

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

**SUCINATO MELHORA A MEMÓRIA DA TAREFA DE  
MEDO CONDICIONADO EM RATOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Liana Pasquetti**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2007**

# **SUCINATO MELHORA A MEMÓRIA DA TAREFA DE MEDO CONDICIONADO EM RATOS**

**por**

**Liana Pasquetti**

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

**Mestre em Bioquímica Toxicológica**

Orientadora: Maribel Antonello Rubin  
Co-orientador: Carlos Fernando de Mello

Santa Maria, RS, Brasil

2007

**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

**SUCINATO MELHORA A MEMÓRIA DA TAREFA DE MEDO  
CONDICIONADO EM RATOS**

Elaborada por  
**Liana Pasquetti**

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

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Maribel Antonello Rubin**  
(Presidente/Orientadora)

---

**Daiane Bolzan Berlese**

---

**Vânia Lúcia Loro**

Santa Maria, 03 de julho de 2007.

*Essa dissertação é dedicada aos meus pais,  
Ari Paulo e Marivete, que nunca mediram esforços  
para que eu alcançasse meus objetivos.  
Essa conquista também é de vocês.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela presença constante, pela vida, por tudo o que representa para mim, por todos os motivos que me levam a agradecê-lo todos os dias.

Aos meus pais, Ari Paulo e Marivete, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade. Por me proporcionarem a continuidade dos meus estudos, com muitas vezes renunciando seus sonhos em função dos meus. Amo muito vocês. Obrigado por tudo. Agradeço também minha irmã Carla e minha sobrinha Ana Maria pelo apoio e incentivo.

A uma pessoa muito especial, Marcos Felipe, pela amizade, pelo apoio, compreensão e companheirismo nos bons e maus momentos no decorrer deste curso, e enfim, por todo amor e carinho que recebi desde que nos conhecemos.

Aos meus orientadores, professores Carlos e Maribel, pela oportunidade de integrar seus grupos de pesquisa, pela amizade e pelo incentivo. A vocês serei eternamente grata.

A minha querida amiga, irmã Flávia Karine Rigo, pelo incentivo, pelo apoio, pelo companheirismo, pela amizade sincera, por participar deste sonho que é nosso. Agradeço-te também por todos estes anos de convivência, que serão inesquecíveis e por fazer parte de minha vida. Te adoro muito, obrigada por tudo!!!!

A Keli e a Ana Paula pelo apoio, amizade e pelas várias conversas além da bioquímica. Jú, Alessandra, Valéria, Vivi, July e Aninha por compartilharem comigo momentos bons e ruins, pela amizade, pela conversas.... Muito obrigada.

O pessoal do 21, Ana Flávia, Mauro, Nando, Mi, Alédson, André, Ricardo pelo apoio e pelos bons momentos que passamos e bebemos juntos.

A Patrícia, Gerusa, Nádia, Gabriela, Gustavo pelas “conversas” na escada e as descontraídas idas ao bosque... e também por ter ajudado na construção deste trabalho. Aos ICs (Mateus, Sara, Camila, Carine, Cássia, Cris) pelos momentos de descontração.

A todos os professores do PPGBT, pelo conhecimento proporcionado.

Aos funcionários Paulino, Florindo e Reinaldo pela dedicação, meu muito obrigado.

Agradeço à Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade de crescimento, aprendizagem e progresso.

*“ A vida não é um corredor reto e tranqüilo que  
nós percorremos livres e sem empecilhos,  
mas um labirinto de passagens,  
pelas quais nós devemos procurar nosso  
caminho, perdidos e confusos, de vez em quando  
presos em um beco sem saída.  
Porém, se tivermos fé,  
uma porta sempre será aberta para nós,  
não talvez aquela sobre a qual  
nós mesmos nunca pensamos,  
mas aquela que definitivamente  
se revelará boa para nós”*

*A.J. Cronin*

## RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

### **SUCINATO MELHORA A MEMÓRIA DA TAREFA DE MEDO CONDICIONADO EM RATOS**

Autor: Liana Pasquetti

Orientadora: Maribel Antonello Rubin

Co-orientador: Carlos Fernando de Mello

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 03 de julho de 2007.

O succinato é um intermediário do ciclo de Krebs e também da cadeia respiratória, mas que também parece ter funções não relacionadas ao metabolismo energético. De fato, este ácido dicarboxílico tem efeito bifásico sobre a atividade neural *in vitro*, que parece ser mediado pelo receptor glutamatérgico *N*-metil-D-aspartato (NMDA). O receptor NMDA está presente em todo o sistema nervoso central (SNC) e os processos mediados por este receptor incluem plasticidade sináptica e formação de circuitos neurais. Embora tenha sido descrito que o succinato modula a atividade neural *in vitro*, não se sabe se este ácido orgânico modula processos fisiológicos ligados ao receptor NMDA, como o aprendizado e memória. Conseqüentemente, neste estudo foi investigado o efeito da administração sistêmica e intra-hipocámpal de succinato, MK-801 e propranolol sobre a consolidação da memória em ratos, utilizando a tarefa de medo condicionado clássico. Posteriormente se investigou se os efeitos do succinato sobre a memória envolvem dependência de estado. O teste do medo condicionado consistiu na apresentação de estímulos pareados, condicionado (tom 2000 Hz 90 dB/10 s) e incondicionado (choque 0.6 mA/1 s). O estado de imobilidade do animal foi utilizado como um indicativo de memória nas sessões de avaliação de memória ao contexto e ao tom. A administração sistêmica de succinato nas doses de 0,00005, 0,0005, 0,005, 0,05 e 0,5 mg/kg *i.p.* imediatamente após o treino melhorou a memória. Contudo, a dose de 5 mg/kg de succinato não alterou a memória dos animais, caracterizando um efeito bifásico sobre a memória. Essa melhora da memória induzida por succinato (0,005 mg/kg *i.p.*) foi revertido pela administração pós-treino de um antagonista do receptor NMDA, MK-801 (0,001 mg/kg *i.p.*) e pela administração imediatamente após o treino de um bloqueador adrenérgico, propranolol (10 mg/kg *i.p.*). A administração de succinato (0,005 mg/kg *i.p.*) imediatamente após o treino e 15 minutos antes do teste não afetou a performance dos animais, não caracterizando dependência de estado. Nos experimentos que visaram identificar se a administração central de succinato alterava a memória, os animais foram canulados bilateralmente no hipocampo e após a recuperação cirúrgica, recebiam injeções bilaterais imediatamente após o treino, de succinato (0,21 pmol *i.h.*) que melhorou a memória. A administração imediatamente após o treino de MK-801 (0,22 nmol *i.h.*) foi capaz de reverter esse efeito facilitador do succinato sobre a memória. Estes resultados sugerem que o efeito facilitador da memória induzida pela administração de succinato é mediado pelo receptor NMDA e envolve de alguma maneira o sistema adrenérgico.

Palavras-chave: Succinato, memória, medo condicionado, receptor NMDA, MK-801, propranolol.

## **ABSTRACT**

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

### **SUCCINATE IMPROVES THE MEMORY OF FEAR CONDITIONING IN RATS**

Author: Liana Pasquetti

Advisor: Maribel Antonello Rubin

Carlos Fernando de Mello

**Place and date: Santa Maria, July 3rd 2007.**

Succinate is a dicarboxylic acid that accumulates due to succinate dehydrogenase inhibition. This dicarboxylic acid has a biphasic effect on neural activity *in vitro* that seems to be mediated by N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. The NMDA receptor is distributed throughout the central nervous system and mediates synaptic plasticity-related events, such as learning and memory. Although it has been described that succinate modulates NMDA conductance, it is not known if this organic acid modulates learning and memory. Therefore, in the present study we investigated whether the immediate post-training systemic or intra-hippocampal administration of succinate affects the memory of fear conditioning in rats. In addition, we investigated whether the NMDA and  $\beta$ -adrenergic receptors are involved in the facilitatory effect of succinate on memory. Systemic (0,00005, 0,0005, 0,005, 0,05 and 0,5 mg/kg i.p) or bilateral intra-hippocampal (0.21 pmol i.h.) immediate post-training administration of succinate biphasically facilitated contextual fear conditioning and had no effect on conditioning to tone. Systemic or intra-hippocampal administrations of MK-801 (0,001 mg/kg i.p. or 0,21 pmol i.h. respectively), a noncompetitive NMDA receptor antagonist, at a dose that had no effect per se, reversed the facilitatory effect of succinate on contextual fear conditioning. The systemic administration of propranolol (10 mg/kg i.p.), a  $\beta$ -adrenergic antagonist, at a dose that had no effect per se, also reversed the facilitatory effect of succinate on contextual fear conditioning. The administration of succinate (0,005 mg/kg i.p.) immediately after training and 15 minutes before the test did not affect the performance of the animals on fear conditioning. These results suggest that the facilitatory effect of succinate on the memory of fear conditioning involves NMDA and  $\beta$ -adrenergic receptors. The results also indicate that the facilitatory effect of succinate on memory is not related to state-dependence.

**Key Words:** Succinate, memory, fear conditioning, NMDA receptor,  $\beta$ -adrenergic receptor, rats.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Rota metabólica do succinato.....	26
<b>Figura 2:</b> Esquema da seqüência de modificação de um terminal sináptico glutamatérgico envolvido na formação da memória.....	38
<b>Figura 3:</b> Efeito da administração intraperitoneal (i.p.) de succinato sobre a consolidação da memória: Curva dose-efeito.....	53
<b>Figura 4:</b> Avaliação da possível dependência de estado causado pelo succinato (i.p.) sobre a memória.....	55
<b>Figura 5:</b> Efeito da administração intraperitoneal (i.p.) de MK-801 e succinato sobre consolidação da memória.....	56
<b>Figura 6:</b> Efeito da administração intraperitoneal (i.p.) de propranolol e succinato sobre a consolidação da memória.....	57
<b>Figura 7:</b> Efeito da administração intra-hipocampal (i.h.) de succinato sobre a consolidação da memória: Curva dose-efeito.....	60
<b>Figura 8:</b> Efeito da administração intra-hipocampal (i.h.) de MK-801 sobre a consolidação da memória: Curva dose-efeito.....	61
<b>Figura 9:</b> Efeito da administração intra-hipocampal (i.h.) de MK-801 e succinato sobre a consolidação da memória.....	62

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1:</b> Efeito comportamental do succinato (i.p.) na dependência de estado.....	55
<b>TABELA 2:</b> Efeito do succinato, MK-801 e propranolol sobre a imobilidade no novo contexto (caixa B) na ausência do tom.....	59
<b>TABELA 3:</b> Efeito do succinato e MK-801 sobre a imobilidade no novo contexto (caixa B) na ausência do tom.....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{l}$	- Microlitro
$\mu\text{mol}$	- Micromol
3-NPA	- Ácido 3-nitropropiónico
AMPA	- Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico
AMPc	- Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	- Análise de variância
AP-5	- Ácido D-2-amino-5-fosfonopentanóico
ATP	- Adenosina trifosfato
$\text{Ca}^{2+}$	- Íon cálcio
CaMKII	- Proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina do tipo II
CNQX	- 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona
CREB	- Proteína ligante do elemento responsivo ao AMPc
CS	- Estímulo condicionado
GABA	- Ácido $\delta$ -amino butírico
GABA-T	- GABA transaminase
GAP-43	- Proteína do terminal axônico associado ao crescimento
GPR91	- Receptor órfão ligado a proteína G 91
icv	- Intracerebroventricular
$\text{Mg}^{2+}$	- Íon magnésio
MgluR	- Recetor glutamatergico metabotrópico

MK-801	- Dizocilpina
MNDA	- <i>N</i> -metil-D-aspartato
Na <sup>+</sup>	- Íon sódio
NaC	- Transportador de carboxilatos dependente de Na <sup>+</sup>
PCP	- Fenciclidina
PKA	- Proteína quinase A
PKC	- Proteína quinase dependente de cálcio
PKG	- Proteína quinase dependente de GMPc
SDH	- Succinato desidrogenase
SNC	- Sistema Nervoso Central
SSADH	- Succinato semialdeido desidrogenase
TBARS	- Substâncias que reagem ao Ácido Tiobarbiturico
TPC	- Piperidina
US	- Estímulo incondicionado
Zn <sup>2+</sup>	- Íon zinco

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	viii
<b>ABSTRACT</b> .....	ix
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	x
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xi
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	xii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	22
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	23
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	23
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	24
<b>3.1 Succinato</b> .....	25
<b>3.2 Inibidores da SDH</b> .....	27
<b>3.3 Efeitos eletrofisiológicos do succinato</b> .....	29
<b>3.4 Receptores N-metil-D-aspartato (NMDA)</b> .....	30
<b>3.5 Memória</b> .....	32
3.5.1 Tipos de memória.....	33
3.5.2 Medo condicionado.....	34
3.5.3 Mecanismo de formação da memória.....	36
3.5.4 Envolvimento do receptor NMDA na memória.....	39
3.5.5 Envolvimento do receptor $\beta$ -adrenérgico na memória.....	41
3.5.5 Dependência de estado.....	41
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	42
<b>4.1 Animais</b> .....	43
<b>4.2 Reagentes</b> .....	43
<b>4.3 Procedimento de implantação de cânulas</b> .....	44
<b>4.4 Procedimento de Medo Condicionado</b> .....	44
<b>4.5 Procedimento de Dependência de Estado</b> .....	46
<b>4.6 Experimentos</b> .....	46

4.6.1 Experimento 1: Efeito da administração intraperitoneal (i.p.) de succinato sobre a consolidação da memória: Curva dose-efeito.....	46
4.6.2 Experimento 2: Avaliação da possível dependência de estado causada pelo succinato (i.p.) sobre a memória.....	47
4.6.3 Experimento 3: Efeito da administração intraperitoneal (i.p.) de MK-801 e succinato sobre a consolidação da memória.....	47
4.6.4 Experimento 4: Efeito da administração intraperitoneal (i.p.) de propranolol e succinato sobre a consolidação da memória.....	48
4.6.5 Experimento 5: Efeito da administração intra-hipocampal (i.h.) de succinato sobre a consolidação da memória: Curva dose-efeito.....	48
4.6.6 Experimento 6: Efeito da administração intra-hipocampal (i.h.) de MK-801 sobre a consolidação da memória: Curva dose-efeito.....	49
4.6.7 Experimento 7: Efeito da administração intra-hipocampal de MK-801 e succinato sobre a consolidação da memória.....	49
<b>4.7 Análise Estatística.....</b>	<b>50</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
<b>5.1 Experimento 1: Efeito da administração intraperitoneal (i.p.) de succinato sobre a consolidação da memória: Curva dose-efeito .....</b>	<b>52</b>
<b>5.2 Experimento 2: Avaliação da possível dependência de estado causada pelo succinato (i.p.) sobre a memória .....</b>	<b>54</b>
<b>5.3 Experimento 3: Efeito da administração intraperitoneal (i.p.) de MK-801 e succinato sobre a consolidação da memória .....</b>	<b>56</b>
<b>5.4 Experimento 4: Efeito da administração intraperitoneal (i.p.) de propranolol e succinato sobre a consolidação da memória.....</b>	<b>57</b>
<b>5.5 Efeito do succinato, MK-801 e propranolol sobre a imobilidade no novo contexto (caixa B) na ausência do tom.....</b>	<b>58</b>
<b>5.6 Experimento 5: Efeito da administração intra-hipocampal (i.h.) de succinato sobre a consolidação da memória: Curva dose-efeito.....</b>	<b>60</b>
<b>5.7 Experimento 6: Efeito da administração intra-hipocampal (i.h.) de MK-801 sobre a consolidação da memória: Curva dose-efeito.....</b>	<b>61</b>
<b>5.8 Experimento 7: Efeito da administração intra-hipocampal (i.h.) de MK-</b>	

<b>801 e succinato sobre a consolidação da memória.....</b>	<b>62</b>
<b>5.9 Efeito do succinato e MK-801 sobre a imobilidade no novo contexto (caixa B) na ausência de tom.....</b>	<b>63</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>65</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>70</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>72</b>

---

## 1. INTRODUÇÃO

## **1. INTRUDUÇÃO**

O succinato (ácido succínico) é um ácido dicarboxílico sintetizado na mitocôndria pela enzima succinil CoA tioquinase. O succinato é oxidado pela enzima succinato desidrogenase (SDH), a qual faz parte do ciclo de Krebs e da cadeia respiratória (Alexi et al., 1998; Greene & Greenamyre 1995). Alternativamente, o succinato pode ser sintetizado a partir da transaminação e desidrogenação do ácido  $\delta$ -amino butírico (GABA), pela via denominada “shunt” de GABA (Sander et al., 1969). Esse ácido dicarboxílico encontra-se acumulado quando existe uma deficiência do complexo II da cadeia respiratória (SDH) (Brockmann et al., 2002) e quando existe uma deficiência da degradação de fumarato (De Meirleir, 2002).

