura 5 mostra que a administração de creatina não alterou a sensibilidade ao choque, como foi demonstrado pelas médias similares dos animais no parâmetro de retirada da pata da grade (ANOVA de uma via: $F(4,50)=0.480$, $p>0.05$), salto (ANOVA de uma via: $F(4,50)=0.305$, $p>0.05$), e vocalização (ANOVA de uma via: $F(4,50)=0.991$, $p>0.05$). Indicando que qualquer diferença que poderia aparecer na sessão do teste, não pode ser atribuída a uma alteração na ansiedade.

Tabela 1 – Efeito da administração de creatina (0,45; 0,9; 1,87; 3,75; 7,5 ou 15 mg/kg, i.p.) no comportamento de ratos no teste do campo aberto.

Droga	Cruzamentos	Levantar
NaCl 0.9% (10 ml/kg)	9,46 ± 0,87	19,69 ± 2,67
Creatina (0,45 mg/kg)	11,33 ± 1,83	24,46 ± 3,63
Creatina (0,9 mg/kg)	9,83 ± 1,52	23,53 ± 3,15
Creatina (1,87 mg/kg)	7,00 ± 0,87	16,71 ± 2,30
Creatina (3,75 mg/kg)	7,85 ± 2,26	16,00 ± 2,66
Creatina (7,5 mg/kg)	7,28 ± 1,18	16,87 ± 1,86
Creatina (15 mg/kg)	8,00 ± 2,50	15,87 ± 3,44
Análise Estatística	$F_{(6,92)}=0,8$; $p>0,05$	$F_{(6,92)}=1,3$; $p>0,05$

Os dados são mostrados como média ± erro padrão para n=13-15 animais em cada grupo.

Tabela 2 – Efeito da administração de creatina no comportamento de ratos no teste do labirinto em cruz elevado.

Droga	Porcentagem de tempo gasto nos braços abertos	Número de entrada nos braços abertos	Porcentagem de tempo gasto nos braços fechados	Número de entrada nos braços fechados	Número de mergulhos
NaCl 0.9% (10ml/kg)	9,42 ± 5,2	2,76 ± 1,47	86,97 ± 5,75	3,23 ± 0,55	3,00 ± 1,20
Creatina (0,45 mg/kg)	9,20 ± 2,23	2,13 ± 0,52	85,86 ± 2,46	4,80 ± 0,81	3,20 ± 0,89
Creatina (0,9 mg/kg)	13,97 ± 3,45	2,93 ± 0,70	80,02 ± 3,85	4,73 ± 0,79	5,06 ± 1,12
Creatina (1,87 mg/kg)	10,47 ± 2,73	2,00 ± 0,37	86,43 ± 3,20	3,14 ± 0,73	3,28 ± 0,74
Creatina (3,75 mg/kg)	6,19 ± 2,23	1,71 ± 0,68	89,81 ± 2,95	3,14 ± 0,67	2,00 ± 0,84
Creatina (7,5 mg/kg)	12,66 ± 2,49	2,42 ± 0,36	84,80 ± 2,54	3,71 ± 1,01	5,14 ± 1,20
Creatina (15 mg/kg)	6,41 ± 3,48	1,50 ± 0,73	87,87 ± 5,53	2,50 ± 0,56	1,50 ± 1,00
Análise Estatística	$F_{(6,88)}=0,5; p>0,05$	$F_{(6,88)}=0,3; p>0,05$	$F_{(6,88)}=0,5; p>0,05$	$F_{(6,88)}=1,3; p>0,05$	$F_{(6,88)}=1,4; p>0,05$

Os dados são mostrados como média ± erro padrão para n=13-15 animais em cada grupo.

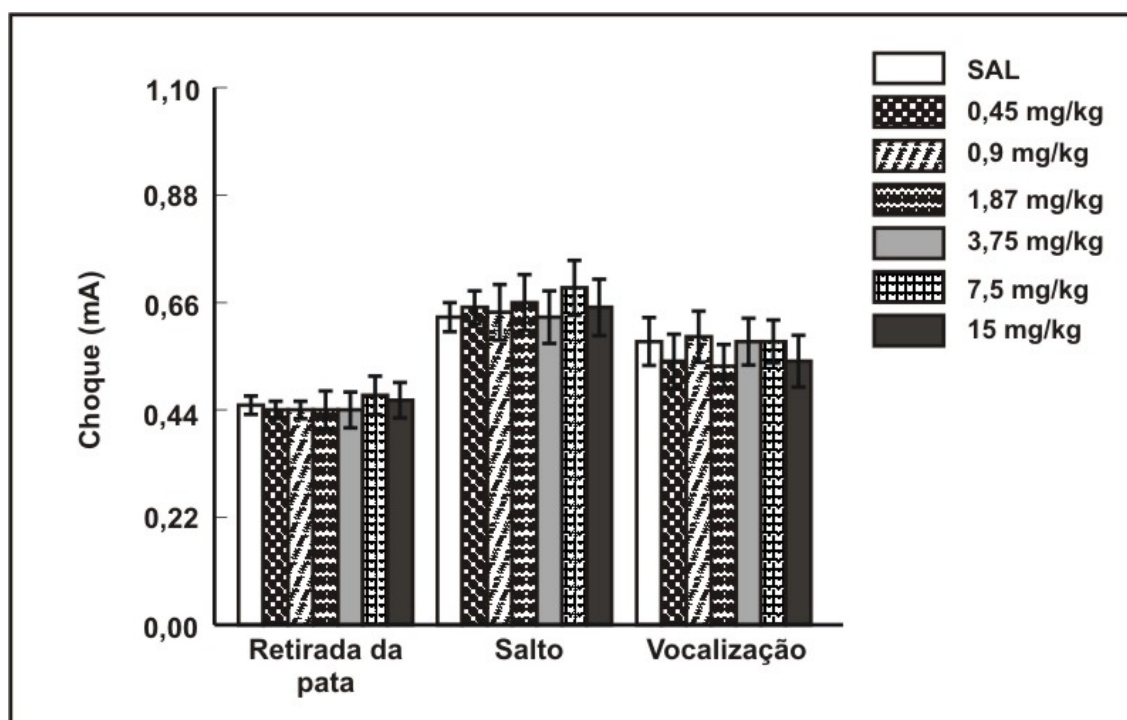


Figura 5 – Efeito da administração de creatina (0,45; 0,9; 1,87; 3,75; 7,5 ou 15 mg/kg, i.p.) no teste de sensibilidade ao choque. Os dados são mostrados como média \pm erro padrão; $n=13-15$ para cada grupo. Não há diferença significativa entre os grupos.

4.3 Administração de creatina e dependência de estado

Figura 6 mostra o efeito da administração de creatina (1,87 mg/kg, i.p.) pós-treino e pré-teste na latência do teste da esQUIVA inibitória quando foi utilizado choque 0,7 mA no treino. Análise estatística (teste de Kruskal-Wallis) revelou um efeito significativo do tratamento ($H=16,01$; $df=3$; $p<0.05$). Análise de comparações múltiplas (teste de Dunn) mostrou que a administração de creatina (1,87 mg/kg), imediatamente pós-treino, diminuiu a latência do teste da esQUIVA inibitória. A injeção de creatina 15 minutos pré-teste reverteu o prejuízo causado pela injeção pós-treino, indicando que o efeito da creatina nestas condições pode ser devido à dependência de estado.

Figura 7 mostra o efeito da administração de creatina (1,87 mg/kg, i.p.) pós-treino e pré-teste na latência do teste da esQUIVA inibitória quando foi utilizado choque 0,5 mA no treino. Análise estatística (teste de Kruskal-Wallis) revelou um efeito significativo do tratamento ($H=12,97$; $df=3$; $p<0,05$). Análise de comparações múltiplas (teste de Dunn) mostrou que a administração de creatina (1,87 mg/kg) imediatamente pós-treino diminuiu a latência do teste da esQUIVA inibitória. A injeção de creatina 15 minutos pré-teste reverteu o prejuízo causado pela injeção pós-treino, confirmando os achados do experimento anterior com choque de 0,7 mA de que o efeito da creatina pode ser devido à dependência de estado. A análise estatística (ANOVA uma via) mostrou que imediatamente após o teste de esQUIVA inibitória, o tratamento não alterou a atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto (Tabela 3).

