UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Ciências Biológicas - Bacharelado

Trabalho Acadêmico

Análise dos efeitos de dois derivados tiazolidínicos sobre a memória e ansiedade em camundongos

Cibeli Bastos Marques Campesato

Pelotas, 2013

CIBELI BASTOS MARQUES CAMPESATO

ANÁLISE DOS EFEITOS DE DOIS DERIVADOS TIAZOLIDÍNICOS SOBRE A MEMÓRIA E ANSIEDADE EM CAMUNDONGOS

Trabalho Acadêmico apresentado ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Adriana Lourenço da Silva

Pelotas, 2013

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

C195a Campesato, Cibeli Bastos Marques
Análise dos efeitos de dois derivados tiazolidínicos sobre a memória e ansiedade em camundongos / Cibeli Bastos Marques Campesato. – 38f. : fig. – Monografia (Conclusão de curso). Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2013. – Orientador Adriana Lourenço da Silva.

1.Biologia. 2.Compostos heterocíclicos. 3.Comportamento. 4.Esquiva inibitória. 5.Ocultar defensivo. 6.Roedores. 7.Camundongos. I.Silva, Adriana Lourenço da. II.Título.

CDD: 595.353

Banca Examinadora

Profª Drª Adriana Lourenço da Silva (Orientadora)

Profª Drª Giovana Duzzo Gamaro (Banca)

Profª Drª Lucielli Savegnago (Banca)

Prof Dr Wilson João Cunico Filho (Suplente)

Agradecimentos

Obrigada aos meus pais Tânia e Antônio, sem os quais eu não estaria aqui e um especial à minha irmã Andrieli que tanto aturou as lamentações sobre o trabalho e um mau humor constante, minha melhor amiga para todas as horas.

Quero agradecer em especial minha orientadora Profª Drª Adriana da Silva, que mesmo quando tudo que eu escrevi parecia sem sentido continuou a caminhada, acreditando e me auxiliando sempre. Obrigada as meninas do laboratório Thais Marten e Lucimar Pinto que me ensinaram e deram apoio, amigas que o trabalho proporcionou.

Meus agradecimentos ao Prof Wilson Cunico Filho que disponibilizou os compostos que foram objeto de estudo neste trabalho e à M.a Alice Kunzler que sintetizou os compostos para que o trabalho pudesse ser realizado.

Obrigada aos funcionários do Biotério Central da UFPEL que foram de grande ajuda e me apoiaram durante a experimentação, sou eternamente grata pela acolhida carinhosa e todos os favores prestados.

Um abraço aos amigos que seguiram comigo todo esse tempo mesmo que eu não tivesse tempo para uma visita, nunca deixaram de me dar força e apoio para seguir em frente. São novas irmãs que fui colhendo pelos anos afora, irmãs de afeto.

Agradeço aos mestres que tive na jornada acadêmica, que são muitos para nomear e esquecer um deles seria um erro grave, minha inspiração para seguir mesmo que as coisas não estivessem dando certo. Mais do que professores eles são exemplos de pessoas que acreditam e amam aquilo que fazem e me passaram essa lição importante para levar pra vida.

Meu carinho aos colegas que passaram pela minha vida durante o período de faculdade, gente que me fez aprender tanto e por quem tenho muita estima. O

chimarrão compartilhado nas aulas, o trabalho escrito na madrugada. Um sorriso oferecido na hora de apresentar um trabalho ou um abraço na hora do aperto. São memórias desses detalhes pequenos que mantém meu sorriso no rosto mesmo quando o nervosismo transborda e o medo do futuro embaça a visão.

Meu muito obrigada e um sorriso sincero para todos vocês, memórias felizes que farão minha velhice parecer mais doce e todas as dificuldades do percurso caírem em esquecimento.

Resumo

CAMPESATO, Cibeli Bastos Marques. **Análise dos efeitos de dois derivados tiazolidínicos sobre a memória e ansiedade em camundongos**. 2013. 38f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) Curso de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A memória é um recurso de armazenamento de informações no cérebro, muito estudada por interesses em ampliar e mante-la saudável mesmo durante o envelhecimento. Esse sistema de armazenamento envolve diversas regiões do cérebro, regiões efetoras, moduladoras e locais de neurogênese para armazenar informações novas. A ansiedade por sua vez, como disturbio crônico, tornou-se um dos transtornos mais prevalentes em pacientes de todas as idades e de classes econômicas diversas. Os malefícios gerados pelos transtornos de ansiedade incluem disfunções da memória além dos prejuízos fisiológicos e podem levar a distúrbios psicológicos graves, como a depressão maior ou a síndrome do pânico. Existe ainda o processo de envelhecimento e as disfunções cognitivas que o acompanham além de doenças neurodegenerativas, como o Mal de Alzheimer, que aumentam sua incidência com o crescimento da expectativa de vida. Os medicamentos disponíveis para tratamento do Mal de Alzheimer, entre outras doenças neurodegenerativas, apenas tentam reduzir a neurodegeneração, mas não há medicamentos para recuperar ou incrementar a função da memória ou as funções cognitivas que degeneraram. As tiazolidinonas são substâncias já conhecidas por diversas atividades biológicas em diferentes áreas de interesse, incluíndo atividade no sistema nervoso central e também como agonista colinérgico. Surgem assim como uma alternativa na busca de novos fármacos específicos para atenuar o déficit de memória e melhorar a função cognitiva, sejam causadas pela idade avançada ou por doenças neurodegenerativas. Foram pesquisadas duas substâncias da classe das tiazolidinonas AK13 e AK26 por meio de testes sobre a evocação da memória e sobre a ansiedade. Utilizando três diferentes doses e dois controles, foram efetuados testes em esquiva inibitória para a evocação de memórias de longa e de curta duração e o teste de ocultar defensivo, para mensurar os efeitos sobre a ansiedade. Com os testes na esquiva inibitória não foram obtidos resultados sobre a memória comparando aos controles. Já os testes de ocultar defensivo demonstraram atividade ansiolítica para ambas substâncias, comparadas aos controles. A substância AK13 obteve os melhores resultados ansiolíticos, sendo objeto de interesse para novos e diferentes testes em ansiedade e nas demais fases da memória, bem como a substância AK26. O interesse é confirmar a ausência de efeito sobre a memória, que é comum à maioria dos ansiolíticos.