A administração intraestriatal de altas doses de succinato tem sido utilizada para prevenir a inibição metabólica causada pelos inibidores reversíveis da SDH, como o malonato e o metilmalonato (Ozand et al., 1994; Erecinska & Nelson, 1994; Mello et al., 1996; Fighera et al., 1999; Okun et al., 2002). Assim, o succinato antagoniza os efeitos neurotóxicos daqueles compostos. (Wajner et al., 1992; Greene & Greenamyre, 1995; Mello et al., 1996; Beal, 2000). Por outro lado, a administração intracerebroventricular (i.c.v.) de concentrações baixas de succinato causa convulsões e morte em camundongos que são prevenidas pela co-injeção de MK-801 (Roehrs et al., 2004). Já, a administração de doses subconvulsivantes de succinato provoca diminuição da atividade locomotora e um aumento nos níveis de marcadores oxidativos tais como carbonilação protéica e liperoxidação em camundongos (Sinhorin et al., 2005). Estas

alterações são prevenidas pela co-injeção de MK-801 (Sinhorin et al., 2005). Estes resultados sugerem que os receptores NMDA estão envolvidos nos efeitos do succinato.

O receptor NMDA é um receptor glutamatérgico do tipo ionotrópico, que está amplamente distribuído nos neurônios do sistema nervoso central. Esse receptor tem um papel importante na plasticidade sináptica, incluindo processos de aprendizado e memória (Mayer & Westbrook, 1987; Collingridge & Lester, 1989; Choi & Rothman, 1990; Collingridge & Singer, 1990; Dingledine et al., 1990; Olney, 1990; Rubin et al., 2004; Izquierdo et al., 2006; Camera et al., 2007). A administração de agonistas do receptor NMDA melhora o desempenho de ratos na tarefa de esquiva inibitória (Izquierdo & Medina, 1995; Rubin et al., 1997; Berlese et al., 2005; Izquierdo et al., 2006) e medo condicionado (Zhang et al., 2001; Rubin et al., 2004; Camera et al., 2007). Já a administração sistêmica ou intracerebral de bloqueadores do receptor NMDA pioram o aprendizado e a memória de ratos em diversas tarefas (Izquierdo & Medina, 1995; Riedel et al., 2003; Sanders & Fanselow, 2003; Roesler et al., 2005; Izquierdo et al., 2006; Camera et al., 2007).

Algumas estruturas estão envolvidas nos processos de aprendizagem e memória, como o hipocampo e a amígdala, ambos são estruturas do lobo temporal envolvidas na aquisição, consolidação e/ou evocação da memória (Izquierdo, 1994; Izquierdo & Medina, 1995, 1997; Kim & Jung, 2006). O hipocampo faz conexão entre o contexto (local, ambiente) com experiências aversivas e envia estas informações a amígdala (O'Reilly & Rudy 2001; Sander et al., 2003). Lesões no hipocampo antes ou após o teste prejudicam a aquisição do medo condicionado contextual (Kim et al., 1992; Young et al., 1994; Maren et al., 1997).

Recentemente o succinato foi identificado como o ligante de um receptor órfão no rim, indicando um papel para este ácido orgânico no processo de comunicação celular (He et al., 2004). Embora tais receptores não se expressem no SNC, evidências eletrofisiológicas sugerem um papel neuromodulador para o succinato na transmissão glutamatérgica (Roehrs et al., 2004). Dado este envolvimento putativo do succinato na transmissão glutamatérgica e o papel deste sistema no aprendizado e na memória, este estudo teve por objetivo avaliar o efeito deste composto sobre a memória na tarefa de medo condicionado.

---

## **2 .OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar o efeito da administração sistêmica de succinato, MK-801 e propranolol e a administração intra-hipocampal de succinato e MK-801 sobre a fase de consolidação da memória em ratos utilizando a tarefa de medo condicionado, bem como o envolvimento da dependência de estado no efeito do succinato.

### **2.2. Objetivos específicos**

➤ Avaliar o efeito da administração intraperitoneal de succinato, MK-801 e propranolol (imediatamente após o treino) sobre a consolidação da memória, utilizando a tarefa de medo condicionado.

➤ Avaliar o efeito da administração intra-hipocampal de succinato e MK-801 (imediatamente após o treino) sobre a consolidação da memória, utilizando a tarefa de medo condicionado.

➤ Avaliar se a administração intraperitoneal de succinato causa dependência de estado na tarefa de medo condicionado.

---

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **3.1 Succinato**

O succinato é um ácido dicarboxílico sintetizado pela enzima succinil CoA tioquinase. Ele é oxidado pela enzima succinato desidrogenase (SDH, E.C. 1.3.99.1), uma oxi-redutase ligada à membrana interna da mitocôndria que participa tanto do Ciclo de Krebs como da cadeia de transporte de elétrons (Complexo II), (Greene & Greenamyre 1995; Alexi et al. 1998), a qual catalisa a oxidação reversível do succinato a fumarato. Outra fonte de succinato é a via do catabolismo do neurotransmissor inibitório ácido  $\delta$ -amino butírico (GABA) (Sander et al., 1969; Tillakaratne et al., 1995). A enzima GABA-transaminase (GABA-T, E.C. 2.6.1.19) converte o GABA em succinato semialdeído, este por ação da enzima succinato semialdeído desidrogenase (SSADH, E.C. 1.2.1.24) é convertido em succinato que vai ser oxidado pelo ciclo de Krebs (Figura 1). O succinato é um metabólito endógeno que está distribuído no Sistema Nervoso Central (SNC), incluindo a matéria branca, córtex cerebral e no cerebelo (Petroff et al., 1988).

No SNC, os neurônios não sintetizam intermediários do Ciclo de Krebs, como o succinato, por não terem a enzima piruvato descarboxilase, que está presente somente em células gliais (Cesar & Hamprecht, 1995; Yu et al., 1983; Shank et al., 1985; Yodaya et al., 2006). Os neurônios precisam, então, de um constante suplemento de intermediários do ciclo de Krebs que são sintetizados por células gliais (Yodaya et al., 2006).

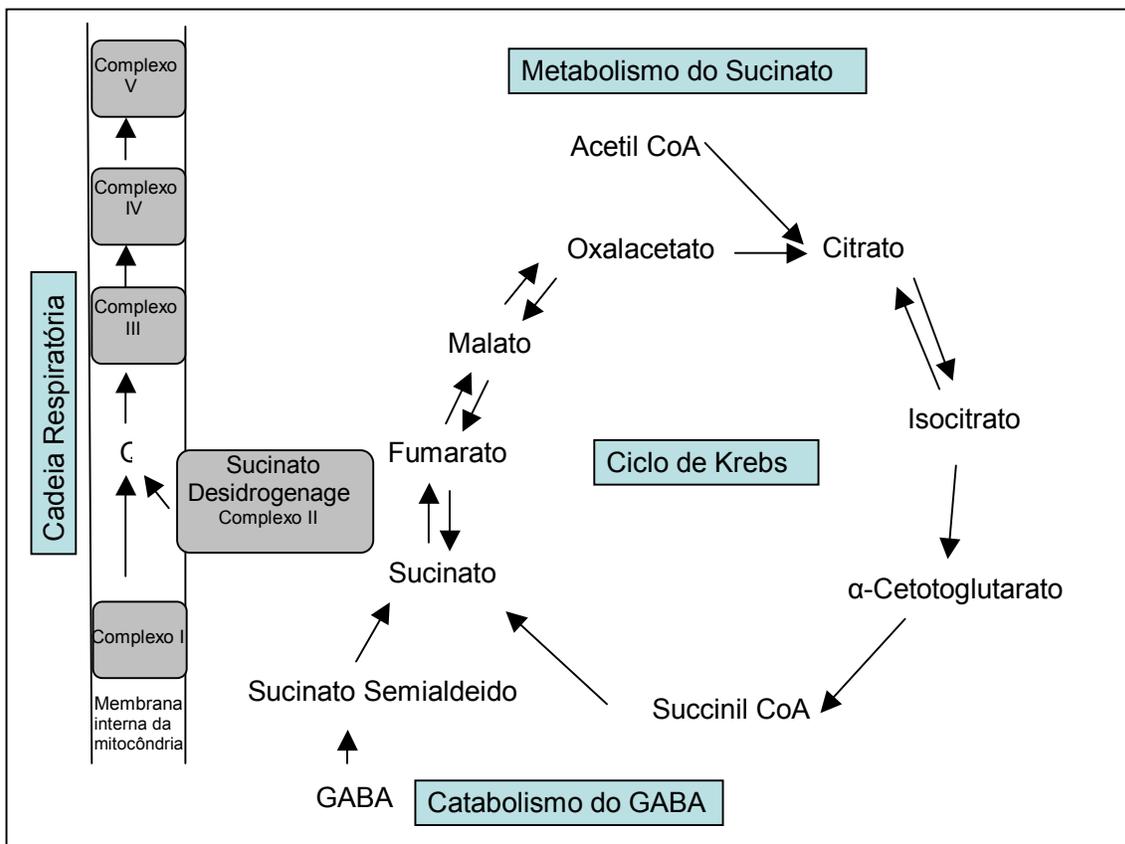


Figura 1: Metabolismo do succinato.

Os intermediários do ciclo de Krebs utilizam um transportador de carboxilatos dependente de  $\text{Na}^+$  (NaCs), localizado nas membranas de alguns tipos celulares, como os neurônios (Yodoya et al., 2006). Este transportador apresenta três formas moleculares diferentes em mamíferos conhecidos como NaC1, NaC2 e NaC3 (Pajol, 2000; Markovich & Murer 2004). O NaC1 é expresso no rim e no intestino, tem baixa afinidade no transporte de dicarboxilatos, com o succinato,  $\alpha$ -cetoglutarato, fumarato e malato. O NaC1 também pode transportar tricarboxilatos, com o citrato, porém com menor afinidade (Pajol, 1995, 1999; Che et al., 1988). O NaC2, que é expresso no fígado e em neurônios corticais (Inoure et al., 2002a; Yodoya et al., 2006), transporta preferentemente citrato, mas também pode transportar succinato e outros dicarboxilatos

(Inoue et al., 2002a, 2002b, 2004). Já o NaC3 é expresso em astrócitos (Yodoya et al, 2006) e tem grande afinidade no transporte de succinato e outros dicarboxilatos, e uma afinidade relativamente baixa por citrato (Kekuda et al., 1999; Wang et al., 2000; Pajor et al., 2001). Portanto, dada a baixa expressão do NaC1 no SNC é muito pouco provável a sua participação no transporte destes compostos no cérebro. Provavelmente NaC2 e o NaC3 participem do transporte de succinato no SNC, porém NaC3 parece ter uma maior afinidade por esse composto, sendo o maior responsável pelo seu transporte (Inoue et al., 2002a, 2002b, 2004; Kekuda et al., 1999; Wang et al., 2000; Pejor et al., 2001).

O succinato também parece ter uma ligação com o sistema renina-angiotensina, e foi identificado como o ligante de um receptor órfão acoplado à proteína G, o GPR91. Este receptor está presente predominantemente no rim, mas também é encontrado no fígado, baço e em menor quantidade em outros órgãos. O succinato ativa o GPR91, e aumenta a liberação de renina, causando aumento da pressão arterial (Baumbach et al., 1976; He et al., 2004).

### **3.2 Inibidores da SDH**

A inibição da SDH, além de aumentar a concentração de seu substrato, o succinato, provoca a inibição dos processos de obtenção de energia por via aeróbica, devido à inibição do Ciclo de Krebs e da fosforilação oxidativa (Dutra et al., 1993), o que compromete o metabolismo energético celular, levando à depleção de ATP e ao acúmulo secundário de lactato (Wajner et al., 1992).

Ácido malônico, ácido metilmalônico e ácido 3-nitropropiónico (3-NPA) são inibidores da SDH (Erecinska & Nelson, 1994; Ozand et al., 1994; Mello et al., 1996; Fighera et al., 1999; Wajner & Coelho, 1997; Okun et al., 2002), o que leva a depleção energética e provocam danos excitotóxicos (Hassel & Sonnewald, 1995; Alexi et al., 1998; Urbanska et al., 1998). O 3-NPA tem a estrutura semelhante à do succinato (Coles et al., 1979; Alexi et al., 1998) e se liga ao sítio catalítico da SDH de forma irreversível, inibindo irreversivelmente a enzima (Wajner & Coelho, 1997).

O ácido malônico acumula na acidemia malônica, um erro inato do metabolismo, no qual ocorre a deficiência da enzima malonil-CoA descarboxilase (Haan et al., 1986; MacPhee et al., 1993). O malonato acumulado é um inibidor competitivo clássico da SDH (Messan et al., 1995; Greene & Greenamyre 1995; Fleck et al. 2004). Como o malonato compete com o succinato pelo sítio catalítico da enzima, a co-injeção de succinato (em altas doses) previne lesões induzidas por malonato, sugerindo que os danos metabólicos provocado pelo acúmulo de malonato se devem à inibição da SDH (Greene & Greenamyre, 1995).

O ácido metilmalônico é o principal metabólito acumulado na acidemia metilmalônica, também um erro inato do metabolismo, no qual ocorre a deficiência da enzima metilmalonil-CoA mutase (Fenton & Rosemberg, 1995; Mello et al., 1996; Wajner & Coelho, 1997). O metilmalonato acumulado inibe de forma competitiva a enzima SDH (Dutra et al., 1993; Toyoshima et al., 1995; Wajner & Coelho, 1997; Marisco et al., 2003; Fleck et al., 2004), resultando em depleção energética. A pré-administração de succinato reverte os efeitos induzidos pela administração intraestriatal de metilmalonato, sugerindo o possível envolvimento da inibição da SDH nos mecanismos induzidos pelo metilmalonato (Mello et al., 1996; Royes et al., 2003).

Embora nestas acidemias orgânicas também ocorra o acúmulo de outros metabólitos reconhecidamente neurotóxicos, como a amônia na acidemia metilmalônica (Marisco et al., 2003), pouco se sabe sobre o papel das metabólitos secundários que se acumulam nestas patologias, como o próprio succinato (Erecinska & Nelso, 1994; Mello et al., 1996 Wajner & Coelho, 1997), que poderia ter implicações por si só na fisiopatologia destas doenças.

A deficiência do complexo II da cadeia respiratória é um raro caso de encefalopatia mitocondrial e pode estar associada à síndrome de Leigh e leucodistrofia (Bourgeron et al., 1995; Rahman et al., 2001), miopatia com intolerância ao exercícios (Reichmann & Angelini 1994; Sugimoto et al., 2000) e cardiopatia isolada (Rustin et al., 1993). Estas complicações podem estar associadas ao acúmulo de succinato. O succinato também é acumulado quando ocorre uma deficiência na hidratação do fumarato (De Meirleir, 2002), onde ocorre falha da enzima fumarase acumulando fumarato que é convertido em succinato.

### ***3.3 Efeitos eletrofisiológicos do succinato***

Sugere-se que o succinato apresenta um efeito facilitatório sobre a excitabilidade neural. Assim, Rohers e colaboradores (2004) descrevem que concentrações baixas de succinato (0,3 – 1 mM) induzem um aumento nas respostas do potencial pós-sináptico excitatório de campo (PEPs) no hipocampo, enquanto que altas concentrações (3 -10 mM) reduzem as respostas de PEPs ao longo do tempo, abolindo o efeito causado pelas baixas concentrações de succinato, mostrando um efeito bifásico. O aumento nas respostas PEPs é revertido por ácido D-2-amino-5-fosfonopentanóico (AP5), um

antagonista de receptor NMDA. Já o ciano-3,3-diidro-7-nitroquinoxalina (CNQX), antagonista de receptores não-NMDA (AMPA, cainato), não possui efeito sobre o aumento nas respostas de PEPs induzidas pelo succinato. Esses dados sugerem que o succinato apresenta um efeito bifásico sobre o receptor NMDA. A indução de convulsão em camundongos é outra evidência do potencial excitatório deste composto. Essas convulsões são prevenidas pela co-administração de MK-801 (Roehrs et al. 2004), sendo mais um indicativo de que as ações do succinato envolvem o receptor NMDA.