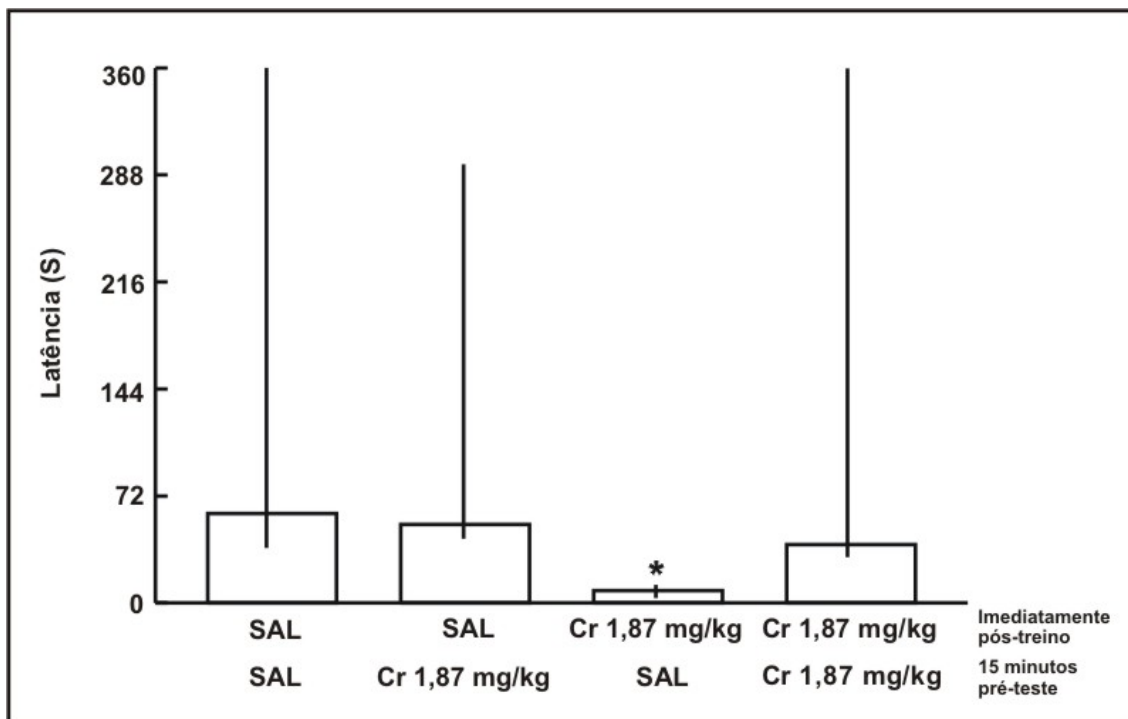


Figura 6 – Efeito da administração de creatina (1,87 mg/kg, i.p.) pós-treino e pré-teste sobre a latência de descida da plataforma na sessão de teste na tarefa de esQUIVA inibitória (choque 0,7 mA). Os dados são mostrados em mediana e intervalo interquartil. O $n=16$ para cada grupo. *Indica diferença significativa ($p<0,05$) comparado com o grupo controle (Teste de Dunn).

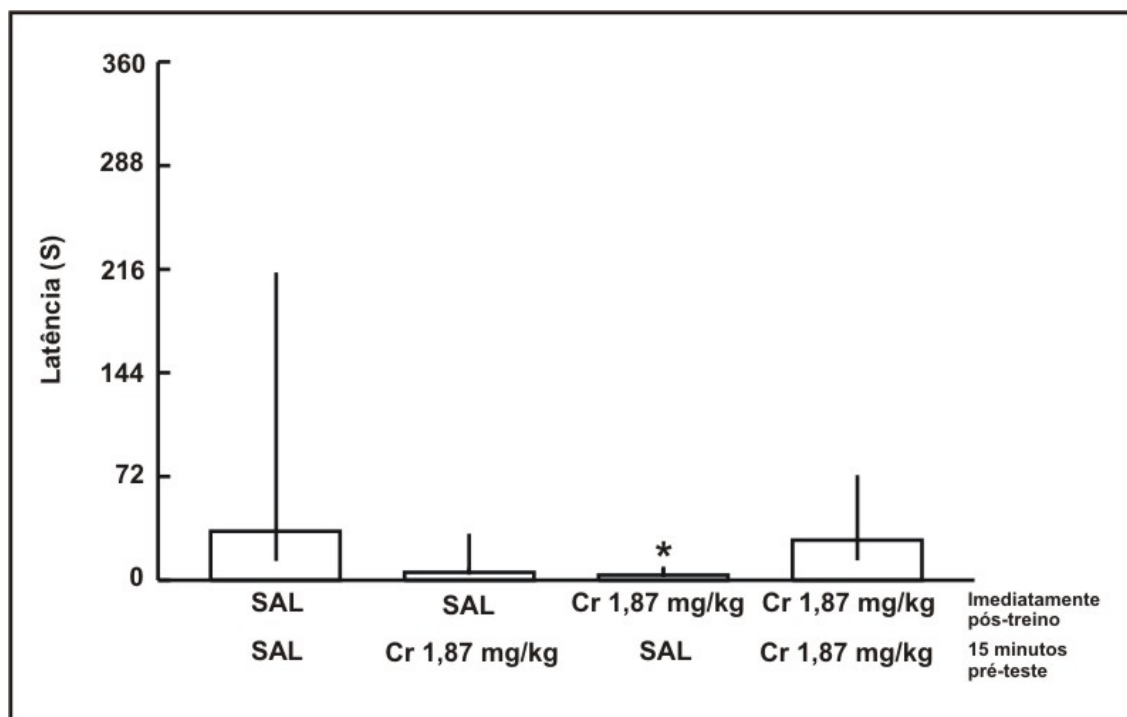


Figura 7 – Efeito da administração de creatina (1,87 mg/kg i.p.) pós-treino e pré-teste sobre a latência de descida da plataforma na sessão de teste na tarefa de esQUIVA inibitória (choque 0,5 mA). Os dados são mostrados em média \pm intervalo interquartil O n=12 para cada grupo. *Indica diferença significativa ($p < 0,05$) comparado com o grupo controle (Teste de Dunn).

Tabela 3 – Efeito da administração de creatina no comportamento de ratos no teste do campo aberto.

Droga (mg/kg)	Cruzamento	Levantar
NaCl 0,9% (10ml/kg)/ NaCl 0,9%	29,66 \pm 3,67	16,83 \pm 2,63
NaCl 0,9% (10ml/kg)/Cr (1,87)	33,0 \pm 1,55	17,16 \pm 1,89
Cr (1,87)/ NaCl 0,9%	28,08 \pm 4,03	13,58 \pm 1,61
Cr (1,87)/ Cr (1,87)	31,08 \pm 3,27	14,66 \pm 1,75
Análise Estatística	$F_{(3,44)}=0,4; p>0,05$	$F_{(3,44)}=0,7; p>0,05$

Os dados são mostrados como média \pm erro padrão para n=12 animais em cada grupo.

4.4 Administração de creatina e glutamato

A Figura 8 mostra o efeito da administração de glutamato (3, 10 ou 30 nmol, 0,5 μ l intra-hipocampal) 15 minutos pós-treino sobre a latência de descida da plataforma na sessão de teste na tarefa de esquiva inibitória. Análise estatística (teste de Kruskal-Wallis) revelou um efeito significativo do tratamento ($H=8,87$; $df=3$; $p<0,05$). Análise de comparações múltiplas (teste de Dunn) mostrou que a maior dose de glutamato (30 nmol) melhorou a performance dos animais na tarefa de esquiva inibitória.

A Figura 9 mostra o efeito da administração de glutamato (30 nmol, 0,5 μ l intra-hipocampal) 15 minutos pós-treino ou creatina (0,45 mg/kg i.p.) imediatamente pós-treino, sobre a latência de descida da plataforma na sessão de teste na tarefa de esquiva inibitória. Análise estatística (teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn) mostrou que a creatina reverteu a melhora da memória causada pelo glutamato ($H=9,59$; $df=3$; $p<0,05$) na tarefa de esquiva inibitória. A análise estatística (ANOVA uma via) mostrou que, imediatamente após o teste de esquiva inibitória, os tratamentos não alteraram a atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto (Tabela 4).

A Figura 10 mostra o efeito da administração de glutamato (3 nmol, 0,5 μ l intra-hipocampal) 15 minutos pós-treino ou creatina (1,87 mg/kg i.p.) imediatamente pós-treino, na latência do teste da esquiva inibitória. A análise estatística (teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn) mostrou que o glutamato reverteu o prejuízo causado pela creatina ($H=25,75$; $df=3$; $p<0,05$) na latência do teste da esquiva inibitória. A análise estatística (ANOVA uma via) mostrou que imediatamente após o teste de esquiva inibitória, os tratamentos não alteraram a atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto (Tabela 5).

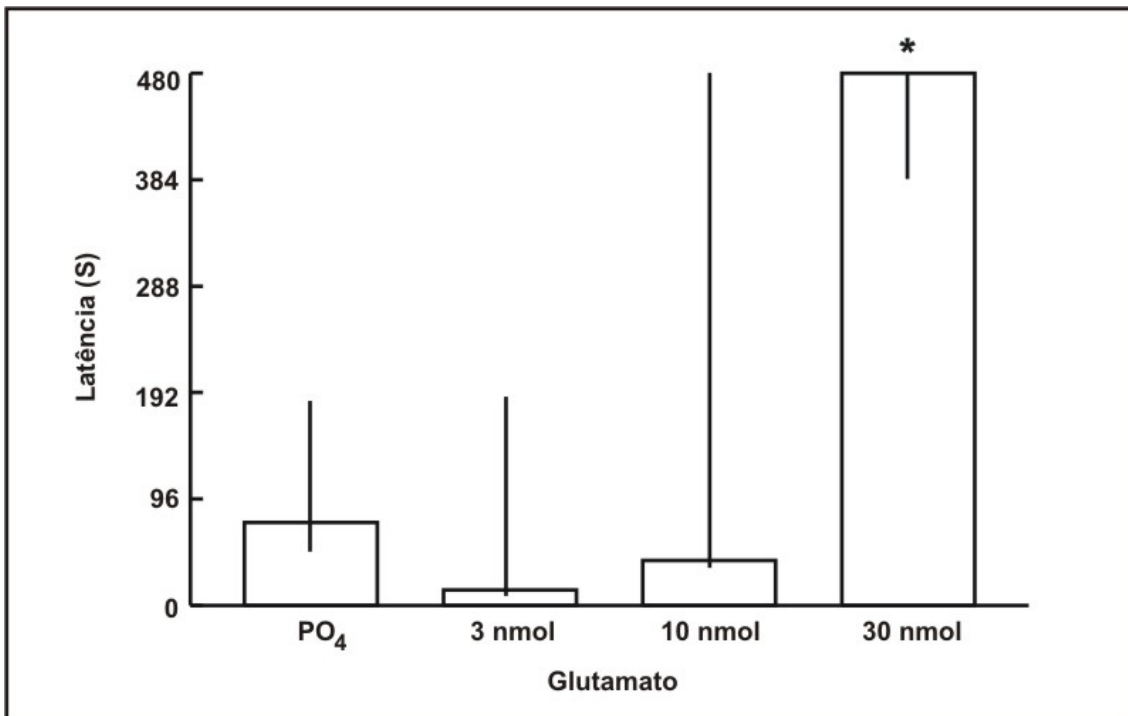


Figura 8 – Efeito da administração de glutamato (3; 10 ou 30 nmol; 0,5 μ l, intra-hipocampal) imediatamente pós-treino sobre a latência de descida da plataforma na sessão de teste na tarefa de esquiva inibitória. Os dados são mostrados em mediana e intervalo interquartil; n=9 para cada grupo. *Indica diferença significativa ($p < 0,05$) comparado com o grupo controle (Teste de Dunn).

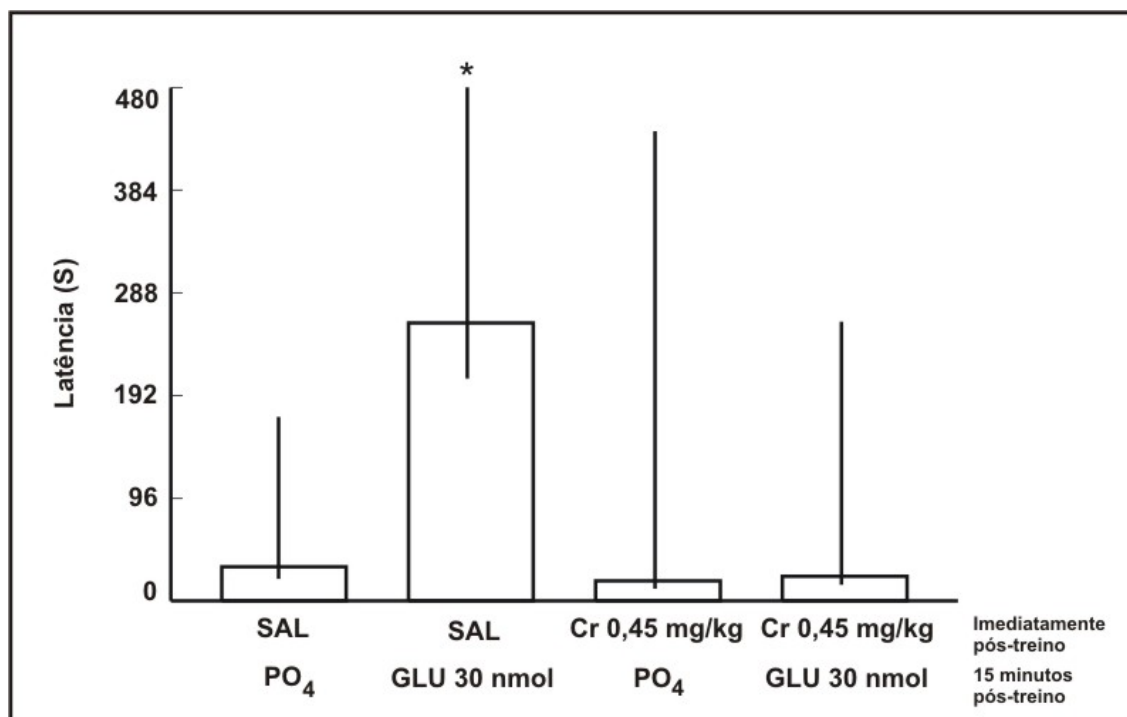


Figura 9 – Efeito da administração pós-treino de creatina (0,45 mg/kg, i.p.) sobre a melhora da memória causada pelo glutamato (30 nmol; 0,5 μ l, intra-hipocampal) sobre a latência de descida da plataforma na sessão de teste na tarefa de esqui inibitória. Os dados são mostrados em mediana e intervalo interquartil; n=16-17 para cada grupo. *Indica diferença significativa ($p < 0,05$) comparado com o grupo controle (Teste de Dunn).

Tabela 4 – Efeito da administração de creatina (0,45 mg/kg) ou glutamato (30 nmol) no comportamento de ratos no teste do campo aberto.

Droga	Cruzamentos	Levantar
NaCl 0,9% (10ml/kg)/PO ₄	20,76 \pm 2,63	9,29 \pm 2,12
NaCl 0,9% (10ml/kg)/Glu (30 nmol)	21,93 \pm 2,95	8,81 \pm 1,59
Cr (0,45 mg/kg)/PO ₄	22,43 \pm 2,63	8,00 \pm 1,21
Cr (0,45mg/kg)/Glu (30 nmol)	21,73 \pm 2,58	10,26 \pm 2,01
Análise Estatística	$F_{(3,64)}=0,06$; $p > 0,05$	$F_{(3,64)}=0,2$; $p > 0,05$

Os dados são mostrados como média \pm erro padrão para n=16-17 animais em cada grupo.

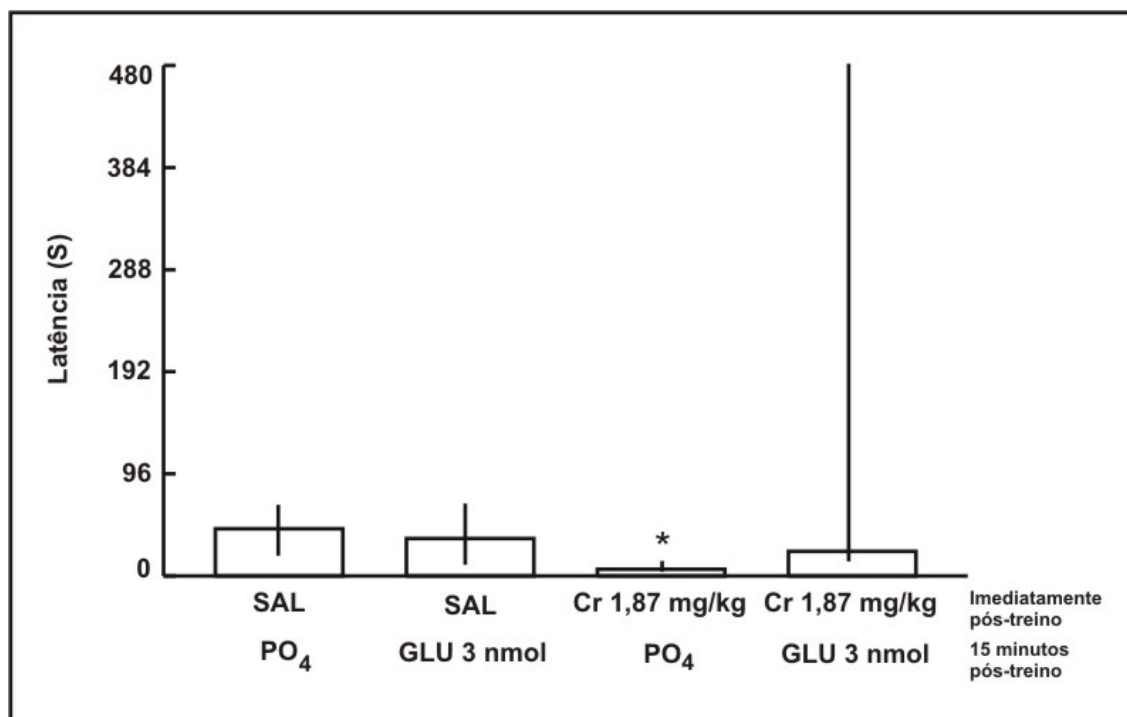


Figura 10 – Efeito da administração pós-treino de glutamato (3 nmol; 0,5 μ l, intra-hipocampal) sobre o prejuízo da memória causado pela creatina (1,87 mg/kg, i.p.) no teste da esQUIVA inibitória. Os dados são mostrados em mediana e intervalo interquartil; n=15-16 para cada grupo. *Indica diferença significativa ($p < 0,05$) comparado com o grupo controle (Teste de Dunn).

Tabela 5 – Efeito da administração de creatina (1,87mg/kg) ou glutamato (3 mM) no comportamento de ratos no teste do campo aberto.

Droga (mg/kg)	Cruzamentos	Levantar
NaCl 0,9% (10ml/kg)/PO ₄	26,00 \pm 2,24	8,80 \pm 0,79
NaCl 0,9% (10ml/kg)/Glu (3 nM)	21,66 \pm 2,60	7,66 \pm 1,017
Cr (1,87 mg/kg)/PO ₄	20,93 \pm 1,64	9,60 \pm 1,34
Cr (1,87 mg/kg)/Glu (3 nM)	22,62 \pm 3,35	9,31 \pm 1,44
Análise Estatística	$F_{(3,57)}=0,7$; $p > 0,05$	$F_{(3,57)}=0,5$; $p > 0,05$

Os dados são mostrados como média \pm erro padrão para n=15-16 animais em cada grupo.