Colaborando para o fato de o succinato ter um efeito bifásico, e este efeito ser sobre o receptor NMDA, Sinhorin e colaboradores (2005) relatam que a administração i.c.v. de doses sub-convulsivantes (0,7 e 10  $\mu\text{mol}$ ) de succinato em camundongos são capazes de diminuir a atividade exploratória, aumentar a carbonilação protéica e aumentar também a quantidade de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) de maneira bifásica. Essas alterações são prevenidas pela co-administração de succinato e de MK-801, sugerindo novamente o efeito bifásico do succinato sobre o receptor NMDA (Sinhorin et al., 2005).

Outro indício do efeito bifásico do succinato é que este ácido dicarboxílico possui efeito ansiolítico exibindo uma curva dose-resposta na forma de U invertido, porém esse efeito não foi farmacologicamente comprovado, uma vez que só foi comparado ao efeito dos benzodiazepínicos (Chen et al., 2003).

### **3.4 Receptor N-metil-D-aspartato (NMDA)**

O receptor NMDA é um dos principais subtipos de receptor glutamatérgico e está distribuído em grande quantidade em algumas estruturas cerebrais como córtex,

hipocampo, estriado, amígdala entre outras (Scatton, 1993; Ozawa et al., 1998; Riedel et al., 2003). O receptor NMDA é um canal iônico formado por subunidades heteroméricas: NR1 (na qual se liga a glicina), NR2 (A-D) (na qual ocorre a ligação do glutamato) e NR3 (A-B) (Yamakura & Shimoji, 1999; Prybylowski & Wenthold, 2004). As combinações diferentes destas subunidades proporcionam funções e propriedades farmacológicas distintas ao receptor NMDA (Hollmann & Heinemann, 1994; Dinglone et al., 1990).

O receptor NMDA é um complexo protéico que possui vários sítios regulatórios distintos que modulam a função deste receptor, tais como os sítios para a ligação dos neurotransmissores endógenos, glutamato e glicina, o sítio para a ligação do  $Mg^{2+}$ . Outros sítios para a modulação alostérica incluem sítios para agentes redox, prótons, zinco ( $Zn^{2+}$ ), de fosforilação, das poliaminas e para drogas que bloqueiam o canal iônico, tais como, fenciclidina (PCP), piperidina (TCP), cetamina e dizocilpina (MK-801) (Ransan & Stec, 1988; Yamakura & Shimoji, 1999; Hynd et al., 2004).

O receptor NMDA medeia à transmissão sináptica excitatória lenta, sua ativação resulta no influxo de  $Ca^{2+}$  e  $Na^{2+}$ , gerando uma despolarização da membrana (Scatton, 1993; Ozawa et al., 1998). Durante o potencial de repouso, o receptor apresenta seu canal bloqueado pelo íon  $Mg^{2+}$  (Riedel et al., 2003), causando o impedimento da passagem de outros íons através do canal. Para que o receptor NMDA seja ativado é necessário que haja uma despolarização prévia da membrana, geralmente desencadeada pela ativação do receptor glutamatérgico AMPA. Sendo assim, o  $Mg^{2+}$  sai do poro somente quando a membrana está despolarizada. Este bloqueio voltagem-dependente do canal por  $Mg^{2+}$  pode ser visto como um mecanismo

protetor intrínseco contra a entrada excessiva de íons  $\text{Ca}^{2+}$  na célula e subsequente toxicidade neuronal (Scatton, 1993).

O receptor NMDA desempenha papel central na plasticidade sináptica, que tem sido apontado como um dos mecanismos de aprendizagem e memória (Pláteník et al., 2000; Daoudal & Debanne, 2003). Posteriormente será abordado o mecanismo de formação da memória através da ativação de receptores NMDA.

### **3.5 Memória**

A memória é uma função cognitiva de extrema importância porque ela nos proporciona uma base para o aprendizado. Se não possuíssemos uma forma de armazenar representações do passado, não teríamos como tirar proveito destas experiências. Eu sou quem sou, cada um é quem é, porque todos nos lembramos de coisas que são próprias e exclusivas, e não pertence a mais ninguém. As nossas memórias fazem com que cada ser humano ou animal seja um ser único, um indivíduo (Izquierdo, 2002).

A memória envolve três fases: a fase de aquisição de uma informação ou aprendizagem, a fase de consolidação, onde armazenamos esta informação e a fase de evocação, quando recordamos as informações que outrora foram armazenadas (Abel & Lattal, 2001).

### **3.5.1 Tipos de Memórias**

As memórias apresentam duas classificações. Elas podem ser classificadas de acordo com o tempo que duram e com o seu conteúdo, existindo uma relação entre estas memórias e as zonas cerebrais que intervêm em sua formação e talvez no seu armazenamento (Squire & Zola, 1996).

Quanto ao tempo de duração, as memórias se classificam em: memória imediata, memória de curta e longa duração e memória remota. A memória imediata, também chamada de memória de trabalho, é breve e fugaz, gerencia a realidade mantendo a informação por um curto período de tempo, de segundos a no máximo alguns minutos, não deixa traços nem arquivos. Ela é processada fundamentalmente no córtex pré-frontal, dependendo apenas da atividade elétrica dos neurônios (Izquierdo, 2002; Curtis & D'Esposito, 2003; Izquierdo, 2004). Como exemplo, a segunda palavra da frase anterior é conservada apenas o suficiente para conectá-la com a que precede e com as seguintes e, assim, entender essa frase, e pode ser recordada ou não. A memória de curta duração, dura de minutos a poucas horas até a formação da memória de longa duração, se estas memórias duram muitos meses ou anos costumam ser denominadas de memórias remotas (Mayford & Kandel, 1999; Lees & Jones, 2000; Izquierdo, 2002, 2004). A memória de longa duração é aquela que persiste por muito tempo, que pode ser evocada anos após sua aquisição (Ranganath & Blumenfeld, 2005). Como por exemplo, a lembrança de amigos de infância. As memórias de curta e de longa duração requerem as mesmas estruturas nervosas, mas envolvem mecanismos diferentes (Izquierdo et al., 1998), e formam “traços”.

Do ponto de vista de seu conteúdo, as memórias podem ser divididas em declarativas e não-declarativas. A memória declarativa ou explícita é aquela em que registramos fatos ou eventos e que podemos expressar com palavras, sendo feitas de maneira consciente (Lent, 2004; Lees & Jones, 2000; Kandel, 2001). É uma memória de fácil formação, mas também facilmente esquecidas. Enquanto que a memória não-declarativa ou implícita é aquela que não conseguimos verbalizar e não envolve evocação consciente, é uma memória de habilidade ou procedimento, como andar de bicicleta ou dirigir um automóvel, é adquirida através da prática e requer repetição. A memória não-declarativa dura muito tempo e dificilmente é esquecida (Bear et al., 2002; Izquierdo, 2002; Squire & Kandel, 2003).

O aprendizado e a formação das memórias declarativas e não-declarativas dependem de estruturas cerebrais diferentes. As memórias declarativas requerem o lobo temporal medial e o hipocampo enquanto as memórias não-declarativas envolvem estruturas diferentes como a amígdala, gânglios da base e cerebelo (Albright et al., 2000; Lees & Jones, 2000).

### **3.5.2 Medo Condicionado**

A tarefa de medo condicionado utiliza memória associativa. Ela foi primeiro descrito pelo psicólogo russo Ivan Pavlov no início do século XX e também é conhecido como condicionamento pavloviano ou clássico (Schafe et al., 2001; Maren, 2005a). Esta tarefa consiste na apresentação de um estímulo condicionado (CS), inicialmente neutro e incapaz de provocar uma reação comportamental (tom, luz ou cheiro, por exemplo), que adquire a capacidade de provocar reações comportamentais (congelamento, por

exemplo) após a associação a um estímulo incondicionado (US) aversivo como um choque nas patas. Quando o animal aprende esta associação responde com comportamentos defensivos, pára de se mover, congelando os movimentos (“freezing”), seu pelo fica eriçado, ocorre aumento de seus batimentos cardíacos e de sua pressão sangüínea. Memórias de medo são duradouras, podendo persistir por meses, anos ou até por toda vida (Maren, 2005a). O CS pode envolver somente uma modalidade sensorial ou dicas tais como som, cheiro ou luz, sendo unimodal ou envolver algumas modalidades sensoriais tais como o contexto sendo multimodal (Dityatev & Bolshakov, 2005).

Muitas evidências farmacológicas e neurofisiológicas apontam a amígdala como o sistema chave na formação de memórias do medo (Fendt & Fanselow, 1999; Maren, 2001). Informações auditivas e somatossensoriais (CS e US, respectivamente), por vias talâmicas e corticais chegam ao núcleo lateral da amígdala. O hipocampo envia informações multimodais, informando o contexto que define o tempo e o lugar da aquisição da experiência aversiva também para o núcleo lateral da amígdala. Dentro da amígdala, neurônios individuais respondem a esses estímulos, fazendo a associação do CS e US a nível celular. Depois de ser processada pelo núcleo lateral da amígdala a informação sensorial é enviada para o núcleo central da amígdala, que envia projeções da amígdala para áreas do tronco encefálico e hipotálamo que controlam a expressão de comportamentos defensivos, secreção hormonal e respostas autônomas como o comportamento de congelar e aumento da pressão sangüínea (Dityatev & Bolshakov, 2005; Maren, 2005a, 2005b; Kim & Jung, 2006; Sigurdsson et al., 2006). Lesões bilaterais na amígdala eliminam respostas de medo, confirmando o importante papel da amígdala no medo condicionado (Kim & Jung, 2006).

O hipocampo possui um papel muito importante na aquisição e consolidação de memórias aversivas contextuais (Fent & Fanselow, 1999; Sanders et al., 2003) que podem ser avaliadas pela tarefa de medo condicionado. Esta estrutura faz a conexão entre o contexto (local, ambiente) com as experiências aversivas e envia estas informações a amígdala (O'Reilly & Rudy 2001; Sander et al., 2003). Vários sistemas de neurotransmissores influenciam as funções do hipocampo, incluindo o sistema glutamatérgico e noradrenérgico. Projeções glutamatérgicas chegam ao hipocampo via córtex entorrinal, já as projeções noradrenérgicas chegam ao hipocampo através do locus cereleus (Bear et al., 2002; Kuhar et al., 2006). Manipulações farmacológicas, com MK-801 ou propranolol, antagonista glutamatérgico e  $\beta$ -adrenérgico, respectivamente, e lesões no hipocampo pioram o medo condicionado contextual, mas não apresentam efeito sobre a memória ao tom (Phillips & LeDoux, 1992; Kim & Fanselow, 1992; Young et al., 1994; Maren et al., 1997; LeDoux, 2000; Zhang et al., 2001; Sanders & Fanselow, 2003; Murchison et al., 2004).

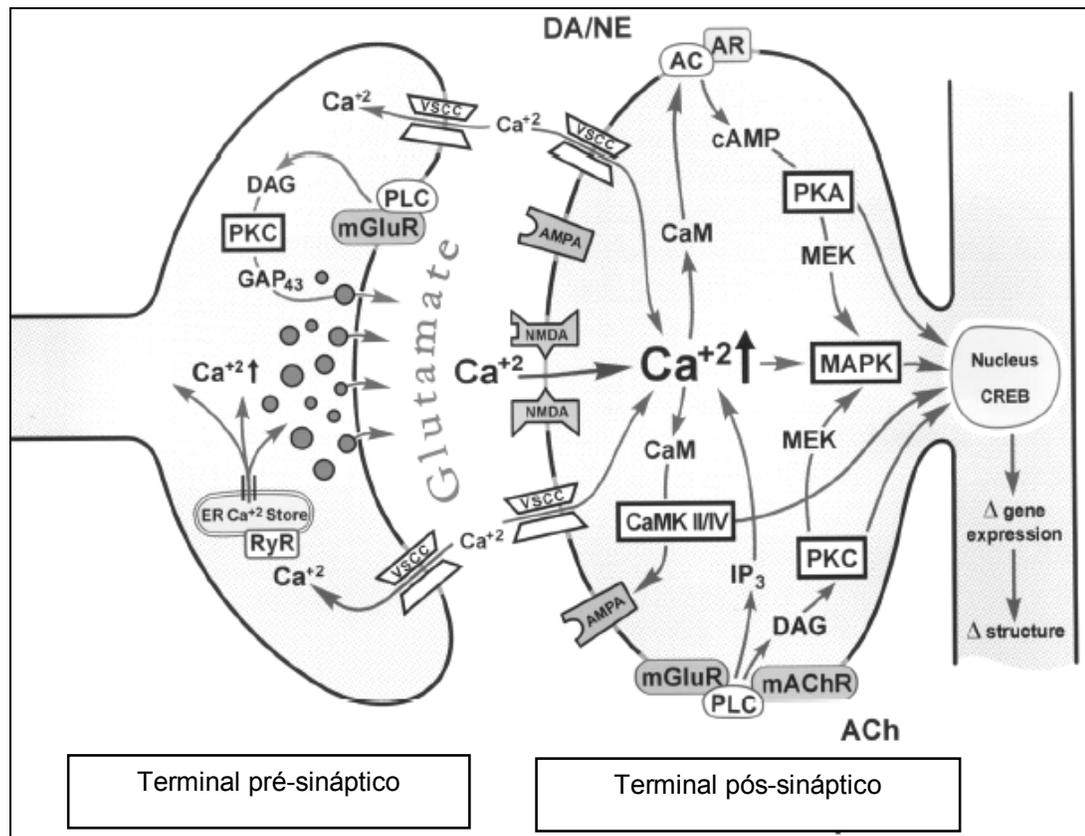
### ***3.5.3 Mecanismo de formação da memória***

Há indícios de que os mecanismos bioquímicos envolvidos com a formação de uma nova memória são diferentes dos mecanismos de sua evocação (Abel & Lattal, 2001; Izquierdo, 2004). Na formação de memória de longa duração ocorre expressão gênica, síntese protéica, e ativação de várias vias metabólicas ligadas a esses processos. Já na memória de curta duração não há expressão gênica nem síntese protéica, pois sua formação ocorre em pouco tempo (segundos a 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; Izquierdo; 2004). Para a evocação das memórias são utilizadas algumas vias bioquímicas utilizadas na formação das memórias de longa duração, mas não ocorre ativação gênica e síntese protéica (Izquierdo, 2004).

O mecanismo bioquímico da formação da memória inicia quando o glutamato, liberado de vesículas pré-sinápticas de um neurônio ativado, se liga a receptores glutamatérgicos do tipo AMPA, cainato, NMDA e metabotrópicos (MgluR) no neurônio pós-sináptico, provocando a abertura dos canais de cálcio dependente de voltagem. Esse aumento na concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular estimula enzimas como: proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina do tipo II (CaMKII - atua fosforilando e ativando os receptores AMPA) e proteínas quinase dependentes de GMPc (PKG). A PKG participa da liberação de mensageiros retrógrados, como óxido nítrico, monóxido de carbono e fator de agregação plaquetária (PAF), que aumentam ainda mais a liberação de glutamato. Outra enzima, a proteína quinase dependente de cálcio (PKC), contribui fosforilando a proteína do terminal axonal, a GAP-43, que também mobiliza mais glutamato, mantendo assim a transmissão sináptica ativada por algumas horas. Passadas 3-4 horas, são ativadas as proteínas quinase dependentes de AMPc (PKA) e as proteínas ativadas por mitogênio (MAPK). Estas junto com a PKC, fosforilam fatores de transcrição protéicos no núcleo, dos quais o principal é a proteína ligante do elemento responsivo ao AMPc (CREB), culminando com a síntese de algumas proteínas e com o aumento na efetividade da transmissão de informações entre os neurônios, fenômeno esse conhecido como plasticidade sináptica (Figura 2) (Bliss &

Collingridge, 1993; Izquierdo & Medina 1995, 1997; McGaugh & Izquierdo, 2000; Bear et al., 2002; Izquierdo, 2002; Izquierdo et al., 2006).



**Figura 2** – Esquema da seqüência de modificações de um terminal sináptico glutamatergico envolvido na formação da memória (adaptado de Gilbert & Lasley, 2002).