4.5 Administração de MK-801 e dependência de estado.

A Figura 11 mostra o efeito da administração de MK-801 (0,03 mg/kg, i.p.) pós-treino e pré-teste na latência do teste da esQUIVA inibitória. Análise estatística (teste de Kruskal-Wallis) revelou um efeito significativo do tratamento ($H=14,45$; $df=3$; $p<0,05$). Análise de comparações múltiplas (teste de Dunn) mostrou que a administração de MK-801 (0,03 mg/kg, i.p.) imediatamente pós-treino diminuiu a latência do teste da esQUIVA inibitória. A injeção de MK-801 30 minutos pré-teste reverteu o prejuízo causado pela injeção pós-treino de MK-801, indicando que o efeito do MK-801 nestas condições pode ser devido à dependência de estado. A análise estatística (ANOVA uma via) mostrou que, imediatamente após o teste da esQUIVA inibitória, o tratamento não alterou a atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto (Tabela 6).

4.7 Dependência de estado cruzada entre creatina e MK-801.

A Figura 12 mostra o efeito da administração de MK-801 (0,03 mg/kg, i.p.) e creatina (1,87 mg/kg i.p.) pós-treino e pré-teste sobre a latência de descida da plataforma na sessão de teste na tarefa de esQUIVA inibitória. Análise estatística (teste de Kruskal-Wallis) revelou um efeito significativo dos tratamentos ($H=31,55$; $df=6$; $p<0,05$). Análise de comparações múltiplas (teste de Dunn) mostrou que a administração de MK-801, ou creatina, imediatamente pós-treino diminuiu a latência de descida da plataforma na sessão de teste. Além disso, a administração de MK-801 pré-teste reverteu a piora da memória induzida pela injeção pós-treino de creatina. Da mesma forma, a administração de creatina pré-teste reverteu a piora da memória induzida pela injeção pós-treino de MK-801, caracterizando o fenômeno de dependência de estado cruzada entre a creatina e o antagonista de receptores NMDA. A análise estatística (ANOVA uma via) mostrou que, imediatamente após o teste da esQUIVA inibitória, os tratamentos não alteraram a atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto (Tabela 7).

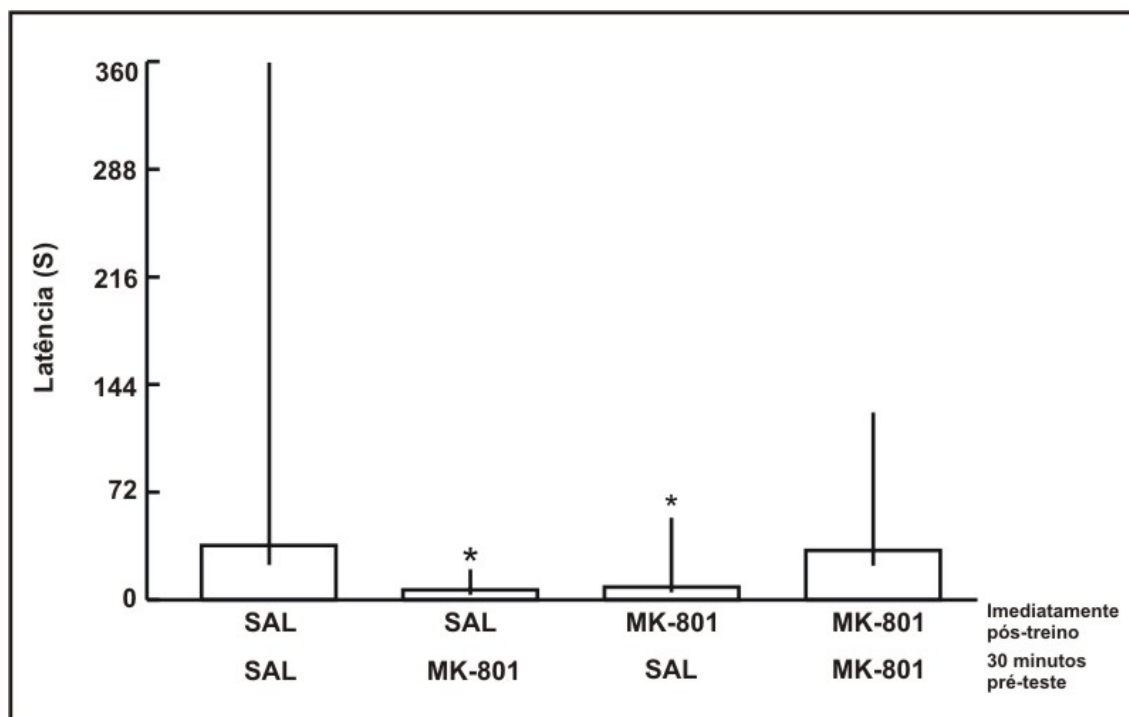


Figura 11 – Efeito da administração pós-treino e/ou pré-teste de MK-801 (0,03 mg/kg i.p.) sobre a latência de descida da plataforma na sessão de teste na tarefa de esquila inibitória. Os dados são mostrados em mediana e intervalo interquartil; n=15 para cada grupo. *Indica diferença significativa ($p < 0,05$) comparado com o grupo controle (Teste de Dunn).

Tabela 6 – Efeito da administração de MK-801 (0,03 mg/kg) no comportamento de ratos no teste do campo aberto.

Droga (mg/kg)	Cruzamento	Levantar
NaCl 0,9% (10ml/kg)/ NaCl 0,9%	28,7 ± 3,55	12,17 ± 1,39
NaCl 0,9%/MK- 801 (0,03)	32,06 ± 3,84	11,68 ± 1,51
MK-801 (0,03)/ NaCl 0,9%	26,07 ± 4,47	11,76 ± 2,06
MK-801 (0,03)/MK-801 (0,03)	26,57 ± 2,08	12,68 ± 1,43
Análise Estatística	$F_{(3,56)}=0,8; p>0,05$	$F_{(3,56)}=0,1; p>0,05$

Os dados são mostrados como média ± erro padrão para n=15 animais em cada grupo.

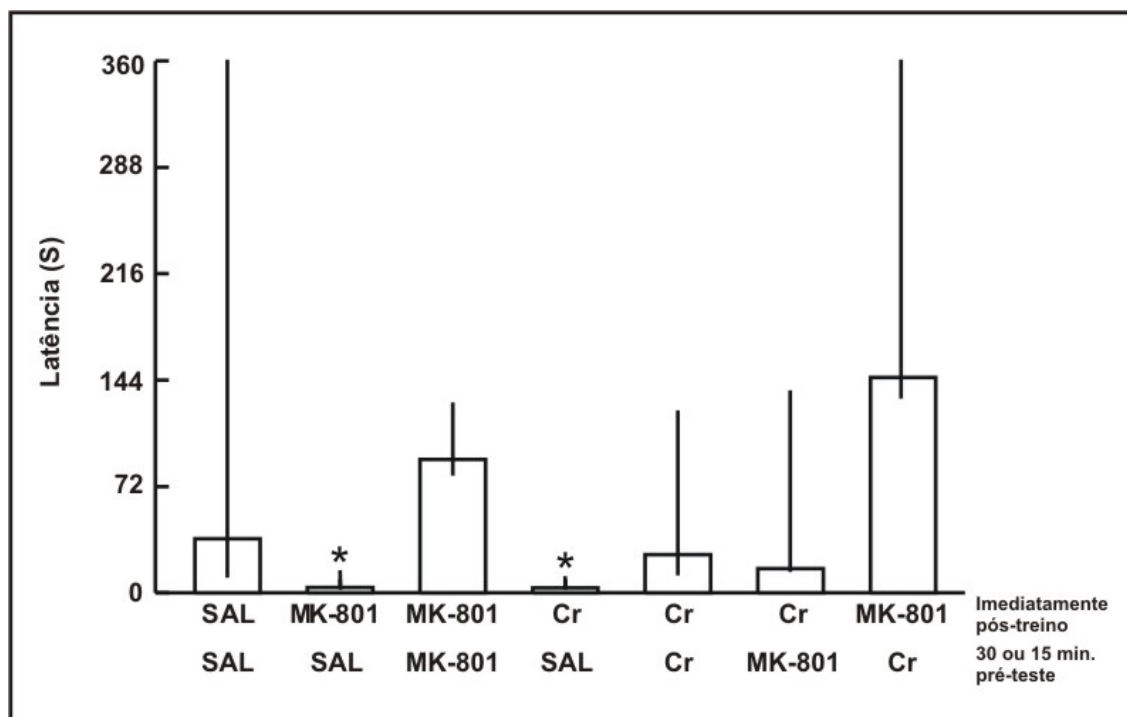


Figura 12 – Efeito da administração de MK-801 (0,03 mg/kg i.p.) ou creatina (1,87 mg/kg i.p.) imediatamente pós-treino e 30 ou 15 minutos pré-teste sobre a latência de descida da plataforma na sessão de teste na tarefa de esquila inibitória. Os dados são mostrados em mediana e intervalo interquartil; n=14 para cada grupo. *Indica diferença significativa ($p < 0,05$) comparado com o respectivo grupo controle (Teste de Dunn).

Tabela 7 – Efeito da administração de creatina (1,87 mg/kg) ou MK-801 (0,03 mg/kg) no comportamento de ratos no teste do campo aberto.

Droga (mg/kg)	Cruzamento	Levantar
NaCl 0,9% (10ml/kg)/ NaCl 0,9%	26,62 ± 6,67	15,12 ± 3,79
MK- 801 (0,03)/ NaCl 0,9%	29,28 ± 5,44	12,71 ± 2,77
MK-801 (0,03)/ MK- 801 (0,03)	28,42 ± 3,45	15,14 ± 2,71
Cr (1,87)/ NaCl 0,9%	23,85 ± 2,19	11,85 ± 1,28
Cr (1,87)/ Cr (1,87)	31,00 ± 3,35	12,57 ± 1,74
Cr (1,87)/MK-801 (0,03)	28,42 ± 3,46	10,42 ± 2,02
Mk-801 (0,03)/ Cr (1,87)	21,44 ± 3,68	7,11 ± 0,84
Análise Estatística	$F_{(6,88)}=0,6; p > 0,05$	$F_{(6,88)}=1,2; p > 0,05$

Os dados são mostrados como média \pm erro padrão para n=14 animais em cada grupo.

No presente estudo, verificou-se que a administração sistêmica de creatina 15 minutos pré-treino (3,75 mg/kg), ou imediatamente pós-treino (1,87 mg/kg) ou 15 minutos pré-teste (7,5 mg/kg), prejudicou a performance dos ratos na tarefa de esquiva inibitória. Com base nestes resultados, pode-se afirmar que a creatina, nestas doses, pode ter um efeito modulatório sobre as fases de aquisição, consolidação e evocação da memória dos ratos nesta tarefa. Interessantemente, para cada fase da memória, a dose de creatina que fez efeito foi diferente. Os resultados obtidos no teste do campo aberto, labirinto em cruz elevado e sensibilidade ao choque, mostram que o prejuízo causado na memória dos ratos na tarefa de esquiva inibitória, não pode ser atribuído a alterações causadas pela administração de creatina sobre a atividade locomotora, a ansiedade ou a sensibilidade ao choque, pois, como pôde ser observada a administração de creatina não alterou nenhum destes parâmetros comportamentais.

Com estes resultados, percebe-se que o tempo da administração da creatina, 15 minutos antes do treino ou do teste e imediatamente após o treino, da tarefa de esquiva inibitória, foi suficiente para este composto exercer um efeito significativo sobre a memória dos animais. Corroborando o achado de que 15 minutos após uma única administração de creatina i.p., os níveis deste composto no sangue atingem seu pico máximo (Perasso *et al.*, 2003).

Ao contrário dos resultados obtidos no presente trabalho com a administração aguda de creatina em ratos, a suplementação oral crônica (18 semanas) deste composto em humanos, possui um efeito benéfico em tarefas de memória e inteligência (Rae *et al.*, 2003).

Os resultados obtidos com a administração sistêmica de creatina são similares aos resultados encontrados com a utilização de antagonistas do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), como AP5, que causa prejuízo na memória de ratos, quando administrado intra-hipocampal pré-treino ou imediatamente pós-treino na tarefa de esquiva inibitória (Izquierdo *et al.*, 1992; Jerusalinsky *et al.*, 1992; Izquierdo & Medina, 1995), assim como, a

administração sistêmica de fenciclidina, pré-treino causa prejuízo na memória de ratos na tarefa de esquiva inibitória (Danysz *et al.*, 1988).

A administração sistêmica de creatina (1,87 mg/kg) imediatamente após o treino causou prejuízo na fase de consolidação da memória de ratos na tarefa de esquiva inibitória, e este prejuízo foi revertido pela administração da mesma droga 15 minutos antes do teste, indicando que o efeito da creatina, nestas condições, pode ser devido à dependência de estado. Os resultados indicam que os animais aprenderam a tarefa; porém, não conseguiam evocá-la no momento do teste. Tal evocação foi facilitada pela segunda dose de creatina antes do teste, indicando que teria ocorrido a formação da memória.

O mecanismo de formação da memória na tarefa de esquiva inibitória no hipocampo envolve, primeiramente, a ativação de receptores glutamatérgicos, AMPA, NMDA e metabotrópicos (Izquierdo & Medina, 1995; Cammarota *et al.*, 2004). Assim, antagonistas destes receptores são amnésicos (Izquierdo & Medina, 1997), ao contrário dos agonistas, que melhoram a memória (Rubin *et al.*, 1996).

O glutamato é o agonista natural dos receptores NMDA e não-NMDA, e melhora a performance dos ratos na tarefa de esquiva inibitória (Rubin *et al.*, 1996). Os resultados deste trabalho confirmam este efeito, pois a administração intra-hipocampal de glutamato (30 nmol, 0,5 μ l) 15 minutos após o treino melhorou a performance dos ratos na tarefa de esquiva inibitória. Estes dados confirmam a importância da ativação dos receptores glutamatérgicos na formação da memória.

Os resultados também mostraram que a administração intra-hipocampal de glutamato (3 nmol, 0,5 μ l), 15 minutos após o treino, em uma dose que não apresentou efeito *per se*, reverteu a piora da memória causada pela administração de creatina (1,87 mg/kg, i.p.), imediatamente após o treino, na tarefa de esquiva inibitória. Da mesma forma, a administração sistêmica de creatina (0,45 mg/kg), imediatamente após o treino, em uma dose que não apresentou efeito *per se*, reverteu a melhora da memória causada pela administração intra-hipocampal de glutamato (30 nmol, 0,5 μ l), 15 após o

treino, na tarefa de esquiva inibitória. Tais resultados indicam o sistema glutamatérgico como alvo da ação da creatina como modulador da memória.

O ácido glutâmico pode se acumular na sinapse como resultado do excesso da liberação do glutamato, e/ou por redução na captação de glutamato pelo neurônio pré-sináptico e astrócitos. A repetitiva excitação do neurônio pós-sináptico pelo excesso de glutamato resulta numa depleção irreversível de ATP (Nijjar & Belgrave, 1997). A suplementação com creatina reduz os níveis de glutamato cortical (Andreassen *et al.*, 2001), e facilita a remoção deste aminoácido excitatório da fenda sináptica, por um processo que necessita de energia. A PCr poder servir como uma fonte de energia direta para estimular a captação do glutamato da fenda sináptica e assim, reduzir o glutamato extracelular (Xu *et al.*, 1996). Portanto, não podemos descartar a possibilidade de que o antagonismo das ações facilitadoras do glutamato pela creatina não seja devido a uma maior remoção deste aminoácido.

No presente trabalho verificou-se que a administração sistêmica de MK-801 (0,03 mg/kg, i.p.), imediatamente após o treino, causou prejuízo na consolidação da memória de ratos na tarefa de esquiva inibitória. Estes achados confirmam trabalhos anteriores, que mostram que este antagonista não-competitivo do receptor NMDA causa prejuízo na memória dos ratos (Jackson *et al.*, 1992; Harrod *et al.*, 2001).

Tal prejuízo pôde ser revertido pela administração da mesma droga 30 minutos antes do teste, indicando que, mesmo com o bloqueio do receptor NMDA, o animal aprendeu a tarefa; porém, não conseguia evocá-la no momento do teste. Estes resultados são muito parecidos com os obtidos com a administração sistêmica de creatina mencionados acima, indicando que o efeito do MK-801, nestas condições, está associado à dependência de estado.

Estes resultados comprovam a importância do receptor glutamatérgico do tipo NMDA para a formação de memórias, e que o bloqueio deste receptor pode interferir com o processo de consolidação da memória (Reidel *et al.*, 2003). Comprova, também, que antagonistas do receptor NMDA, MK-801 e CGS 19755 causam dependência de estado, muito provavelmente mediada pelo receptor NMDA (Jackson *et al.*, 1992; Harrod *et al.*, 2001).

É interessante que, a dependência de estado causada pela administração de MK-801 pôde ser mantida pela administração de creatina. Da mesma forma, a dependência de estado causada pela administração de creatina pôde ser mantida pela administração de MK-801. Estes achados indicam que o “estado interno” promovido pela administração do MK-801 é mantido pela creatina, assim como, o “estado interno” promovido pela administração da creatina é mantido pelo MK-801, se constituindo evidência farmacológica de que estes compostos (creatina e MK-801) tenham mecanismos similares.

De fato, evidências apontam que a creatina e o MK-801 possuem efeito neuroprotetor sobre episódios convulsivos induzidos por MMA e NMDA, e de que há envolvimento de receptores NMDA nas convulsões induzidas por MMA (Royes *et al.*, 2003; de Mello *et al.*, 1996).

A administração oral de creatina produz um efeito neuroprotetor significativo contra lesão estriatal induzida por NMDA, mas não exerce efeito nas lesões induzida por AMPA ou ácido caínico, dando indícios de que seu efeito neuroprotetor seja mediado pelo receptor NMDA (Malcon *et al.*, 2000), e reforçando o achado de que a creatina possa ter algum papel sobre este receptor.

A creatina também exerce efeito neuroprotetor em outros modelos experimentais nos quais o MK-801 também tem efeito neuroprotetor, como as alterações mitocondriais induzida pelo 3-NPA. De fato, o bloqueio do receptor NMDA pelo MK-801 previne o aumento do Ca^{2+} mitocondrial e morte neuronal induzida pelo 3-NPA (Lee *et al.*, 2002), efeito parecido com o obtido pelo pré-tratamento com creatina, que previne a morte neuronal induzida por 3-NPA (Shiraishi *et al.*, 2001) e retarda o início do aumento do Ca^{2+} intracelular em astrócitos corticais e estriatais (Deshpande *et al.*, 1997).