No processo de formação da memória ocorre também o envolvimento de outros sistemas, além do glutamatergico. Neurônios colinérgicos, opióides e noradrenérgicos e GABAérgicos demonstram ter influência sobre a consolidação da memória (Izquierdo, 1991; McGaugh, 2002). A infusão na amígdala de oxtremorina (agonista colinérgico muscarínico), melhora a memória dos ratos em várias tarefas, enquanto a infusão de

propranolol (bloqueador  $\beta$ -adrenérgico, na amígdala ou no hipocampo), de baclofen (agonista GABAérgico) prejudicam o desempenho de roedores em várias tarefas de memória (Salinas et al., 1997; Zarrindast et al., 2001; Erickson et al., 2006).

#### **3.5.4 Envolvimento do receptor NMDA na memória**

Muitos estudos têm demonstrado o envolvimento do receptor glutamatérgico NMDA em processos de plasticidades sináptica e formação da memória (Riedel et al., 2003).

Os antagonistas do receptor NMDA pioram o desempenho de animais em diversas tarefas de memória. A administração de MK-801 e AP5 causam prejuízo da memória em diferentes tarefas (Morris et al., 1986; Izquierdo et al., 1992; Castellano et al., 1999; Roesler et al., 2000; Lima et al., 2005; Camera et al., 2007). Por outro lado, agonistas do receptor NMDA, como glutamato (Izquierdo & Medina, 1995; Rubin et al., 1997) e o ácido DL-beta-clorofenil glutâmico (CPG) melhoram a performance dos ratos na tarefa de esquivas inibitória e de camundongos no labirinto em T, respectivamente (Flood et al., 1990). O agonista, NMDA melhora a memória na tarefa de medo condicionado de traço (Zhang et al., 2001), assim como a espermidina também causa melhora da memória no teste de medo condicionado (Rubin et al., 2004; Camera et al., 2007).

Estudos com animais idosos e pacientes com doença de Alzheimer indicam que ocorre uma diminuição da expressão dos receptores NMDA em algumas estruturas cerebrais (Clayton & Browning, 2001; Sze et al., 2001), e um declínio da ligação de glutamato marcado ao receptor NMDA (Greenamyre et al., 1987; Ulas et al., 1992).

Assim, estas alterações modificam a plasticidade sináptica, podendo ser responsável pelo prejuízo da memória.

### **3.5.5 Envolvimento do receptor $\beta$ -adrenérgico na memória**

Alguns estudos demonstram o envolvimento dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos na formação da memória. A manipulação sistêmica de receptores  $\beta$ -adrenérgicos piora memórias emocionais em ratos (McGaugh, 2000; Murchinson et al., 2004) e humanos (McGaugh, 2000). Com o bloqueio de receptores  $\beta$ -adrenérgicos na amígdala de ratos, ocorre a mesma piora da consolidação da memória em algumas tarefas, como a esQUIVA inibitória e tarefas de memórias espaciais (Gallagher et al., 1977; Hatfield & McGaugh, 1999). Corroborando, a manipulação destes receptores no hipocampo causa um quevra na consolidação da memória nas tarefas de mdo condicionado contextual e no labirinto aquático (Ji et al., 2003a, b; Murchinson et al., 2004).

### **3.5.6 Dependência de Estado**

Dependência de estado é um modelo comportamental usado para se referir as respostas comportamentais aprendidas sob efeito de um tratamento, que no momento da evocação será executado com mais eficácia se o mesmo contexto sensorio e estado neuro-humorar (provocado pelo tratamento) forem restabelecidos (Overton, 1974; Arkhipov, 1999; Shulz et al.; 2000; Arenas et al., 2006). A dependência de estado é um fenômeno que explica a influência de drogas sobre a memória, e mais

especificamente para estudar mecanismos de recuperação da memória (Arkhipov, 1999).

O mecanismo de dependência de estado não é bem esclarecido, porém, a segunda administração do mesmo tratamento na hora da evocação da memória, poderia servir como dica para esta evocação, mostrando que ocorreu a formação da memória, porém esta evocação não acontece sem a presença da droga (Izquierdo, 1984). Algumas teorias tentam explicar a dependência de estado. Uma delas está baseada no estímulo, ela sugere que o tratamento altera o estímulo contextual no qual o aprendizado ocorreu sendo incorporado como parte do aprendizado. Considerando que o estímulo do contexto é diferente na evocação do aprendizado sem o tratamento, esta evocação é menos eficiente. Outra teoria seria de que as drogas provocariam mudanças neurológicas que não ficariam acessíveis na evocação sem a administração da droga, originando então a dependência de estado (Overton, 1974; Sripada et al, 2001).

Está descrito que a morfina (Zarrindast et al., 2004), os antagonistas do receptor NMDA, MK-801, fenciclidina, quetamina e CPP (Jackson et al., 1992; Harrod et al., 2001) e da atropina (Costa & Xavier, 2007) entre outras drogas alteram a memória por mecanismos dependente de estado. Por outro lado, alguns compostos como a glicose (Kopf et al., 1993), a fisostigmina ou oxotremorina (Baratti & Kopf, 1996) e a fluoxetina (Arenas et al., 2006) melhoram a memória sem causar dependência de estado.

---

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **4.1. Animais**

Foram utilizados ratos Wistar, machos, com aproximadamente 3 meses de idade, pesando entre 270-340 g fornecidos pelo Biotério Central da UFSM, mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas (ciclo claro entre 7 e 19 h), em temperatura de  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ , com água e comida *ad libitum*. Os procedimentos comportamentais foram executados entre 9:00 e 16:00 h. Os ratos foram mantidos e utilizados de acordo com as normas aprovadas pelo Comitê de Bioética da Universidade Federal de Santa Maria (Processo 23081.018515/2006-11).

#### **4.2. Reagentes**

- Cloranfenicol, Succinato, Propranolol, Propilenoglicol, Hidrato de Coral, Sulfato de Magnésio – Sigma (St. Louis, MO)
- MK-801 – Merck
- Cloreto de Sódio (NaCl) – Ecibra
- Etanol – Vetec
- Tiopental Sódico – Abbott

Todas as soluções foram preparadas no dia do experimento em salina 0,9% como veículo. O succinato foi administrado no volume de 2 ml/kg de peso corporal por via intraperitoneal (i.p.). As outras drogas, MK-801 e propranolol, foram administradas no volume de 1 ml/kg de peso corporal. Para a administração intra-hipocampal (i.h.) o

volume utilizado foi de 0,5 µL. A seleção das doses foi feita com base em estudos pilotos e/ou de acordo com a literatura.

#### ***4.3. Procedimento cirúrgico para implantação de cânulas***

Os ratos foram anestesiados com uma solução de hidrato de coral (4,25 g), sulfato de magnésio (2,16 g), propilenoglicol (42,8 mL), etanol (11,5 mL), pentobarbital (0,96 g) e água destilada (100 mL q.s.p.). O anestésico, assim preparado, foi administrado no volume de 4 mL/kg (i.p.) e logo após duas cânulas foram inseridas bilateralmente no hipocampo, nas coordenadas relativas ao bregma (AP 4.0 mm; ML 3.0 mm; V 2.0 mm da dura) utilizando um aparelho estereotáxico. Antes da anestesia os animais receberam uma injeção de cloranfenicol (200 mg/kg, i.p.).

#### ***4.4. Procedimento do medo condicionado***

Os animais foram submetidos à tarefa de medo condicionado contextual e ao tom de acordo com Rubin e colaboradores (2004). Resumidamente, no primeiro dia, os animais foram treinados em uma sala (sala A), com som de fundo de 70 dB. Os animais foram colocados em uma caixa retangular medindo 30 x 25 x 25 cm, com o chão composto por 32 barras de metal (3 mm diâmetro), espaçadas por 1 cm e ligadas a corrente elétrica, e durante três minutos foram deixados livres para explorar o ambiente. Após, os animais receberam cinco pareamentos de tom (2000 Hz, 90 dB - 10 s) e

choque (0,6 mA - 1 s) com intervalos de quarenta segundos. Ao final do treino os animais receberam os tratamentos e, em seguida foram recolocados em suas caixas e levados ao biotério.

No segundo dia, os ratos foram submetidos ao teste do medo condicionado ao contexto, o qual foi realizado na mesma caixa e na mesma sala (sala A) do treino, porém, na ausência de tom ou choque. Durante oito minutos foi avaliada a imobilidade dos animais, sendo que nos três primeiros minutos também foi avaliado a locomoção espontânea. A imobilidade dos animais é definida como a ausência total de movimentos exceto os respiratórios. A imobilidade foi avaliada a cada quatro segundos e foi transformada em porcentagem. Após o término do teste, os animais foram recolocados em suas caixas e levados ao biotério. A caixa era limpa, antes e após cada animal ocupá-la, com solução de ácido acético 1%.

No terceiro dia, os ratos foram submetidos ao teste do medo condicionado ao tom, o qual foi realizado em sala (sala B) e caixa (caixa B) diferente da anterior. Os animais foram colocados em uma caixa triangular medindo 30 x 30 x 25 x 30 cm, cujas paredes laterais e o chão eram de madeira, e a parede frontal de acrílico transparente. Nos primeiros três minutos foi avaliado o número de respostas de imobilidade ao novo contexto, sem a apresentação do tom. Esta medida serviu para verificar se o efeito das drogas era específico ao tom ou se era relativo à apresentação do novo contexto. Nos oito minutos subsequentes, com apresentação de tom, era registrada a imobilidade dos animais a cada quatro segundos, para avaliação do medo condicionado ao tom. A caixa era limpa, antes e após cada animal ocupá-la, com etanol 30%. A porcentagem de imobilidade dos animais serviu de indicativo de memória nos três dias de experimento.

#### **4.5 Procedimento de dependência de estado**

Para avaliar a dependência de estado foi utilizado o mesmo protocolo do medo condicionado contextual como descrito anteriormente nesta dissertação. Os animais recebiam os tratamentos imediatamente após o treino (dia 1) e 15 minutos antes do teste (dia 2).

Logo após o teste no medo condicionado contextual cada animal foi transferido para um campo aberto, uma arena circular de metal com 97 cm de diâmetro e 32,5 cm de altura, cujo assoalho era dividido em 11 áreas e observados por um período de 5 minutos. Os parâmetros comportamentais observados foram o número de cruzamentos e de respostas de levantar, que serviam de indicativo para verificar se o efeito das drogas era realmente sobre a consolidação da memória e não sobre outros padrões comportamentais, tal como a locomoção espontânea.

#### **4.6. Experimentos**

##### **4.6.1 Experimento 1: Efeito da administração intraperitoneal (i.p.) de succinato sobre a consolidação da memória: Curva dose-efeito.**

Para avaliar o efeito da injeção intraperitoneal de succinato sobre a memória na tarefa de medo condicionado, os animais receberam imediatamente após o treino, uma injeção de succinato (0,00005; 0,0005; 0,005; 0,05; 0,5 ou 5 mg/kg, i.p.) Vinte e quatro

horas depois, os animais eram submetidos aos testes do medo condicionado contextual e 48 horas depois do treino ao medo condicionado ao tom.

#### ***4.6.2 Experimento 2: Avaliação da possível dependência de estado causada pelo succinato (i.p.) sobre a memória.***

Os animais receberam salina 0,9 % ou succinato (0,005 mg/kg, i.p.) imediatamente após o treino e 15 minutos antes da sessão de teste. Assim, os animais foram divididos em quatro grupos: 1 - salina após o treino e antes da sessão de teste (Sal/Sal), 2 - salina após o treino e succinato antes da sessão de teste (Sal/Suc), 3 - succinato após o treino e salina antes da sessão de teste (Suc/Sal) e 4 - succinato após o treino e antes da sessão de teste (Suc/Suc). Imediatamente depois do teste de medo condicionado contextual, os animais foram submetidos ao teste de campo aberto.

#### ***4.6.3 Experimento 3: Efeito da administração intraperitoneal (i.p.) de MK-801 e de succinato sobre a consolidação da memória.***

Para avaliar o envolvimento dos receptores glutamatérgicos NMDA no efeito facilitatório da memória induzido pelo succinato, foi administrado MK-801 e succinato e foi avaliada a memória da tarefa de medo condicionado. Os animais receberam imediatamente após o treino uma injeção de MK-801 (0,001 mg/kg, i.p.) ou salina 0,9 % e uma injeção de succinato (0,005 mg/kg, i.p.) ou salina 0,9 %. As injeções foram aplicadas separadamente e em lados opostos do abdome. 24 horas depois os animais

foram submetidos aos testes do medo condicionado contextual e 48 horas depois do treino ao medo condicionado ao tom.

#### ***4.6.4 Experimento 4: Efeito da administração intraperitoneal (i.p.) de propranolol e de succinato sobre a consolidação da memória.***

Para avaliar um possível envolvimento do sistema adrenérgico no efeito facilitatório do succinato sobre a memória, foi administrado propranolol e succinato e foi avaliado a memória da tarefa de medo condicionado. Os animais receberam imediatamente após o treino uma injeção de propranolol (10 mg/kg, i.p.) ou salina 0,9 % e uma injeção de succinato (0,005 mg/kg, i.p.) ou salina 0,9 %. As injeções foram aplicadas separadamente e em lados opostos do abdome. 24 horas depois os animais foram submetidos aos testes do medo condicionado contextual e 48 horas depois do treino ao medo condicionado ao tom.

#### ***4.6.5 Experimento 5: Efeito da administração intra-hipocampal (i.h.) de succinato sobre a consolidação da memória: Curva dose-efeito.***

Quatro dias após a implantação das cânulas os animais foram treinados e, imediatamente após o treino receberam uma injeção de succinato (0,021; 0,21; 2,1 ou 21 pmol, i.h.) através das cânulas. 24 horas depois os animais foram submetidos aos testes do medo condicionado contextual e 48 horas depois do treino ao medo condicionado ao tom.

**4.6.6 Experimento 6: Efeito da administração intra-hipocampal (i.h.) de MK-801 sobre a consolidação da memória: Curva dose-efeito.**

Quatro dias após a implantação das cânulas os animais foram treinados e, imediatamente após o treino receberam uma injeção de MK-801 (2; 0,66 e 0,22 nmol, i.h.) através das cânulas. 24 horas depois os animais foram submetidos aos testes do medo condicionado contextual e 48 horas depois do treino ao medo condicionado ao tom.

**4.6.7 Experimento 7: Efeito da administração intra-hipocampal (i.h.) de MK-801 e succinato sobre a consolidação da memória.**

Para avaliar o envolvimento dos receptores glutamatérgicos NMDA no efeito facilitatório da memória induzido pela administração i.h. de succinato, foi administrado MK-801 e succinato e avaliada a memória utilizando-se a tarefa de medo condicionado. Os animais receberam imediatamente após o treino MK-801 (0,22 nmol, i.h.) ou salina 0,9 % e uma injeção de succinato (0,21 pmol, i.h.) ou salina 0,9 %. 24 horas depois os animais foram submetidos aos testes do medo condicionado contextual e 48 horas depois do treino ao medo condicionado ao tom.