Ao contrário do que se propõe como mecanismo de ação neuroprotetor para o MK-801, tem sido sugerido que a CK está acoplada ao processo de energia requerida para a homeostase do Ca^{2+} intracelular (Wallimann *et al.*, 1992; Steeghs *et al.*, 1997), assim como, na manutenção da bioenergética mitocondrial, preservação dos níveis de ATP e aumento dos níveis da PCr (Sullivan *et al.*, 2000). Tem sido sugerido que a ação neuroprotetora da

creatina é pela manutenção da bioenergética mitocondrial, preservação dos níveis de ATP e aumento dos níveis da PCr (Sullivan *et al.*, 2000). Existem indícios de que a creatina pode exercer seu efeito sobre a memória também via creatina quinase, pois, ratos transgênicos, deficientes da BB-CK ou CK-Mi_a, mostraram uma diminuição da habituação no campo aberto e maior dificuldade no aprendizado do labirinto aquático de Morris (Jost *et al.*, 2002; Streijger *et al.*, 2004). Ratos transgênicos deficientes de ambos, BB-CK e CK-Mi_a, apresentaram prejuízo no labirinto aquático de Morris e área circular com buracos na borda, diminuição na resposta do reflexo de *startle*, em contrapartida, não tiveram prejuízo na atividade exploratória no teste do campo aberto (Streijger *et al.*, 2005).

Entretanto, estudos mostram que a administração de creatina possui efeito neuroprotetor contra neurotoxicidade induzida por MPTP, mesmo na ausência da CK-Mi_a, sugerindo que o efeito neuroprotetor da creatina não depende da creatina quinase mitocondrial (Klivenyi *et al.*, 2004).

Muitos mecanismos diferentes são propostos para os possíveis efeitos da creatina, porém, nossos resultados indicam que provavelmente ela atue por um mecanismo diferente do proposto até agora, e que este mecanismo seja análogo ao do MK-801.

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que:

- ❖ A administração sistêmica de creatina 15 minutos antes do treino, imediatamente após o treino e 15 minutos antes do teste da tarefa de esquiva inibitória, prejudica as fases de aquisição, consolidação e evocação da memória dos ratos nesta tarefa.
- ❖ A administração sistêmica de creatina não altera a atividade locomotora, a ansiedade e a sensibilidade ao choque dos animais, que foram avaliados no teste do campo aberto, labirinto em cruz elevado e o teste de sensibilidade ao choque, respectivamente.
- ❖ A administração sistêmica de creatina causa dependência de estado em animais na tarefa de esquiva inibitória.
- ❖ A administração intra-hipocampal de glutamato, 15 minutos após o treino, melhora a consolidação da memória dos animais na tarefa de esquiva inibitória.
- ❖ A administração intra-hipocampal de glutamato, 15 minutos após o treino, em uma dose que não apresenta efeito *per se*, reverte o prejuízo da memória causado pela administração sistêmica de creatina, imediatamente após o treino, na tarefa de esquiva inibitória. Estes compostos, não alteram a atividade locomotora dos animais, no teste do campo aberto.
- ❖ A administração sistêmica de creatina, imediatamente após o treino, em uma dose que não apresenta efeito *per se*, reverte a melhora da memória causada pela administração intra-hipocampal de glutamato, 15 minutos após o treino, na tarefa de esquiva inibitória. Estes compostos, não alteram a atividade locomotora dos animais, no teste do campo aberto.

- ❖ A administração sistêmica de MK-801, imediatamente após o treino, causa dependência de estado nos animais na tarefa de esquiva inibitória. Este composto, não altera a atividade locomotora dos animais, no teste do campo aberto.

- ❖ A administração sistêmica de creatina causa dependência de estado cruzado com o MK-801 nos animais na tarefa de esquiva inibitória. Estes compostos, não alteram a atividade locomotora dos animais, no teste do campo aberto.

7 REFERÊNCIAS

- ABEL, T. & LATTAL, K. M. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. **Current Opinion in Neurobiology**, **11**: 180–187, 2001.
- ABEL, T. & KANDEL, E. Positive and negative regulatory mechanisms that mediate long-term memory storage. **Brain Research Reviews**, **26**: 360–378, 1998.
- ALBRIGHT, T. D.; KANDEL, E. R. & POSNER, M. I. Cognitive neuroscience. **Current Opinion in Neurobiology**, **10**: 612-624, 2000.
- ANDREASSEN, O. A.; JENKINS, B. G.; DEDEOGLU, A.; FERRANTE, K. L.; BOGDANOV, M. B.; KADDURAH-DAOUK, R. & BEAL, M. F. Increases in cortical glutamate concentrations in transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice are attenuated by creatine supplementation. **Journal of Neurochemistry**, **77**: 383-390, 2001.
- ANGELUCCI, L.; GHIRARDI, O.; PATACCHIOLI, F. R. & RAMACCI, M. T. Disinhibition of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis as a marker of brain aging in the rat: A model for the study of ant-aging agenst. **Clinical Neuropharmacology**, **9**: 104-106, 1986.
- BALSOM, P. D.; EKBLÖM, B.; SÖDERLUND, K.; SJÖDIN, B. & HULTMAN, E. Creatine supplementation and dynamic high-intensity intermittent exercise. **Scandinavian Journal Medicine and Science Sports**, **3**: 143-149, 1993.
- BARNES, C. A.; MARKOWSKA, A. L.; INGRAM, D. K.; KAMETANI, H.; SPANGLER, E. L.; LEMKEN, V. J. & OLTON, D. S. Acetyl-L-Carnitine 2: Effects on learning and memory performance of aged rats in simple and complex mazes. **Neurobiology Aging**, **11**: 499-506, 1990.
- BEAR, M. F.; CONNORS, B. W. & PARADISO, M. A. **Neurociência: desvendando o sistema nervoso**. 2ª edição, Porto Alegre: Artmed Editora S.A, 2002.

- BLISS, T. V. P. & COLLINGRIDGE, G. L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, **361**: 31-39, 1993.
- BOEHM, E. A.; RADDA, G. K.; TOMLIN, H. & CLARK, J. F. The utilisation of creatine and its analogues by cytosolic and mitochondrial creatine kinase. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1274**: 119-128, 1996.
- BREWER, G. J. & WALLIMANN, T. W. Protective effect of the energy precursor creatine against toxicity of glutamate and β -amyloid in rat hippocampal neurons. **Journal of Neurochemistry**, **74**: 1968-1978, 2000.
- BRUSTOVETSKY, N.; BRUSTOVETSKY, T. & DUBINSKY, J. M. On the mechanisms of neuroprotection by creatine and phosphocreatine. **Journal of Neurochemistry**, **76**: 425-434, 2001.
- CAHILL, L. & MCGAUGH, J. L. Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. **Trends in Neurosciences**, **21**: 294–299, 1998.
- CAMMAROTA, M.; BEVILAQUA, L. R. M.; ARDENGHI, P.; PARATCHA, G.; DE STEIN, M. L.; IZQUIERDO, I. & MEDINA, J. H. Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and ELK-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade. **Molecular Brain Research**, **76**: 36-46, 2000.
- CAMMAROTA, M.; BEVILAQUA, L. R. M.; BONINI, J. S.; ROSSATTO, J. I. MEDINA, J. H. & IZQUIERDO, I. Hippocampal glutamate receptors in fear memory consolidation. **Neurotoxicity Research**, **6**: 205-212, 2004.
- CAPRIOLI, A.; GHIRARDI, O.; RAMICCI, M. T. & ANGELUCCI, A. Age-dependent deficits in radial maze performance in the rat: effect of chronic treatment with acetyl-L-carnitine, Prog. Neuropsychopharm. **Biological Psychiatry**, **14**: 359, 1989.
- CAREW, T. J. & SUTTON, M. A. Molecular stepping stones in memory consolidation. **Nature**, **4**: 769-771, 2001

- DALMAZ, C. & NETTO, C. A. **A memória**. *Ciência e Cultura*, 56: 30–31, 2004.
- DANYSZ, W.; WROBLEWSKI, J. T. & COSTA, E. Learning impairment in rats by N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. **Neuropharmacology**, 27: 653-656, 1988.
- DAVIS, B. M.; MILLER, R. K.; BRENT, R. L. & KOSZALKA, T. R. Materno-fetal transport of creatine in the rat. **Journal of Neurochemistry**, 64: 742-748, 1995.
- DE GROOF, A. J. C.; FRANSEN, J. A. M.; ERRINGTON, R. J.; WILLEMS, P. H. G. M.; WIERINGA, B. & KOOPMAN, W. J. H. The creatine kinase system is essential for optimal refill of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} store in skeletal muscle. **Journal of Biological Chemistry**, 277:5275-5284, 2002.
- DE MELLO, C. F.; BEGNINI, J.; JIMÉNEZ-BERNAL, R. E.; RUBIN, M. A.; DE BASTIANI, J.; DA COSTA, E. J. R. & WAJNER, M. Intrastratial methylmalonic acid administration induces rotational behavior and convulsions through glutamatergic mechanisms. **Brain Research**, 721: 120-125, 1996.
- DECHENT, P.; POWWELS, P. J. W.; WILKEN, B.; HANEFELD, F. & FRAHM, J. Increase of total creatine in human brain after oral supplementation of creatine-monohydrate. **American Journal of Physiology**, 277: R698-R704, 1999.
- DeNOBLE, V. J. Vinpocetine enhances retrieval of a step-through passive avoidance response in rats. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, 26: 183-186, 1987.
- DESHPANDE, S. B.; FUKUDA, A. & NISHINO, H. 3-nitropropionic acid increases the intracellular Ca^{2+} in cultured astrocytes by reverse operation of the Na^+-Ca^{2+} exchanger. **Experimental Neurology**, 145: 38-45, 1997.