#### **4.7 Análise estatística**

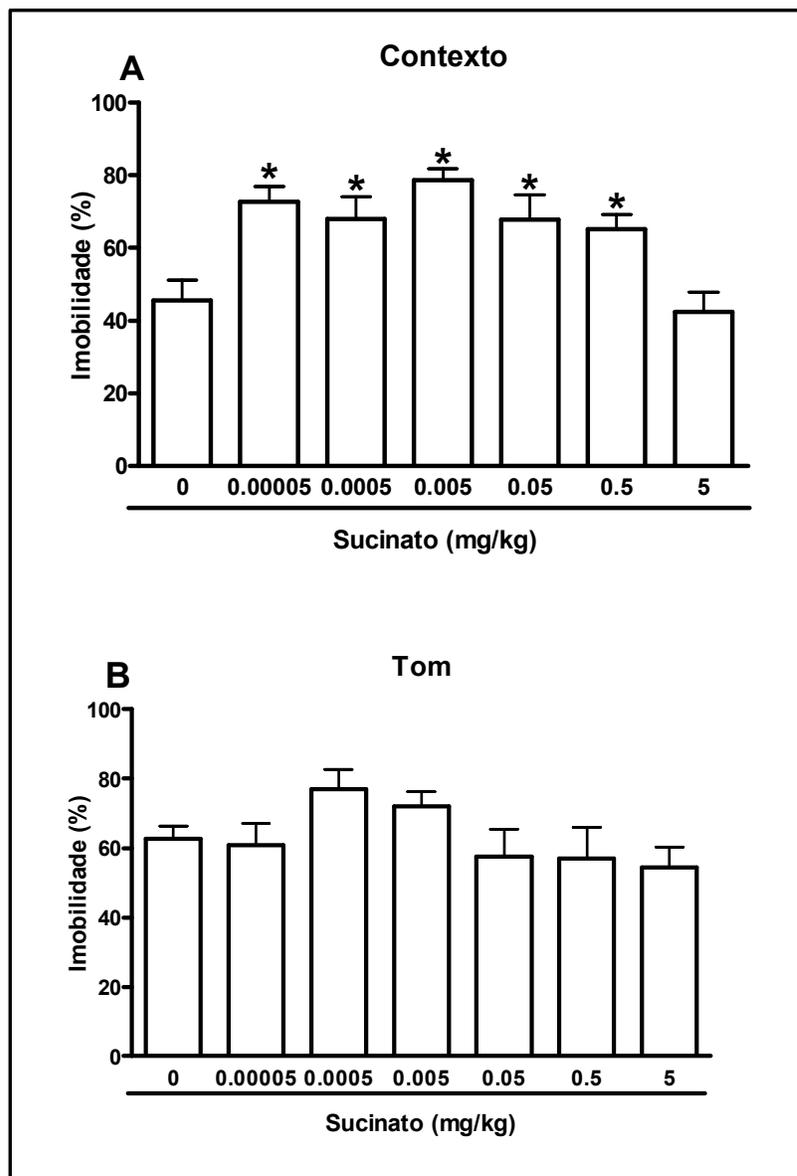
Os dados de percentagem de imobilidade foram transformados usando a função arcoseno. Esses dados, assim como os demais dados comportamentais (respostas de cruzamentos e de levantar) foram analisados utilizando análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, dependendo do desenho experimental utilizado. A análise *post hoc*, quando necessária, foi realizada pelo teste de Student Newman Keuls.

---

## **5. RESULTADOS**

### **5.1 Experimento 1: Efeito da administração intraperitoneal (i.p.) de succinato sobre a consolidação da memória: Curva dose-efeito**

A figura 3 A mostra o efeito da administração i.p. imediatamente pós-treino de succinato sobre a memória na tarefa de medo condicionado contextual. A análise estatística (ANOVA de uma via) revelou que existe diferença entre os grupos [ $F(6,56)=7.68$ ;  $p<0,05$ ]. A análise *post hoc* mostrou que o succinato (0,00005; 0,0005; 0,005; 0,05 e 0,5 mg/kg, i.p.) melhorou a consolidação da memória na tarefa de medo condicionado contextual. Por outro lado, o succinato não alterou a memória na tarefa de medo condicionado ao tom [ $F(6,56)=1,865$ ;  $p>0,05$ ] (figura 3 B).



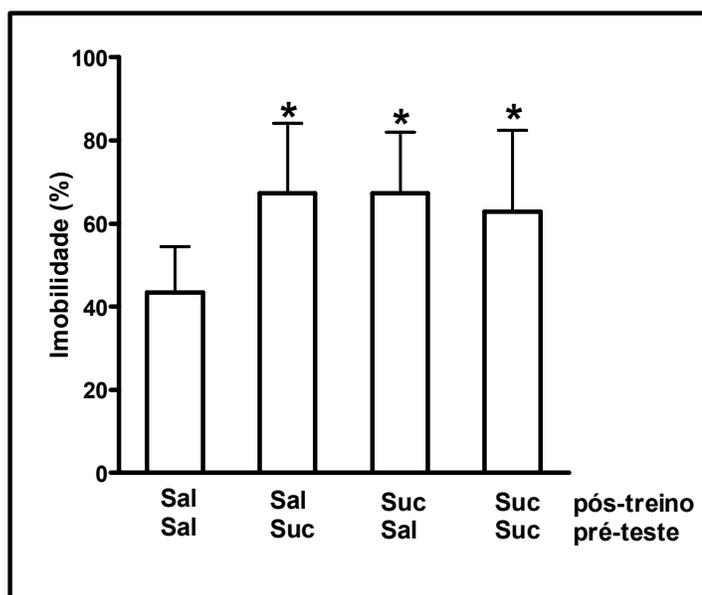
**Figura 3:** Efeito da administração de succinato (0,00005; 0,0005; 0,005; 0,05; 0,5; 5 mg/kg, i.p.) sobre a memória na tarefa de medo condicionado contextual (A) e ao tom (B). Os dados são apresentados como média + erro padrão. n= 8-12 animais por grupo. \*  $p < 0,05$  comparado com o grupo salina.

## **5.2 Experimento 2: Avaliação da possível dependência de estado causada pelo succinato (i.p.) sobre a memória.**

A figura 4 mostra o efeito da administração de succinato (0,005 mg/kg, i.p.) ou salina 0,9% imediatamente após o treino e 15 minutos pré-teste sobre a memória na tarefa de medo condicionado contextual. A análise estatística (ANOVA de uma via) revelou que existe um efeito significativo da injeção após o treino de succinato [ $F(1,36)=4,60$ ;  $p<0,05$ ], uma vez que a administração de succinato imediatamente após o treino aumentou a imobilidade dos animais no dia do teste. A administração de uma segunda dose de succinato 15 minutos pré-teste não modificou o aumento da imobilidade induzida pela administração de succinato após o treino.

Estes resultados indicam que o efeito do succinato sobre a memória do medo condicionado não é causado por dependência de estado.

A tabela 1 mostra o efeito da administração de succinato ou salina (i.p.) imediatamente após o treino e 15 minutos pré-teste do medo condicionado contextual sobre o comportamento dos ratos no campo aberto avaliado logo após o teste do medo condicionado. A análise estatística (ANOVA de duas vias) revelou que os tratamentos utilizados não afetaram o número de cruzamentos e nem o número de respostas de levantar dos animais (ver resultados das estatísticas na tabela).



**Figura 4:** Efeito da administração de succinato (0,005 mg/Kg, i.p.) ou salina 0,9% imediatamente após o treino e 15 minutos pré-teste sobre a memória na tarefa de medo condicionado. Os dados são expressos como média + erro padrão. n= 10 animais por grupo. \* indica  $p < 0,05$  comparado ao grupo Sal/Sal.

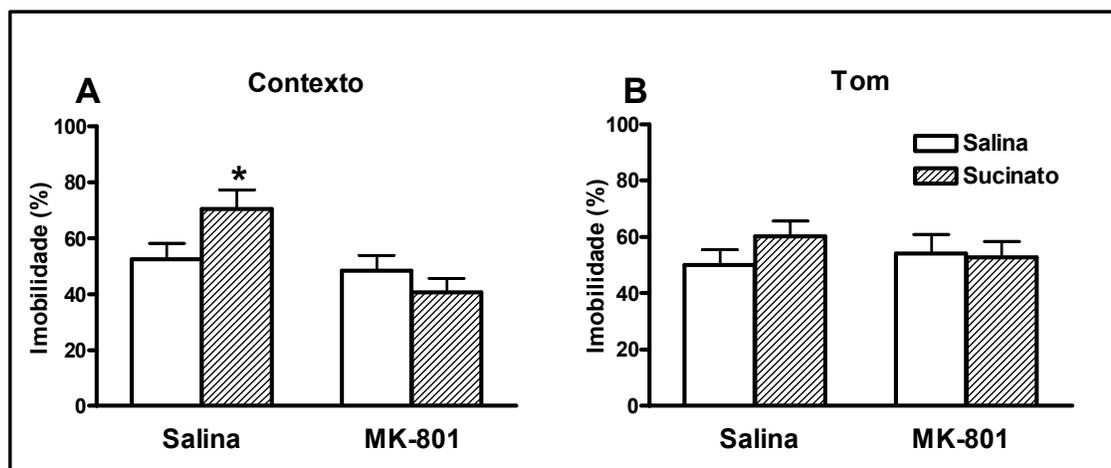
**Tabela 1:** Efeito da administração de succinato (0,005 mg/kg, i.p.) ou salina (i.p.) imediatamente após o treino e 15 minutos pré-teste do medo condicionado contextual sobre o número de cruzamentos e respostas de levantar no campo aberto.

Grupo	Cruzamento	Levantar	N
Salina-Salina	12,00 ± 10,94	5,30 ± 4,42	10
Salina-Succinato	9,60 ± 6,32	3,00 ± 1,94	10
Succinato-Salina	14,10 ± 11,96	6,60 ± 5,56	10
Succinato-Succinato	11,40 ± 8,89	4,90 ± 4,60	10
Análise Estatística	F(1;36)=0,098; $p > 0,05$	F(1;36)=0,047; $p > 0,05$	

Os dados são mostrados como média ± erro padrão, n = número de animais em cada grupo.

### 5.3 Experimento 3: Efeito da administração intraperitoneal (i.p.) de MK-801 e succinato sobre a consolidação da memória.

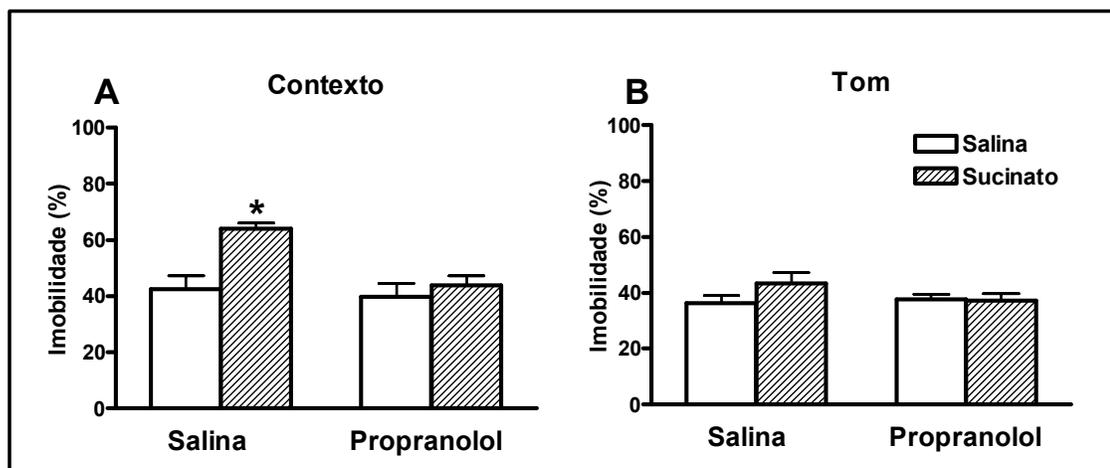
A Figura 5 A mostra que a administração imediatamente pós-treino de MK-801 (0,001 mg/kg, i.p.) reverteu o efeito facilitador do succinato (0,005 mg/kg, i.p.) sobre a memória do medo condicionado contextual (interação significativa entre succinato ou salina e MK-801 ou salina:  $F(1,36)=5,072$ ;  $p<0,05$ , ANOVA de duas vias). Este resultado sugere que o efeito do succinato sobre o medo condicionado contextual envolve o receptor NMDA. Por outro lado, a administração imediatamente pós-treino de succinato e/ou de MK-801 não alterou a memória do medo condicionado ao tom [ $F(1,36)=1,692$ ;  $p>0,05$ ] (Figura 5 B).



**Figura 5:** Efeito da administração de MK-801 (0,001 mg/kg, i.p.) e succinato (0,005 mg/kg, i.p.) sobre a memória na tarefa de medo condicionado contextual (A) e ao tom (B). Os dados são apresentados como média + erro padrão. n = 10 animais por grupo.

#### 5.4 Experimento 4: Efeito da administração intraperitoneal (i.p.) de propranolol e succinato sobre a consolidação da memória.

A Figura 6 A mostra que a administração imediatamente pós-treino de propranolol (10 mg/kg, i.p.) (Debiec & Ledoux, 2004) reverteu o efeito facilitador do succinato (0,005 mg/kg, i.p.) sobre a memória do medo condicionado contextual (interação significativa entre succinato ou salina e MK-801 ou salina:  $F(1,36)=4,283$ ;  $p<0,05$ , ANOVA de duas vias). Este resultado sugere que o efeito do succinato sobre o medo condicionado contextual envolve o receptor beta adrenérgico. Por outro lado, a administração imediatamente pós-treino de succinato e/ou de propranolol não alterou a memória do medo condicionado ao tom [ $F(1,36)=1,692$ ;  $p>0,05$ ] (Figura 6 B).



**Figura 6:** Efeito da administração de propranolol (10 mg/kg i.p.) e succinato (0,005 mg/kg, i.p.) sobre a memória na tarefa de medo condicionado contextual (A), e ao tom (B). Os dados são apresentados como média + erro padrão. n= 9-11 animais por grupo.

**5.5 Efeito do succinato, MK-801 e propranolol sobre a imobilidade no novo contexto (caixa B) na ausência de tom.**

A tabela 2 mostra o efeito do succinato, MK-801 e propranolol sobre a imobilidade dos animais quando expostos ao novo contexto (caixa B) na ausência do tom. A análise estatística (ANOVA de uma e duas vias) mostrou que não existe diferença significativa entre os grupos (resultados da estatística na tabela). Isto indica que a imobilidade que ocorreu durante a apresentação do tom é em resposta ao tom e não foi devido ao novo contexto.

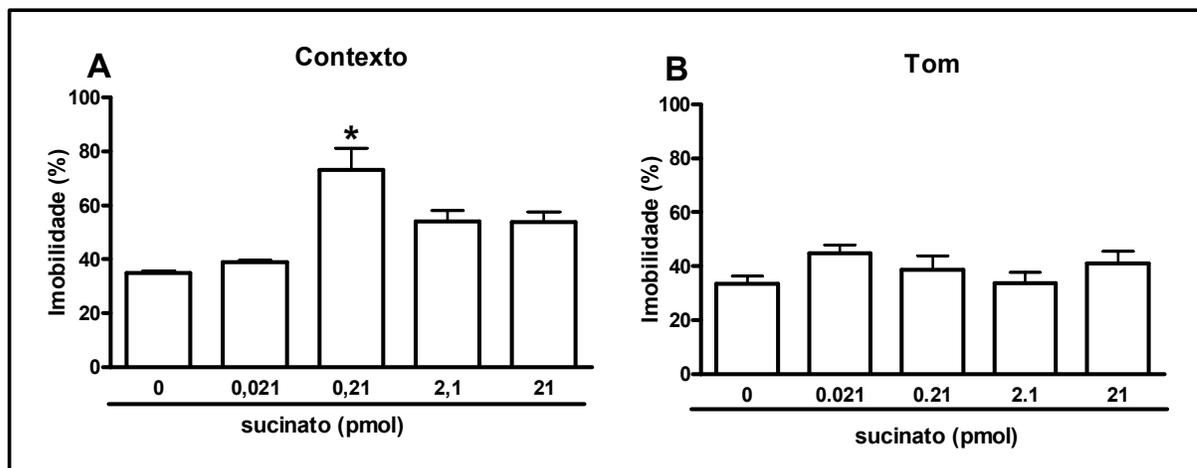
**Tabela 2:** Efeito da administração imediatamente pós-treino de de succinato (0,00005; 0,0005; 0,005; 0,05; 0,5; 5 mg/kg, i.p.), Mk-801 (0,001 mg/kg, i.p.) e propranolol (10 mg/kg, i.p.) sobre a imobilidade no novo contexto (caixa B) na ausência de tom.

<b>Grupo</b>	<b>Imobilidades ao novo contexto</b>	<b>n</b>
<b>Experimento 1</b>		
Salina	10,66±3,94	10
Succinato (0,00005 mg/kg)	8,14±2,98	12
Succinato (0,0005 mg/kg)	18,05±4,75	10
Succinato (0,005 mg/kg)	11,10±3,47	08
Succinato (0,05 mg/kg)	9,99±4,15	12
Succinato (0,5 mg/Kg)	6,94±3,31	12
Succinato (5 mg/kg)	11,99±4,68	08
Análise Estatística	F(6,56)=0,525 p>0,05	
<b>Experimento 3</b>		
Salina-Salina	4,66±2,10	10
Salina-Succinato	4,66±1,76	10
MK-801-Salina	3,99±1,08	10
MK-801-Succinato	7,10±4,22	10
Anlise Estatística	F(1,36)=0,363 p>0,05	
<b>Experimento 4</b>		
Salina-Salina	4,77±2,00	10
Salina-Succinato	4,02±2,40	10
Propranolol-Salina	3,09±1,29	09
Propranolol-Succinato	7,46±2,08	11
Análise Estatística	F(1,36)=1,699 p>0,05	

Os dados são mostrados como média ± erro padrão, n = número de animais em cada grupo.