- DOLEZAL, V. & TUCEK, S. Utilization of citrate, acetylcarnitine acetate, pyruvate and glucose for the synthesis of acetylcholine in rat brain slices. **Journal of Neurochemistry**, **30**: 36-1323, 1981.
- DUNANT, Y.; LOCTIN, F.; MARSAL, J.; MULLER, D.; PARUCZ, A. & RABASEDA, X. Energy metabolism and quantal acetylcholine release: effects of botulinum toxin, 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene, and diamide in the Torpedo electric organ. **Journal of Neurochemistry**, **50**: 431-439, 1988.
- FELDMAN, E. B. Creatine: a dietary supplement and ergogenic aid. **Nutrition Reviews**, **57**: 45-50, 1999.
- FILE, S. E.; GONZALEZ, L. E. & ANDREWS, N. Comparative study of pre-and postsynaptic 5-HT_{1A} receptor modulation of anxiety in two ethological animal tests. **Journal of Neuroscience**, **16**: 4810-4815, 1996.
- FRITZ, J. B. & MARQUIS, N. R. The role of acylcarnitine esters and carnitine palmityltransferase in the transport of fatty acyl groups across mitochondrial membranes. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United State of Ame**, **33**: A54-1226, 1965.
- FLOOD, J. F.; BAKER, M. L. & DAVIS, J. L. Modulation of memory processing by glutamic acid receptor agonist and antagonists. **Brain Research**, **521**: 197-202, 1990.
- GOLD, P. E. Glucose modulation of memory storage processing. **Behavioral and Neural Biology**, **45**: 342-349, 1986.
- GREENHAFF, P. L. The nutritional biochemistry of creatine. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, **8**: 610-618, 1997.
- GUERRERO-ONTIVEROS, M. L. & WALLIMANN, T. Creatine supplementation in health and disease. Effects of chronic creatine ingestion in vivo: Down-regulation of the expression of creatine transporter isoforms in skeletal muscle. **Molecular and Cellular Biochemistry**, **184**: 427-437, 1998.

- HARRIS, R. C.; SÖDERLUND, K. & HULTMAN, E. Elevation of creatine in resting and exercise muscle of normal subjects by creatine supplementation. **Clinical Science**, **83**: 367-374, 1992.
- HARROD, S. B.; FLINT, R. W. & RICCIO, D. C. MK-801 induced retrieval, but not acquisition, deficits for passive avoidance conditioning. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, **69**: 585-593, 2001.
- HEMMER, W. & WALLIMANN, T. Functional aspects of creatine kinase in brain. **Developmental Neuroscience**, **15**: 249-260, 1993.
- HOLTZMAN, D.; BROWN, M.; O'GORMAN, E.; ALLRED, E. & WALLIMANN, T. Brain ATP metabolism in hypoxia resistant mice fed guanidinopropionic acid. **Developmental Neuroscience**, **20**: 469-477, 1998.
- IZQUIERDO, I. & MEDINA, J. H. Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. **Neurobiology of learning and memory**, **63**: 19-32, 1995.
- IZQUIERDO, I. & MEDINA, J. H. The biochemistry of memory and its regulation by hormones and neuromodulators. **Psychobiology**, **25**: 1-11, 1997.
- IZQUIERDO, I.; DA CUNHA, C.; ROSAT, R.; JERUSALINSKY, D.; FERREIRA, M. B. C. & MEDINA, J. H. Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. **Behavioural and Neural Biology**, **58**: 16-26, 1992.
- IZQUIERDO, I. **A arte de esquecer**. Rio de Janeiro: Viera & Lent, 2004.
- IZQUIERDO, I. Long-term potentiation and mechanisms of memory. **Drug Development Research**, **30**: 1-17, 1993.
- IZQUIERDO, I. **Memória**. Porto Alegre: Artmed Editora S.A., 2002.

- IZQUIERDO, I.; BARROS, D. M.; MELLO e SOUZA, T.; de SOUZA, M. M. & IZQUIERDO, L. A. Mechanisms for memory types differ. **Nature**, **393**: 635-636, 1998.
- JACKSON, A.; KOEK, W. & COLPAERT, F. C. NMDA antagonists make learning and recall state-dependent. **Behavioural Pharmacology**, **3**: 415-421, 1992.
- JERUSALINSKY, D.; FERREIRA, M. B. C.; WALZ, R.; DA SILVA, R. C.; BIANCHIN, M.; RUSCHEL, A. C.; ZANATTA, M. S.; MEDINA, J. H. & IZQUIERDO, I. Amnesia by post-training infusion of glutamate receptor antagonists into the amygdala, hippocampus, and entorhinal cortex. **Behavioural and Neural Biology**, **58**: 76–80, 1992.
- JOST, C. R.; VAN DER ZEE, C. E. E. M.; in't ZANDT, H. J. A.; OERLEMANS, F.; VERHEIJ, M.; STRIJGER, F.; FRASEN, J.; HEERSCHAP, A.; COOLS, A. R. & WIERINGA, B. Creatine kinase B-driven energy transfer in the brain is important for habituation and spatial learning behaviour, mossy fibre field size and determination of seizure susceptibility. **European Journal of Neuroscience**, **15**: 1692-1706, 2002.
- KALDIS, P.; HEMMER, W.; ZANOLLA, E.; HOLTZMAN, D. & WALLIMANN, T. “Hot spots” of creatine kinase localization in brain: Cerebellum, hippocampus and choroid plexus. **Developmental Neuroscience**, **18**: 542-554, 1996.
- KANDEL, E. R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. **Science**, **294**: 1030-1038, 2001.
- KANEMITSU, F.; KAGEOKA, T. & KIRA, S. Mitochondrial creatine kinase with atypical pI values detected in serum of a patient with ovarian hepatoid yolk sac tumor. **Journal of Chromatography B**, **783**:191-197, 2003.
- KERNEC, F.; LE TALLEC, N.; NADAL, L.; BEGUE, J. M. & LE RUMEUR, E. Phosphocreatine synthesis by isolated rat skeletal muscle mitochondria is

not dependent upon external ADP: A 31P NMR studt. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **225**: 819-825, 1996.

KLIVENYI, P.; CALINGASAN, N. Y.; STARKOV, A.; STAVROVSKAYA, I. G.; KRISTAL, B. S.; YANG, L.; WIERINGA, B. & BEAL, M. F. Neuroprotective mechanisms of creatine occur in the absence of mitochondrial creatine kinase. **Neurobiology of Disease**, **15**: 610-617, 2004.

KLIVENYI, P.; FERRANTE R. J.; MATTHEWS, R. T.; BOGDANOV, M. B.; KLEIN, A. M.; ANDREASSEN, O. E.; MUELLER, G.; WERMER, M.; KADDURAH-DAOUK, R. & BEAL, M. F. Neuroprotective effects of creatine in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. **Nature Medicine**, **5**: 347-350, 1999.

LEE, W. T.; YIN, H. S. & SHEN, Y. Z. The mechanisms of neuronal death produced by mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: the roles of N-methyl-D-aspartate glutamate receptors and mitochondrial calcium overload. **Neuroscience**, **112**: 707-716, 2002.

LEES, G. V. & JONES, E. G. Expressive genes Record memories. **Neurobiology of Disease**, **7**: 533-536, 2000.

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociências**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004.

LIPTON, P. & WHITTINGHAM, T. S. Reduced ATP concentration as a basis for synaptic transmission failure during hypoxia in the in vitro guinea-pig hippocampus. **Journal of Physiology – London**, **325**: 51-65, 1982.

LUHMANN, F. J. & HEINEMANN, U. Hypoxia-induced functional alterations in adult rat neocortex. **Journal of Neurophysiology**, **67**: 798-811, 1992.

MALCON, C.; KADDURAH-DAOUK, R. & BEAL, M. F. Neuroprotective effects of creatine administration against NMDA and malonate toxicity. **Brain Research**, **860**: 195-198, 2000.

- MATHEWS, R. T.; YANG, L.; JENKINS, B. G.; FERRANTE, R. J.; ROSEN, R. B.; KADDURAH-DAOUK, R. & BEAL, M. F. Neuroprotective effects of creatine and clycloreatine in animal models of Huntigton's disease. **The Journal of Neuroscience**, **18**: 156-163, 1998.
- MATTHEWS, R. T.; FERRANTE, R. J.; KLIVENYI, P.; YANG, L.; KLEIN, A. M.; MUELLER, G.; KADDURAH-DAOUK, R. & BEAL, M. F. Creatine and cyclocreatine attenuate MPTP neurotoxicity. **Experimental Neurology**, **157**: 142-149, 1999.
- MAYFORD, M. & KANDEL, E. R. Genetic approaches to memory storage. **Genetics approaches to memory storage**, **15**: 463-470, 1999
- MCDANIEL, M. A.; MAIER, S. F. & EINSTEIN, G. O. "Brain-Specific" nutrients: A memory cure? **Nutrition**, **19**: 957-975, 2003.
- MCGAUGH, J. L. & IZQUIERDO, I. The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. **Trends in Pharmacological Sciences**, **21**: 208–210, 2000.
- MCGAUGH, J. L. Memory - a century of consolodation. **Science**, **287**: 248 – 251, 2000.
- MCGAUGH, J. L. Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective. **Trends in Neurosciences**, **25**: 456–461, 2002.
- MORRIS, R. G.; ANDERSON, E.; LYNCH, G. S. & BAUDRY, M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. **Nature**, **319**: 774–776, 1986.
- MUJIK, I. & PADILLA, S. Creatine supplementation as an ergogenic acid for sports performance in highly trained athletes: a critical review. **International Journal of Sports Medicine**, **18**: 491-496, 1997.