### 5.6 Experimento 5: Efeito da administração intra-hipocampal (i.h.) de succinato sobre a consolidação da memória: Curva dose-efeito.

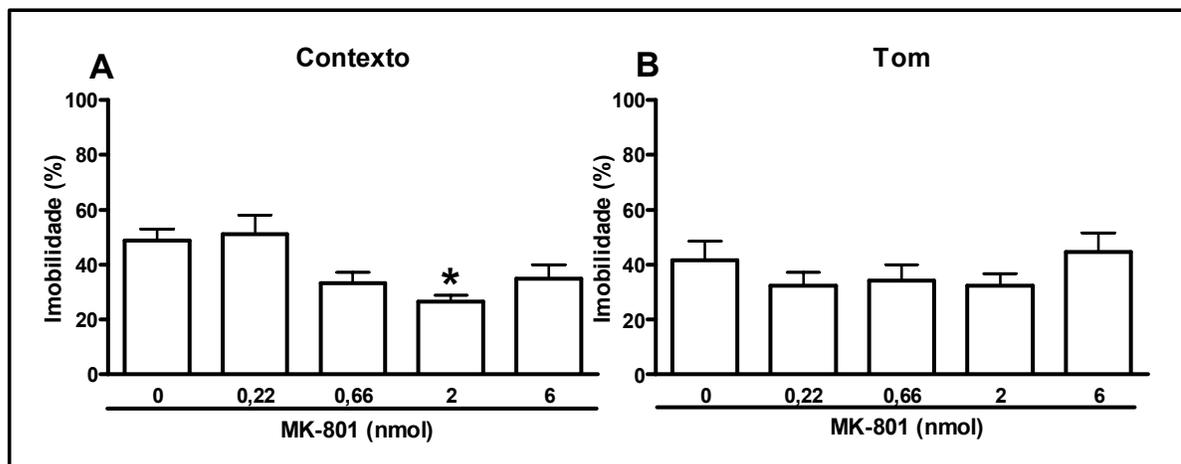
A figura 7 A mostra o efeito da administração i.h. imediatamente pós treino de succinato sobre a memória na tarefa de medo condicionado contextual. A análise estatística (ANOVA de uma via) revelou que existe diferença entre os grupos [ $F(4,31)=5,507$ ;  $p<0,05$ ]. A análise *post hoc* mostrou que o succinato (0,21 pmol, i.h.) melhorou a consolidação da memória na tarefa de medo condicionado contextual. Por outro lado, o succinato não alterou a memória na tarefa de medo condicionado ao tom [ $F(4,31)=1,474$ ;  $p<0,05$ ] (figura 7 B).



**Figura 7:** Efeito da administração de succinato (0,021; 0,21; 2,1; 21 pmol, i.h.) sobre a memória na tarefa de medo condicionado contextual (A) e ao tom (B). Os dados são apresentados como média + erro padrão. n= 7-9 animais por grupo. \*  $p<0,05$  comparado com o grupo salina.

### 5.7 Experimento 6: Efeito da administração intra-hipocampal (i.h.) de Mk-801 sobre a consolidação da memória: Curva dose-efeito.

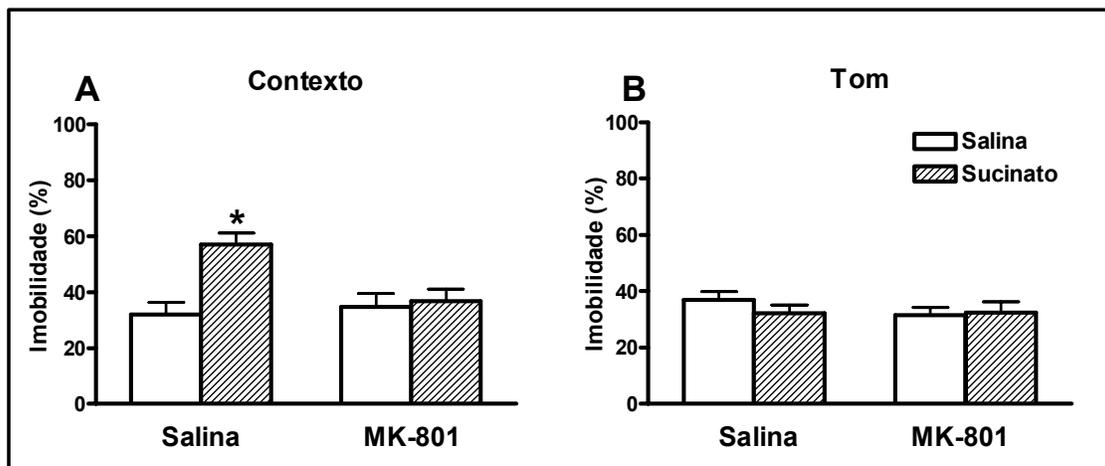
A figura 8 A mostra o efeito da administração i.h. imediatamente pós treino de MK-801 sobre a memória na tarefa de medo condicionado contextual. A análise estatística (ANOVA de uma via) revelou que existe diferença entre os grupos [F(4,24)=5,221;  $p < 0,05$ ]. A análise *post hoc* mostrou que o MK-801 (2 nmol, i.h.) piorou a consolidação da memória na tarefa de medo condicionado contextual. Por outro lado, o MK-801 não alterou a memória na tarefa de medo condicionado ao tom [F(4,24)=0,916;  $p > 0,05$ ] (figura 8 B).



**Figura 8:** Efeito da administração de MK-801 (0,22; 0,66, 2 e 6 nmol, i.h.) sobre a memória na tarefa de medo condicionado contextual (A) e ao tom (B). Os dados são apresentados como média + erro padrão. n= 8-12 animais por grupo. \*  $p < 0,05$  comparado com o grupo salina.

### 5.8 Experimento 7: Efeito da administração intra-hipocampal (i.h.) de MK-801 e succinato sobre a consolidação da memória.

A Figura 9 A mostra que a administração imediatamente pós-treino de MK-801 (0,22 nmol, i.h.) reverteu o efeito facilitador do succinato (0,21 pmol, i.h.) sobre a memória do medo condicionado contextual (interação significativa entre succinato ou salina e MK-801 ou salina:  $F(1,28)=6,706$ ;  $p<0,05$ , ANOVA de duas vias). Este resultado sugere que o efeito do succinato (i.h.) sobre o medo condicionado contextual envolve o receptor NMDA. Por outro lado, a administração imediatamente pós-treino de succinato e de MK-801 não alterou a memória do medo condicionado ao tom [ $F(1,28)=0,772$ ;  $p>0,05$ ] (Figura 9 B).



**Figura 9:** Efeito da administração de MK-801 (0,22 nmol, i.h.) e succinato (2,1 pmol, i.h.) sobre a memória na tarefa de medo condicionado contextual (A), e ao tom (B). Os dados são apresentados como média + erro padrão. n= 8 animais por grupo.

**5.9 Efeito do succinato e MK-801 sobre a imobilidade no novo contexto (caixa B) na ausência de tom.**

A tabela 3 mostra o efeito do succinato e do MK-801 sobre a imobilidade dos animais quando expostos ao novo contexto (caixa B) na ausência de tom. A análise estatística (ANOVA de uma ou duas vias) mostrou que não existe diferença significativa entre os grupos (resultados da estatística na tabela). Isto indica que a imobilidade que ocorreu durante o tom ocorreu em resposta ao tom e não foi devido a generalização do novo contexto.

**Tabela 3:** Efeito da administração imediatamente pós-treino de succinato (0,021, 0,21, 2,1 e 21 pmol, i.h.) e MK-801 (0,22, 0,66, 2 e 6 nmol, i.h..) sobre a imobilidade no novo contexto (caixa B) na ausência de tom.

<b>Grupo</b>	<b>Imobilidade ao novo contexto</b>	<b>n</b>
<b>Experimento 5</b>		
Salina	4,57±2,30	07
Succinato (0,021 pmol)	6,40±3,02	07
Succinato (0,21pmol)	10,04±2,67	06
Succinato (2,1 pmol)	7,70±1,96	09
Succinato (21 pmol)	9,77±3,02	07
Análise Estatística	F(4,31)= 0,748; p>0,05	
<b>Experimento 6</b>		
Salina	6,75±2,36	12
MK-801 (0,22 nmol)	5,33±2,56	08
MK-801 (0,66 nmol)	3,91±2,60	12
MK-801 (2 nmol)	2,84±1,79	08
MK-801 (6 nmol)	7,84±3,23	08
Análise Estatística	F(4,24)= 0,634; p>0,05	
<b>Experimento 7</b>		
Salina-Salina	7,30±1,69	08
Salina-Succinato	6,38±1,39	08
MK-801-Salina	8,40±2,11	08
MK-801-Succinato	4,71±1,83	08
Análise Estatística	F(1,28)=0,611; p>0,05	

Os dados são mostrados como média ± erro padrão, n = número de animais em cada grupo.



No presente estudo foi demonstrado que a administração sistêmica e intra-hipocampal de succinato melhorou o desempenho dos ratos na tarefa de medo condicionado contextual, entretanto, não teve efeitos sobre o medo condicionado ao tom. Essa melhora da memória da tarefa de medo condicionado contextual demonstrou não ser dependente de estado, e foi revertida por doses sem efeito *per se* de MK-801 e de propranolol, sugerindo que o efeito facilitatório do succinato sobre a memória pode envolver mecanismos glutamatérgicos e adrenérgicos.

Essa melhora da memória do medo condicionado contextual induzida pela administração sistêmica de succinato parece envolver o hipocampo, pois a tarefa de medo condicionado contextual requer o hipocampo e a amígdala, em contraste o medo condicionado ao tom requer somente a amígdala (Sanders et al., 2003b; Dityatev & Bolshakov, 2005). Para confirmar a participação do hipocampo na melhora da memória induzida por succinato, o mesmo foi administrado intra-hipocampal. De fato, o presente estudo demonstrou que a administração intra-hipocampal de succinato melhorou a memória do medo condicionado contextual. Isso evidencia que o hipocampo conecta a memória contextual com a experiência aversiva (O'Reilly & Rudy 2001; Sander et al., 2003a; Marem, 2005b).

O provável mecanismo de ação deste efeito facilitatório do succinato sobre a memória contextual, parece envolver o sistema glutamatérgico e o adrenérgico, uma vez que tanto o MK-801, antagonista não competitivo do receptor NMDA, como o propranolol, um bloqueador  $\beta$ -adrenérgico, em doses sem efeito *per se* sobre o medo condicionado, reverteram o efeito facilitatório da memória do medo condicionado contextual causado pela administração de succinato.

A melhora da memória do medo condicionado contextual induzida pelo succinato parece não ser dependente de estado, uma vez que a injeção pré-teste de succinato não reverteu a melhora da memória induzida pela administração pós-treino de succinato. Uma possível interpretação de dependência de estado para drogas que melhoram a memória, é que o estado produzido pela droga no momento do teste é parecido àquele induzido pela administração da droga após o treino. Então, o tratamento com a mesma droga antes do teste deveria diminuir a similaridade dos dois estados, atenuando assim, a melhora da memória (McGaugh, 1992). Esse aumento da retenção da memória sem causar dependência de estado induzido pelo succinato, também é encontrado com a glicose (Kopf et al., 1993), fisostigmina ou oxotremorina (Baratti & Kopf, 1996) e com a fluoxetina (Arenas et al 2006).

Quando injetado diretamente no hipocampo, o succinato (0,21 nmol) mostrou efeito facilitatório sobre a memória contextual, não apresentando nenhum efeito sobre o medo condicionado ao tom, e também teve este efeito revertido pelo MK-801 injetado intrahipocampalmente. Esse resultado corrobora com o anterior sugerindo um envolvimento do sistema glutamatérgico no efeito do succinato sobre a memória contextual.

Tanto a administração sistêmica como intra-hipocampal do succinato apresentaram uma curva dose-efeito em U invertido sobre o medo condicionado contextual, demonstrando o efeito bifásico do succinato sobre a memória. O efeito bifásico do succinato também tem sido descrito para o comportamento ansiolítico em camundongos (Chen et al., 2003). No estudo de Chen e colaboradores (2003) a administração, por via oral, de succinato aumenta a percentagem de entradas nos

braços abertos do labirinto em cruz elevada de uma maneira bifásica. O efeito bifásico do succinato também tem sido descrito para o aumento do potencial pós sináptico excitatório de campo de hipocampo de ratos (Roehrs et al., 2004). Além disso, a administração intracerebroventricular (i.c.v.) de succinato diminui a atividade exploratória e aumenta a lipoperoxidação e a carbonilação protéica em camundongos de maneira bifásica (Sinhorin et al., 2005).

O hipocampo é uma região do SNC que está envolvida com a aquisição e a consolidação de memória explícitas que em animais pode ser examinada utilizando paradigma contextual (Anagnostaras et al., 2001; Murchison et al., 2004), ou aprendizado espacial (Morris et al., 2003; Murchison et al., 2004). Vários sistemas de neurotransmissores influenciam as funções do hipocampo, incluindo o sistema glutamatérgico e noradrenérgico. O bloqueio dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos, com propranolol, no hipocampo piora a memória na tarefa de medo condicionado contextual e no labirinto aquático (Murchison et al., 2004).

No presente estudo a administração de succinato não alterou a atividade motora e nem exploratória, que foram medidas pelo número de cruzamentos e de respostas de levantar dos ratos no campo aberto. Da mesma maneira a administração de succinato não alterou a imobilidade ao novo contexto. Isto indica que o aumento da imobilidade dos animais induzido pelo succinato não foi causado por efeitos inespecíficos do succinato sobre a atividade locomotora e exploratória. Por outro lado, Sinhorin e colaboradores (2005) reportaram que ocorre diminuição na atividade locomotora dos camundongos após a administração i.c.v. de succinato. Os resultados, aparentemente contraditórios, sobre a atividade locomotora encontrados no presente estudo podem ser

devidos as diferentes vias de administração do succinato e a espécie animal usada nos dois estudos.

Em resumo, no presente estudo nós descrevemos que a administração sistêmica e intra-hipocampal de succinato melhorou a memória da tarefa de medo condicionado contextual em ratos. Esta melhora da memória foi revertida por MK-801 e por propranolol, indicando que os receptores NMDA e o sistema adrenérgico estão envolvidos neste efeito do succinato. A melhora da memória induzida pelo succinato não é dependente de estado uma vez que a injeção pré-teste de succinato não reverteu a melhora da memória induzida pela administração pós-treino de succinato.

---

## **7. CONCLUSÕES**

Com base em nossos resultados obtivemos as seguintes conclusões:

- A administração intraperitoneal imediatamente após o treino de succinato melhorou de maneira bifásica, a memória na tarefa de medo condicionado contextual, não tendo efeito sobre o medo condicionado ao tom. Esse efeito facilitador sobre o medo condicionado contextual foi revertido pela administração de MK-801 e propranolol.
  
- A administração intra-hipocampal imediatamente após o treino de succinato melhorou de uma maneira bifásica, a memória na tarefa de medo condicionado contextual, não tendo efeito sobre o medo condicionado ao tom. Esse efeito facilitador sobre o medo condicionado contextual foi revertido pela administração de MK-801.
  
- O efeito facilitador induzido pela administração intraperitoneal de succinato sobre a memória de medo condicionado contextual não envolve dependência de estado.