- NELSON, A. G.; DAY, R.; GLICKMAN-WEISS, E. L.; HEGSTED, M.; KOLLONEN, J. & SAMPSON, B. Creatine supplementation alters the response to a graded cycle ergometer test. **European Journal of Applied Physiology**, **83**: 89-94, 2000.
- NIJJAR, M. & BELGRAVE, R. L. Regulation of Ca²⁺ homeostasis by glucose metabolism in rat brain. **Molecular and Cellular Biochemistry**, **176**: 317-326, 1997.
- O'GOMAN, E.; BEUTNER, G.; WALLIMANN, T. & BRDICZKA, D. Differential effects of creatine depletion on the regulation of enzyme activities and on creatine-stimulated mitochondrial respiration in skeletal muscle, heart, and brain. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1276**: 161-170, 1996.
- PERSKY, A. M. & BRAZEU, G. A. Clinical pharmacology of the dietary supplement creatine monohydrate. **Pharmacological Reviews**, **53**:161-176, 2001.
- PERASSO, L.; CUPELLO, A.; LUNARDI, G. L. PRINCIPATO, C.; GANDOLFO, C. & BALESTRINO, M. Kinetics of creatine in blood and brain after intraperitoneal injection in the rat. **Brain Research**, **974**: 37-42, 2003.
- POORTMANS, J. R. & FRANCAUX, W. Adverse effects of creatine supplementation: fact or fiction? **Sports Medicine**, **30**: 155-70, 2003.
- RAE, C.; DIGNEY, A. L.; MCEWAN, S. R. & BATES, T. C. Oral creatine monohydrate supplementation improves brain performance: a double-blind, placebo-controlled, cross-over trial. **Proceedings of the Royal Society of London Series B – Biological Science**, **270**: 2147-2150, 2003.
- RIEDEL, G.; PLATT, B. & MICHEAU, J. Glutamate receptor function in learning and memory. **Behavioural Brain Research**, **18**: 1–47, 2003
- ROESLER, R.; VIANA, M. R. M.; DE PARIS, F. & QUEVEDO, J. Memory-enhancing treatments do not reverse the impairment of inhibitory

- avoidance retention induced by NMDA receptor blockade. **Neurobiology of Learning and Memory**, **72**: 252-258, 1999.
- ROYES, L. F. F.; FIGHERA, M. R.; FURIAN, A. F.; SCHNEIDER OLIVEIRA, M.; MARTINS DA SILVA, L. G.; MALFATTI, C. R. M.; SCHNEIDER, P. H.; BRAGA, A. L.; WAJNER, M. & MELLO, C. F. Creatine protects against the convulsive behavior and lactate production elicited by the intrastriatal injection of methylmalonate. **Neuroscience**, **118**: 1079-1090, 2003.
- RUBIN, M. A.; JURACH, A.; ZANOLLA, G. R.; BOEMO, R. L.; SOUZA, D. O. & MELLO, C. F. Intrahippocampal GMP administration improves inhibitory avoidance performance through GABAergic and glutamatergic mechanisms in rats. **NeuroReport**, **8**: 3713–3716, 1997.
- SHIRAISHI, J.; TATSUMI, T.; KEIRA, N.; AKASHI, K.; MANO, A.; YAMANAKA, S.; MATOBA, S.; ASAYAMA, J.; YAOI, T.; FUSHIKI, S.; FLISS, H. & NAKAGAWA, M. Important role of energy-dependent mitochondrial pathways in cultured rat cardiac myocyte apoptosis. **American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology**, **281**: H1637-H1647, 2001.
- SHULZ, D. E.; SOSNIK, R.; EGO, V.; HAIDARLIU, S. & AHISSAR, E. A neuronal analogue of state-dependent learning. **Nature**, **403**: 549-553, 2000.
- SILIPRANDI, N.; SILIPRANDI, D. & CIMAN, M. Stimulation of oxidation of mitochondrial fatty acid and of acetate by acetylcarnitine, **Biochemical Journal**, **96**: 777, 1965.
- SLOT, L. A. B. & COLPAERT, F. C. Recall rendered dependent on an opiate state. **Behavioral Neuroscience**, **113**: 337-344, 1999.
- SQUIRE, L. R. & KANDEL, E. R. **Memória: da mente às moléculas**. Porto Alegre: Artmed Editora S.A, 2003.

- STEEGHS, K.; BENDERS, A.; OERLEMANS, F.; DE HAAN, A.; HEERCHAP, A.; RUITENBEEK, W.; JOST, C.; VAN DEURSEN, J. & PERRYMAN, B. Altered Ca²⁺ responses in muscle with combined mitochondrial and cytosolic creatine kinase deficiencies. **Cell**, **89**: 93-103, 1997.
- STONE, W. S.; RUDD, R. J. & GOLD, P. E. Glucose attenuation of deficits in spontaneous alternation behavior and augmentation of relative brain 2-deoxyglucose uptake in old and scopolamine-treated mice. **Psychobiology**, **20**: 270–9, 1992.
- STREIJGER, F.; JOST, C. R.; OERLEMANS, F.; ELLENBROEK, B. A.; COOLS, A. R.; WIERINGA, B. & VAN DER ZEE, C. E. E. M. Mice lacking the UbCKmit isoform of creatine kinase reveal slower spatial learning acquisition, diminished exploration and habituation, and reduced acoustic startle reflex responses. **Molecular and Cellular Biochemistry**, **256**: 305–318, 2004.
- STREIJGER, F.; OERLEMANS, F.; ELLENBROEK, B. A.; JOST, C. R.; WIERINGA, B. & VAN DER ZEE, C. E. E. M. Structural and behavioural consequences of double deficiency for creatine kinase BCK and UbCKmit. **Behavioural Brain Research**, **157**: 219-234, 2005.
- SULLIVAN, P. G.; GEIGER, J. D.; MATTSON, M. P. & SCHEFF, S. W. Dietary supplement creatine protects against traumatic brain injury. **Annals of Neurology**, **48**: 723-729, 2000.
- TARNOPOLSKY, M. A. & BEAL, M. F. Potential for creatine and other therapies targeting cellular energy dysfunction in neurological disorders. **Annals of Neurology**, **49**: 561-574, 2001.
- TAUBENFELD, S. M.; MILEKIC, M. H.; MONTI, B. & ALBERINI, C. M. The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBP β . **Nature neuroscience**, **4**: 813-818, 2001.

- VENABLE, N. & KELLY, P. H. Effects of NMDA receptor antagonists on passive avoidance learning and retrieval in rats. **Psychopharmacology**, **100**: 215-21, 1990.
- VIS, J. C.; HUISEN, R. T. DE B-V.; VERBEEK, M. M.; De-WAAL, R. M. W.; DONKELAAR, H. J. T. & KREMER, B. Creatine protects against 3-nitropropionic acid-induced cell death in murine corticostriatal slice cultures. **Brain Research**, **1024**: 16-24, 2004.
- WALKER, J. Creatine: biosynthesis, regulation, and function. **Adv. Enzm.** **50**: 117-242, 1979.
- WALLIMANN, T.; DOLDER, M.; SCHLATTNER, U.; EDER, M.; HORNEMANN, T.; O'GORMAN, E.; RÜCK, A. & BRDICZKA, D. Some new aspects of creatine kinase (CK): compartmentation, structure, function and regulation for cellular and mitochondrial bioenergetics and physiology. **Biofactors**, **8**:229-234, 1998.
- WALLIMANN, T. & HEMMER, W. Creatine kinase in non-muscle tissues and cells. **Molecular and Cellular Biochem**,**133**:193-220, 1994.
- WALLIMANN, T.; WYSS, M.; BRDICZKA, D.; NICOLAY, K. & EPPENBERGER, H. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. **Biochemical Journal**, **281**: 21-40, 1992.
- WINOCUR, G. & GAGNON, S. Glucose Treatment Attenuates Spatial Learning and Memory Deficits of Aged Rats on Tests of Hippocampal Function. **Neurobiology of Aging**, **19**: 233–241, 1998.
- WYSE, A. T. S.; BAVARESCO, C. S.; REIS, E. A.; ZUGNO, A. I.; TAGLIARI, B.; CALCAGNOTTO, T. & NETTO, C. A. Training in inhibitory avoidance causes a reduction of Na⁺, K⁺-ATPase activity in rats hippocampus. **Psychology & Behavior**, **80**: 475-479, 2004.

- WYSS, M.; SMEITINK, J.; WEVERS, R. A. & WALIMANN, T. Mitochondrial creatine kinase: a key enzyme of aerobic energy metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1102**: 119-166, 1992.
- WYSS, M. & KADDURAH-DAOUK, R. Creatine and Creatinine metabolism. **Physiological Reviews**, **80**: 1107-1213, 2000.
- XU, C. J.; KLUNK, W. E.; KANFER, J. N.; XIONG, Q.; MILLER, G. & PETTEGREW, J. W. Phosphocreatine-dependent glutamate uptake by synaptic vesicles. **Journal of Biological Chemistry**, **271**: 13435-13440, 1996.
- YANG, Z. & STEELE, D. S. Effects of phosphocreatine on SR Ca(2+) regulation in isolated saponin-permeabilized rat cardiac myocytes. **Journal of Physiology**, **539**: 767-777, 2002.