---

## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ABEL, T.; KANDEL, E. Positive and negative regulatory mechanisms that mediate long-term memory storage. **Brain Res Rev.**, **26**: 360-378, 1998.
- ABEL, T.; LATTAL, M. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. **Curr Opin Neurobiol.**, **11**: 180–187, 2001.
- ALBRIGHT, T.D.; KANDEL, E.R.; POSNER, M.I. Cognitive neuroscience. **Curr Opin Neurobiol.**, **10**: 612-624, 2000.
- ALEXI, T.; HUGHES, P.E.; FAULL, R.L.M.; WILLIAMS, C.E. 3-nitropropionic acid's lethal triplet: cooperative pathways of neurodegeneration. **Neuroreport**, **9**: 59-64, 1998.
- ANAGNOSTARAS, S.G.; GALE, G.D.; FANSELOW, M.S. Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances. **Hippocampus**, **11**: 8-17, 2001.
- ARENAS, M.C.; VINADER-CAEROLS, C.; MONLEÓN, S.; MARTOS, A.J.; EVERSS, E.; FERRERANO, A.; PARRA, A. Are the effects of the antidepressants amitriptyline, maprotiline, and fluoxetine on inhibitory avoidance state-dependent? **Behav Brain Rev.**, **166**: 150-158, 2006.
- ARKHIPOV, V.I. Memory dissociation: the approach to the study of retrieval processes. **Behav Brain Res.**, **106**: 39–46, 1999.
- BARATTI, C.M.; KOPF, S.R. The post-training memory enhancement induced by physostigmine and oxotremorine in mice is not state-dependent. **Neurobiol Learn Mem.**, **65**: 121–124, 1996.
- BAUMBACH, L.; LEYSSAC, P.P.; SKINNER, S.L. Studies on rennin release from isolated superfused glomeruli: effects of temperature, area, ouabain and ethacrynic acid. **J Physiol. (Lond.)**, **258**: 243-256, 1976.
- BEAL, M.F. Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. **Trends Neurosci.**, **23**: 298-304, 2000.
- BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. **Neurociência: desvendando o sistema nervoso**. 2ª edição, Porto Alegre: Artmed Editora S.A., 2002.
- BERLESE, D.B.; SAUZEM, P.D.; CARATI, M.D.; GUERRA, G.P.; STIEGEMEIER, J.A.; MELLO, C.F.; RUBIN, M.A. Time-dependent modulation of inhibitory avoidance memory by spermidine in rats. **Neurobiol Learn Mem.**, **83**: 48-53, 2005.
- BLISS, T.V.P.; COLLINGRIDGE, G.L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, **361**, **6407**: 31–39, 1993.
- BOURGERON, T.; RUSTIN, P.; CHRETIEN, D.; BIRCH-MACHIN, M.; BOURGEOIS, M.; VIEGAS-PEQUIGNOT, E.; MUNNICH, A.; ROTIG, A. Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. **Nat Genet.**, **11**: 144-149, 1995.

- BROCKMANN, K.; BJORNSTAD, A.; DECHENT, P.; KORENKE, C.G.; SMEITINK, J.; TRIJBELS, J.M.F.; ATHANASSOPOULOS, S.; VILLAGRAN, R.; SKJELDAL, O.H.; WILICHOWSKI, E.; FRAHM, J.; HANEFELD, F. Succinate in dystrophic white matter: A proton magnetic resonance spectroscopy finding characteristic for complex II deficiency. **Ann Neurol.**, **52**: 38-46, 2002.
- CAMERA, K.; MELLO, C.F.; CERETTA, A.P.C.; RUBIN, M.A. Systemic administration of polyaminergic agents modulate fear conditioning in rats. **Psychopharmacology**, **192**: 457-464, 2007.
- 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. **Mol Brain Res.**, **76**: 36-46, 2000.
- CASTELLANO, C.; CESTARI, V.; CIAMEI, A.; PAVONE, F. MK-801 induced disruptions of one-inhibitory avoidance are potentiated by stress and reversed by nalaxone. **Nerobiol Learn Mem.**, **72**: 215-229, 1999.
- CESAR, M.; HAMPRECHT, B. Immunocytochemical examination of neural rat and mouse primary cultures using monoclonal antibodies raised against pyruvate carboxylase. **J Neurochem.**, **64**: 2312-2318, 1995.
- CHEN, S.W.; XIN, Q.; KONG, W.X.; MIN, L.; LI, J.F. Anxiolytic-like effect of succinic acid in mice. **Life Sci.**, **73**: 3257-3264, 2003.
- CHEN, X.Z.; SHAYAKUL, C.; BERGER, U.V.; TIAN, W.; HEDIGER, M.A. Characterization of a rat Na<sup>+</sup>-dicarboxylate cotransporter. **J Biol Chem.**, **273**: 20972-20981, 1998.
- CHOI, D.W.; ROTHMAN, S.M. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. **Ann Rev Neurosci.**, **13**: 171-182, 1990.
- CLAYTON, D.A.; BROWNING, M.D. Deficits in expression of the NR2B subunit in the hippocampus of aged Fisher 344 rats. **Neurobiol Aging.**, **22**: 165-168, 2001.
- COLES, C.J.; EDMONSON, D.E.; SINGER, T.P. Inactivation of succinate dehydrogenase by 3-nitropropionate. **J Biol Chem.**, **254**: 5161-5167, 1979.
- COLLINGRIDGE, G.L.; LESTER, R.A.J. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. **Pharmacol Rev.**, **40**: 143-210, 1989.
- COLLINGRIDGE, G.L.; SINGER, W. Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. **Trends Pharmacol Sci.**, **11**: 290-296, 1990.
- COSTA, V.C.I.; XAVIER, G.F. Atropine-induced, state-dependent learning for spatial information, but not for visual cues. **Behav Brain Res.**, **179**: 229-238, 2007.

- CURTIS, C.E.; D'ESPORTIVO, M. Persistent activity in the prefrontal cortex during working memory. **Trends Cong Sci.**, **7**: 415-423, 2003.
- DAOUDAL, G.; DEBANE, D. Long-term plasticity of intrinsic excitability: learning rules and mechanisms. **Learn Mem.**, **10**: 456-465, 2003.
- DEBIEC, J.; LEDOUX, J.E. Disruption of reconsolidation but not consolidation of auditory fear conditioning by noradrenergic blockade in the amygdala. **Neuroscience**, **129**: 267-272, 2004.
- DE MEIRLEIR, L. Defects of pyruvate metabolism and the Krebs cycle. **J Child Neurol.**, **17(3)**: S36-S33, 2002.
- DINGLELINE, R.; McBAIN, C.J.; McNAMARA, J.O. Excitatory amino acid receptors in epilepsy. **Trends Pharmacol Sci.**, **11**: 334-338, 1990.
- DITYATEV, A.E.; BOLSHAKOV, V. Amygdala, long-term potentiation, and fear conditioning. **Neuroscientist**, **11**: 75-88, 2005.
- DUTRA, J.C.; DUTRA-FILHO, C.; CARDOSO, S.E.C.; WANNMACHER, C.M.; SARKIS, J.J.; WAJNER, M. Inhibition of succinate dehydrogenase and beta-hydroxybutyrate dehydrogenase activities by methylmalonate in brain and liver of developing rats. **J Inherit Metab Dis.**, **16**: 147-153, 1993.
- ERECINSKA, M.; NELSON, D. Effects of 3-nitropropionic acid on synaptosomal energy and transmitter metabolism: relevance to degenerative brain diseases. **J Neurochem.**, **63**: 1033-1041, 1994.
- ERICKSON, E.J.; WATTS, K.D.; PARENT, M.B. Septal co-infusions of glucose with a GABA<sub>B</sub> agonist impair memory. **Neurobiol Learn Mem.**, **85**: 66-70, 2006.
- FENDT, M.; FASELOW, M.S. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. **Neurosci Biobehav Rev.**, **23**: 743-760, 1999.
- FENTON, W.A.; ROSENBERG, L.E. Disorders of propionate and methylmalonate metabolism, In: *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, SCRIVER, C.R.; BEAUDET, A.L.; SLY, W.S.; VALLE, D. Ed. 7<sup>a</sup> New York, **McGraw-Hill**, 1423-1449, 1995.
- FIGHERA, M.R.; QUEIROZ, C.M.; STRACKE, M.P.; NIN BAUER, M.C.; GONZÁLEZ-RODRIGUEZ, L.L.; FRUSSA-FILHO, R.; WAJNER, M.; MELLO, C.F. Ascorbic acid and alpha-tocopherol attenuate methylmalonate acid-induced convulsions. **Neuroreport**, **10**: 2039-2043, 1999.

- FLECK, J.; RIBEIRO, M.C.P.; SCHNEIDER, C.M.; SINHORIN, V.D.G.; RUBIN, M.A.; MELLO, C.F. Intrastratial malonate administration induces convulsive behavior in rats. **J Inherit Met Dis.**, **27**: 211-219, 2004.
- FLOOD, J.F.; BAKER, M.L.; DAVIS, J.L. Modulation of memory processing by gutami acid receptor agonist and antagonists. **Brain Rev.**, **521**: 197-202, 1990.
- GALLAGHER, M.; KAPP, B.S., DRISCOLL, P.A. Memory formation: evidence for a specific neurochemical system in the amygdale. **Science** **198**: 423-425, 1977.
- GILBERT, M.E.; LASLEY, S.M. Long-term consequences of developmental exposure to lead or polychlorinated biphenyls: synaptic transmission and plasticity in the rodent CNS. **Environ Toxicol Pharmacol.**, **12**: 105–117, 2002.
- GREENAMYRE, J.T.; PENNEY, J.B.; D'AMATO, C.J.; YOUNG, A.B. Dementia of the Alzheimer's type: changes in hippocampal L-[3H]glutamate binding. **J Neurochem.**, **48**: 543-551, 1987.
- GREENE, G.G.; GREENAMYRE, J.T. Characterization of the excitotoxic potential of the reversible succinate dehydrogenase inhibitor malonate. **J Neurochem.**, **64**: 430-436, 1995.
- HAAN, E.A.; SCHOLEM, R.D.; CROLL, H.B.; BROWN, G.K. Malonyl coenzyme A descaboxilase deficiency. Clinical and biochemical findings in a second chid with a more severe enzyme defect. **Eur J Pediatr.**, **144**: 567-570, 1986.
- HARROD, S.B.; FLINT, R.W.; RICCIO, D.C. MK-801 induced retrieval, but not acquisition, deficits for passive avoidance conditioning. **Pharmacol Biochem Behav.**, **69**: 585–593, 2001.
- HASSEL, B.; SONNEWALD, U. Selective inhibition of the tricarboxylic acid cycle of the GABAergic neurons wiyh 3-nitropropionic acid in vivo. **J Neurochem.**, **65**: 1184-1191, 1995.
- HATFIELD, T.; MCGAUGH, J.L. Norepinephine infused into the basolateral amygdale posttraining enhances retention in a spatial water maze task. **Neurobiol Learn Mem.**, **71**: 232-239, 1999.
- HE, W.; MIAO, F.J.P.; LIN, D.C.H; SCHWANDNER, R.T.; WANG, Z.; GAO, J.; CHEN, J.L.; TIAN, H.; LING, L. Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors. **Nature**, **429**: 188-193, 2004.
- HOLLMANN, M.; HEINEMANN, S. Cloned glutamate receptor. **Annu Rev Neurosci.**, **17**: 31-108, 1994.
- HYND, M.R.; SCOTT, H.L.; DODD, P.R. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. **Neurochem Int.**, **45**: 583-595, 2004.

- INOUE, K.; ZHUANG, L.; GANAPATHY, V. Human Na<sup>+</sup>-coupled citrate transporter: primary structure, genomic organization, and transport function. **Biochem Biophys Res Commun.**, **299**: 465-471, 2002a.
- INOUE, K.; FREI, Y.J.; ZHUANG, L.; GOPAL, E.; MIYAUCHI, S.; GANAPATHY, V. Functional features and genomic organization of mouse NaCT, a sodium-coupled transporter for tricarboxylic acid cycle intermediates. **Biochem J.**, **378**: 949-957, 2004.
- INOUE, K.; ZHUANG, L.; MADDIX, D.M.; SMITH, S.B.; GANAPATHY, V. Structure, function, and expression pattern of a novel sodium-coupled citrate transporter (NaCT) cloned from mammalian brain. **J Biol Chem.**, **277**: 39469-39476, 2002b.
- IZQUIERDO I. Pharmacological evidence for a role of long-term potentiation in memory. **FASEB J.**, **8**:1139-1145, 1994.
- IZQUIERDO, I. Endogenous state dependency: Memory depends on the relation between the neurohumoral and hormonal states present after training and the time of testing. In G. Lynch, J.L. McGaugh, & N.M. Weinberger (Eds), **Neurobiology of learning and memory** (pp 333–350) New York: Guilford Press, 1984.
- IZQUIERDO, I. **Memória**. Artmed Editora S.A., 2002.
- IZQUIERDO, I. Role of NMDA receptors in memory. **Trends Pharmacol Sci.**, **12**: 128–129, 1991.
- 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.
- IZQUIERDO, I.; BEVILAQUA, L.R.M.; ROSSATO, J.I.; BONINI, J.S.; MEDINA, J.H.; CAMMAROTA, M. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. **Trends neurosci.**, **29**: 496–505, 2006.
- IZQUIERDO, I.; DA CUNHA, C.; ROSAT, R.; JERUSALINSKY, D.; FERREIRA, M.D.C.; MEDINA, J.H. Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. **Behav Neural Biol.**, **58**: 16-26, 1992.
- IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. The biochemistry of memory and its regulation by hormones and neuromodulators. **Psychobiology** **25**: 1–11, 1997.
- IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Correlation between the pharmacology of Long-term potentiation and the pharmacology of memory. **Neurobiol Learn Mem.**, **63**: 19–32, 1995.
- IZQUIERDO, I. **Arte de Esquecer: Cérebro, Memória e Esquecimento**. Viera & Lent, 2004.
- JACKSON, A.; KOEK, W.; COLPAERT, F.C. NMDA antagonist make learning and recall state-dependent. **Behav Pharmacol.**, **3**: 415–421, 1992.

- KANDEL, E.R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. **Science**, **294**: 1030-1038, 2001.
- KEKUDA, R.; WANG, H.; HUANG, W.; PAJOR, A.M.; LEIBACH, F.H.; DEVOE, L.D.; PRASAD, P.D.; GANAPATHY, V. Primary structure and functional characteristics of a mammalian sodium-coupled high affinity dicarboxylate transporter. **J Biol Chem.**, **274**: 3422-3429, 1999.
- KIM, J.J.; FANSELOW, M.S. Modality-specific retrograde amnesia of fear. **Science**, **256**: 675-677, 1992.
- KIM, J.J.; JUNG, M.W. Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: A critical review. **Neurosci Biobehav Rev.**, **30**: 188-2002, 2006.
- KOPF, S.R.; OPEZZO, J.W.; BARATTI, C.M. Glucose enhancement of memory is not state-dependent. **Behav Neural Biol.**, **60**: 192-195, 1993.
- KUHAR, M.J.; MINNEMAN, K.; MULY, E.C. Catecholamines. **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects**. American Society for Neurochemistry, 2006.
- JI, J.Z.; WANG, X.M. LI, B.M. Deficit in long-term contextual fear memory induced by blockade of beta-adrenoreceptors in hippocampal CA1 region. **Eur J Neurosci.**, **17**: 1947-1952, 2003a.
- JI, J.Z.; ZHANG, X.H., LI, B.M. Deficient spatial memory induced by blockade of beta-adrenoreceptors in the hippocampal CA1 region. **Behav Neurosci.**, **117**: 1378-1384, 2003b.
- LEDOUX, J.E. Emotion circuits in the brain. **Annu Rev Neurosci.**, **23**: 155-184, 2000.
- LEES, G.; JONES, E.G. Expressive gene Record memories. **Neurobiol Dis.**, **7**: 533-536, 2000.
- LENT, R. **Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociências**. São Paulo: Editora Athenou, 2004.
- LIMA, M.N.M.; LARANJA, D.C.; BROMBERG, E.; ROESLER, R., SCHRÖDER, N. Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impair object recognition memory in rats. **Behav Brain Res.**, **156**: 139-143, 2005.
- MACPHEE, G.B.; LOGAN, R.W.; MITCHELL, J.S.; HOWELLS, D.W.; TSOTSIS, E.; THORBURN, D.R. Malonyl coenzyme A decarboxylase deficiency. **Arch Dis Child.**, **69**: 433-436, 1993.
- MAREN, S. Building and Burying Fear Memories in the Brain. **Neuroscientists**, **11**: 89-99, 2005b.
- MAREN, S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. **Annu Rev Neurosci.**, **24**: 897-931, 2001.
- MAREN, S. Synaptic mechanisms of associative memory in the amygdala. **Neuron**, **47(6)**: 783-786, 2005a.

- MAREN, S.; AHARONOV, G.; FANSELOW, M.S. Neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats. **Behav Brain Res.**, **88**: 261-274, 1997.
- MARISCO, P.C.; RIBEIRO, M.C.P.; BONINI, J.S.; LIMA, T.T.F.; MANN, K.C.; BRENNER, G.M.; DUTRA-FILHO, C.S.; MELLO, C.F. Ammonia potentiates methylmalonic acid-induced convulsions and TBARS production. **Exp Neurol.**, **182**: 455-460, 2003.
- MARKOVICH, D.; MURER, H. The SLC 13 gene family of sodium sulphate/carboxylate cotransporters. **Pflugers Arch Eur J Physiol.**, **447**: 594-602, 2004.
- MAYER, M.L.; WESTBROOK, G.L. Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. **J Physiol.**, **394**: 501-527, 1987.
- MAYFORD, M.; KANDEL, E.R. Genetic approaches to memory storage. **Trends Genet.**, **15**: 463-470, 1999.
- MCGAUGH, J.L. Neuromodulatory systems and the regulation of memory storage. In L.R.Squire and N.Butters (Eds), **Neuropsychology of memory** (pp. 386–401). New York: Guildford Press, 1992.
- MCGAUGH, J.L. Memory: a century of consolidation. **Science**, **287**: 248-251, 2000.
- MCGAUGH, J.L. Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective. **Trends Neurosci.**, **25**: 456–461, 2002.
- MCGAUGH, J.L.; IZQUIERDO, I. The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. **Trends Pharmacol Sci.**, **21**: 208–210, 2000.
- MELLO, C.F.; BEGNINI, J.; JIMÉNEZ-BERNAL, R.E.; RUBIN, M.A.; DE BASTIANI, J.; DA COSTA, E.J.M.; WAJNER, M. Intrastratial methylmalonic administration induces rotational behavior and convulsions through glutamatergic mechanisms. **Brain Res.**, **721**: 120-125, 1996.
- MESSAN, C.A.; GREENE, J.G.; GREENAMYRE, T.; ROBINSON, M.B. Intrastratial injections of the succinate dehydrogenase inhibitor, malonate, cause a rise in extracellular amino acids that is blocked by MK-801. **Brain Res.**, **684**: 221-224, 1995.
- MORRIS, R.G.; ANDERSON, E.; LYNCH, G.S.; BAUDRY, M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by a N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. **Nature**, **319**: 774-776, 1986.
- MORRIS, R.G.; MOSER, E.I.; RIEDEL, G.; MARTIN, S.J.; SANDIN, J.; DAY, M.; O'CARROLL, C. Elements of a neurobiological theory of the hippocampus: the role of activity-dependent synaptic plasticity in memory. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.**, **358**: 773-786, 2003.
- MURCHISON, C.F.; ZHANG, X.Y.; ZHANG, W.P.; OUYANG, M.; LEE, A.; THOMAS, S.A. A distinct role for norepinephrine in memory retrieval. **Cell**, **117**: 131-143, 2004.

- O'REILLY, R.C.; RUDY, J.W. Conjunctive representations in learning and memory: principles of cortical and hippocampal function. **Psychol Rev.**, **108**: 311-345, 2001.
- OKUN, J.C.; HOESTER, F.; FARKAS, L.M.; FEYH, P.; HINZ, A.; SAUER, S.; HOFFMAN, G.F.; UNSICKER, K.; MAYATEPEK, E.; KOLKER, S. Neurodegeneration in methylmalonic aciduria involves inhibition of complex II and the tricarboxylic acid cycle, and synergistically acting excitotoxicity. **J Biol Chem.**, **277**: 14674-14680, 2002.
- OLNEY, J. Excitotoxic amino acids and neuropsychiatric disorders. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.**, **30**: 47-71, 1990.
- OVERTON, D.A. Experimental methods for the study of state-dependent learning. **Fed Proc.**, **33**: 1800-1813, 1974.
- OZAND, P.T.; NYHAN, W.L.; AQEEL, A.A.; CHRISTONOMIDOULOU, J. Malonic aciduria. **Brain Dev.**, **16**: 7-11, 1994.
- OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Prog Neurobiol.**, **54**, **5**: 581-618, 1998.
- PAJOR, A.M. Molecular properties of sodium/dicarboxylate cotransporters. **J Membr Biol.**, **175**: 1-8, 2000.
- PAJOR, A.M. Sequence and functional characterization of renal sodium/dicarboxylate cotransporters. **J Biol Chem.**, **270**: 5779-5785, 1995.
- PAJOR, A.M. Sodium-coupled transporters for Krebs cycle intermediates. **Annu Rev Physiol.**, **61**: 663-682, 1999.
- PAJOR, A.M.; GANGULA, R.; YAO, X. Cloning and functional characterization of a high-affinity Na<sup>+</sup>/dicarboxylate cotransporter from mouse brain. **Am J Physiol Cell Physiol.**, **280**: C1215-C1223, 2001.
- PETROFF, O.A.C.; OGINO, T.; ALGER, J.R. High-resolution proton magnetic resonance spectroscopy of rabbit brain: regional metabolite levels and postmortem changes. **J Neurochem.**, **51**: 163-171, 1988.
- PHILLIPS, R.G.; LEDOUX, J.E. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cues and context fear conditioning. **Behav Neurosci.**, **106**: 274-285, 1992.
- PLATENIK, J.; KURAMOTO, N.; YONEDA, Y. Molecular mechanisms associated with long-term consolidation of the NMDA signals. **Life Sci.**, **67**: 335-364, 2000.
- PRYBYLOWSKI, K.; WENTHOLD, R.J. N-methyl-D-aspartate receptors: subunit assembly and trafficking to the synapse. **J Biol Chem.**, **279**: 9673-9676, 2004.
- RAHMAN, S.; BROWN, R.M.; CHONG, W.K.; WILSON, C.J.; BROWN, G.K. A SURF1 gene mutation presenting as isolated leukodystrophy. **Ann Neurol.**, **49**: 797-800, 2001.

- RANGANATH, C.; BLUMENFELD, R.S. Doubts about double dissociations between short- and long-term memory. **Trends Cogn Sci.**, **9**: 374-390, 2005.
- RANSON, R.W.; STEC, N.I. Cooperative modulation of [<sup>3</sup>H]MK-801 binding to the *N*-methyl-D-aspartate receptor-ion channel complex by L-glutamate, glycine and polyamines. **J Neurochem.**, **51**: 830-836, 1988.
- REICHMANN, H.; ANGELINI, C. Single muscle fibre analyses in 2 brothers with succinate dehydrogenase deficiency. **Eur Neurol.**, **34**: 95-98, 1994.
- RIEDEL, G.; PLATT, B.; MICHEAU, J. Glutamate receptor function in learning and memory. **Behav Brain Res.**, **18**: 1-47, 2003.
- ROEHRS, C.; GARRIDO-SANABRIA, E.R.; DA SILVA, A.C.; FARIA, L.C.; SINHORIN, V.D.G.; MARQUES, R.H.; PRIEL, M.R.; RUBIN, M.A.; CAVALHEIRO, E.A.; MELLO, C.F. Succinate increases neuronal post-synaptic excitatory potentials in vitro and induces convulsive behavior through *N*-Methyl-D-Aspartate-mediated mechanisms. **Neuroscience**, **125**: 965-971, 2004.
- ROESLER, R.; REOLON, G.K.; LUFT, T.; MARTINS, M.R.; SCHRÖDER, N.; VIANNA, M.R.M.; QUEVEDO, J. NMDA receptors mediate consolidation of contextual memory in the hippocampus after context preexposure. **Neurochem Res.**, **30**: 1407-1411, 2005.
- ROESLER, R.; VIANNA, M.R.M.; DE-PARIS, F.; QUEVEDO, J.; WALZ, R. Infusions of AP5 into the basolateral amygdala impair the formation, but not the expression, of step-down inhibitory avoidance. **Braz J Med Biol Res.**, **33**: 829-834, 2000.
- ROYES, L.F.F.; FIGHERA, M.R.; FURIAN, A.F.; OLIVEIRA, M.S.; DA SILVA, L.G.M.; 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.; BERLESE, D.B.; STIEGEMEIER, J.A.; VOLKWEIS, M.A.; OLIVEIRA, D.M.; dos SANTOS, T.L.; FENILI, A.C.; MELLO, C.F. Intra-amygdala administration of polyamines modulates fear conditioning in rats. **J Neurosc.**, **24(9)**: 2328-2334, 2004.
- RUBIN, M.A.; JURACH, A.; ZANOLLA, G.R.; BOEMO, R.L.; SOUZA, D.O.; MELLO, C.F. Intra-hippocampal GMP administration improves inhibitory avoidance performance through GABAergic and glutamatergic mechanisms in rats. **Neuroreport.**, **8**: 3713-3716, 1997.
- RUSTIN, P.; LEBIDOIS, J.; CHRETIEN, D.; BOURGERON, T.; PIECHAUD, J.F.; ROTIG, A.; SIDI, D.; MUNNICH, A. The investigation of respiratory chain disorders in heart using endomyocardial biopsies. **J Inherited Metab Dis.**, **16**: 541-544, 1993.
- SALINAS, J.A.; INTROINI-COLLISON, I.B.; DALMAZ, C.; MCGAUGH, J.L. Posttraining intra-amygdala infusion of oxotremorine and propranolol modulate storage of memory for reduction in reward magnitude. **Neurobiol Learn Mem.**, **68**: 51-59, 1997.

- SANDER, A.P.; CURRIE, W.D.; WOODHALL, B. Protection of brain metabolism with glutathione, glutamate,  $\gamma$ -aminobutyrate and succinate. **Proc Soc Exp Biol Med.**, **130**: 1021-1027, 1969.
- SANDERS, M.J.; FANSELOW, M.S. Pre-training prevents context fear conditioning deficits produced by hippocampal NMDA receptor blockade. **Neurobiol Learn Mem.**, **80**: 123-129, 2003.
- SANDERS, M.J.; WILTGEN, B.J.; FANSELOW, M.S. The place of the hippocampus in fear conditioning. **Eur J Pharmacol.**, **463**: 217-223, 2003.
- SCATTON, B. The NMDA receptor complex. **Fundam Clin Pharmacol.**, **7**: 389-400, 1993.
- SCHAFER, G.E.; NADER, K.; BLAIR, H.T.; LeDOUX, J.E. Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning: a cellular and molecular perspective. **Trends Neurosci.**, **24**: 540-546, 2001.
- SHANK, R.P.; BENNETT, G.S.; FREYTAG, S.O.; CAMPBELL, G.L. Pyruvate carboxylase: an astrocyte-specific enzyme implicated in the replenishment of amino neurotransmitter pools. **Brain Res.**, **329**: 364-367, 1985.
- SHULZ, D.E.; SOSNIK, R.; EGO, V.; HAIDARLIU, S.; AHISSAR, E. A neuronal analogue of state-dependent learning. **Nature**, **403**: 549-553, 2000.
- SIGURDSSON, T.; DOYÈRE, V.; CAIN, C.K.; LeDOUX, J.E. Long-term potentiation in the amygdala: A cellular mechanism of fear learning and memory. **Neuropharmacology**, **52**: 215-227, 2006.
- SINHORIN, V.D.G.; ROEHRS, C.; PASIN, J.S.M.; BELLÉ, N.A.V.; RUBIN, M.A.; MELLO, C.F. Succinate causes oxidative damage through *N*-methyl-D-aspartate-mediated mechanisms. **Brain Res.**, **1051**: 66-71, 2005.
- SQUIRE, L.R.; KANDEL, E.R. **Memória: da mente às moléculas**, Porto Alegre, Artmed Editora S.A., 2003.
- SRIPADA, S.; GAYTAN, O.; SWANN, A.; DAFNY, N. The role of MK-801 in sensitization to stimulants. **Brain Res Rev.**, **35**: 97-114, 2001.
- SUGIMOTO, J.; SHIMOHIRA, M.; OSAWA, Y.; MATSUBARA, M.; YAMAMOTO, H.; GOTO, Y.; NONAKA, I. A patient with mitochondrial myopathy associated with isolated succinate dehydrogenase deficiency. **Brain Dev.**, **22**: 158-162, 2000.
- SZE, C.; BI, H.; KLEINSCHMIDT-DEMASTERS, B.K.; FILLEY, C.M.; MARTIN, L.J. *N*-Methyl-D-aspartate receptor subunit proteins and their phosphorylation status are altered selectively in Alzheimer's disease. **J Neurol Sci.**, **182**: 151-9, 2001.
- TILLAKARATNE, N.J.K.; MEDINA-KAUWE, L.; GIBSON, K.K. Gama-aminobutyric acid (GABA) metabolism in mammalian neural and non-neural tissues. **Comp Biochem Physiol.**, **112(A)**: 247-263, 1995.

- TOYOSHIMA, S.; WATANABE, F.; SAIDO, H.; MIYATAKE, K.; NAKANO, Y. Methylmalonic acid inhibits respiration in rat liver mitochondria. **J Nutr.**, **25**: 2846-2850, 1995.
- ULAS, J.; BRUNNER, L.C.; GEDDER, J.W.; CHOE, W.; COTMAN, C.W. *N*-methyl-D-aspartate receptor complex in the hippocampus of elderly, normal individuals and those with Alzheimer's disease. **Neuroscience**, **49**: 45-61, 1992.
- URBANSKA, E.M.; BLASZCAK, P.; SARAN, T.; KLEINROK, Z.; TURSKI, W.A. Mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid evokes seizures in mice. **Eur J Pharmacol.**, **359**: 55-58, 1998.
- WAJNER, K.D.; DUTRA, J.C.; CARDOSO, S.E.; WANMACHER, C.M.D.; MOTTA, E.R. Effects of methylmalonate on in vitro lactate release and carbon dioxide production by brain of suckling rats. **J Inher Metab Dis.**, **15**: 92-96, 1992.
- WAJNER, M.; COELHO, J.C. Neurological dysfunction in methylmalonic acidemia is probably related to the inhibitory effect of methylmalonate on brains energy production. **J Inher Metab Dis.**, **20**: 761-768, 1997.
- WANG, H.; FEI, Y.J.; KEKUDA, R.; YANG-FENG, T.L.; DEVOE, L.D.; LEIBACH, F.H.; PRASAD, P.D.; GANAPATHY, V. Structure, function, and genomic organization of human Na<sup>+</sup>-dependent high-affinity dicarboxylate transporters. **Am J Physiol Cell Physiol.**, **278**: C1019-C1030, 2000.
- YAMAKURA, T.; SHIMOJI, K. Subunit- and site-specific pharmacology of the NMDA receptor channel. **Prog Neurobiol.**, **59**: 279-298, 1999.
- YODOYA, E.; WADA, M.; SHIMADA, A.; KATSUKAWA, H.; OKADA, N.; YAMAMOTO, A.; GANAPATHY, V.; FUJITA, T. Functional and molecular identification of sodium-coupled dicarboxylate transporters in rat primary cultured cerebrocortical astrocytes and neurons. **J Neurochem.**, **97**: 162-173, 2006.
- YOUNG, S.J.; BOHENEK, D.L.; FANSELOW, M.S. NMDA processes mediate anterograde amnesia of contextual fear conditioning induced by hippocampus damage: immunization against amnesia by context preexposure. **Behav Neurosci.**, **108**: 19-29, 1994.
- YU, A.C.; DREJER, J.; HERTZ, L.; SCHOUSBOE, A. Pyruvate carboxylase activity in primary cultures of astrocytes and neurons. **J Neurochem.**, **41**: 1484-1487, 1983.
- ZARRINDAST, M.R.; JAFARI, M.R.; AHMADI, S.; DJAHANGUIRI, B. Influence of central administration ATP-dependent K<sup>+</sup> channel on morphine state-dependent memory of passive avoidance. **Eur J Pharmacol.**, **487**: 143-148, 2004.
- ZARRINDAST, M.R.; KHODJASTEHFAR, E.; ORYAN, S.; TORKAMAN-BOUTORABI, A. Baclofen-impairment of memory retention in rats: possible interaction with adrenoceptor mechanism(s). **Eur J Pharmacol.**, **411**: 283-288, 2001.
- ZHANG, W.N.; BAST, T.; FELDON, J. the ventral hippocampus and fear conditioning in rats: different anterograde amnésias of fear after infusion of *N*-methyl-D-aspartate or its noncompetitive antagonist. **Behav Brain Res**, **126**: 159-174, 2001.