Palavras-chave: Compostos heterocíclicos. Comportamento. Esquiva inibitória. Ocultar defensivo. Roedores.

Abstract

CAMPESATO, Cibeli Bastos Marques. **Analysis on effects over memory and anxiety in mice of two thiazolidine derivatives**. 2013. 38f. Monograph (Work of Course Conclusion) Biological Science Course. Pelotas Federal University, Pelotas.

Memory is a resource of information storage in the brain, much studied by interests in expanding and keep it healthy even during aging. This storage system involves several regions of the brain, modulating and effector regions, and also neurogenesis sites to store new information. Anxiety turn as chronic disturbance, became one of the most prevalent disorders in patients of all ages and from several economic classes. The harm caused by anxiety disorders include memory dysfunctions beyond the physiological damage and can lead to serious psychological disorders such as major depression or panic disorder. There is also the aging process and the cognitive dysfunction that accompanying it, beyond neurodegenerative diseases such as Alzheimer's, which increases their impact on life expectancy growth. The drugs available for treatment of Alzheimer's disease, among other neurodegenerative diseases, just try to reduce the neurodegeneration, but there is no medicines to recover or enhance the memory or the cognitive functions that already degenerate. The thiazolidinones substances are known by some biological activities in different areas of interest, including activity in the central nervous system as well as cholinergic agonist. They emerge as an alternative on the new drugs search, specific to attenuate memory deficits and to improve cognitive function, are it caused by old age or neurodegenerative diseases. There is two substances were investigated through tests on the evocation of memory and anxiety, called AK13 and AK26, that belong to the thiazolidinones class. Using three different doses and two controls, tests were performed on inhibitory avoidance for evoking both long and short term memories and the defensive hide test to measure the effects on anxiety. With the inhibitory avoidance tests no results were obtained, on memory compared to controls. The tests demonstrated anxiolytic activity, on the hide defensive, for both substances as compared to controls. The substance AK13 got the best anxiolytics results, what makes it an object of interest to new and different anxiety tests, as well as the substance AK26 for more tests on the remaining stages of the memory. The interesting is confirm the lack of memory effects, which is so common to most anxiolytics.

Keywords: Behavior. Heterocyclic compounds. Hide defensive test. Inibitory avoidance. Rodents.

Lista de Figuras

Figura 1- Identificação dos componentes do Sistema Límbico..... 18
Figura 2- Regulação dos sistemas neurobiológicos na consolidação da memória..... 21
Figura 3- Esquema geral das vias regulatórias do estresse agudo no cérebro. 23
Figura 4- Estrutura Geral de Tiazolidinona..... 26
Figura 5- Estrutura de AK13 (2-F) e AK26 (4-CH_3)..... 26
Figura 6- Efeito de AK26 sobre a memória de longa duração..... 31
Figura 7- Efeito de AK13 sobre a memória de longa duração..... 31
Figura 8- Efeito de AK26 sobre a memória de curta duração..... 32
Figura 9- Efeito de AK13 sobre a memória de curta duração..... 32
Figura 10- Efeito de AK26 sobre o ocultar defensivo..... 33
Figura 11- Efeito de AK13 sobre o ocultar defensivo..... 33

Lista de Abreviaturas

Dimetilsulfóxido – DMSO;
Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal – HPA;
Hormônio adenocorticotrófico – ACTH;
Hormônio corticóide – CRH;
Hormônio corticotrófico – Ach;
Lócus coeruleus-noradrenalina – LC-NE;
Núcleo leito da estria terminal – BST;
Núcleo paraventricular do hipotálamo – PVN;
Órgão Circumventricular – CVO;
Receptor Glicocorticóide – GR;
Receptor de Serotonina – 5HT1A
Sistema Nervoso Simpático – SNS;
Sistema Simpatoadrenomedular – SAM;

Sumário

1 Introdução 14

1.1 Memória 14

1.2 Ansiedade 15

1.3 Tiazolidinonas 16

1.4 Justificativa e Objetivo 16

2 Revisão de Literatura 18

2.1 Memória 18

2.1.1 Definição de memória 18

2.1.2 Formação da memória e os seus mecanismos 19

2.1.3 Classificação da memória 20

2.2 Ansiedade 22

2.2.1 Conceito de Ansiedade 22

2.2.2 Mecanismos reguladores e efetores da ansiedade 23

2.2.3 Ansiedade e a memória 25

2.2.4 Transtornos gerados pela ansiedade crônica 25

2.3 Tiazolidinonas 26

3 Materiais e Métodos 28

3.1 Obtenção dos compostos e camundongos 28

3.1.1 Memória: Esquiva inibitória 29

3.1.2 Ansiedade: Ocultar defensivo 30

3.1.3 Análise estatística 31

4 Resultados e Discussão 32

4.1 Memória de Longa duração 32

4.2 Memória de Curta duração 33
4.3 Ansiedade 33
4.4 Discussão 34
5 Conclusão 36
Referências 37
Apêndice A – Esquema do Teste de Esquiva inibitória 39

1 Introdução

1.1 Memória

As funções cognitivas a que denominamos memória são na verdade um conjunto de mecanismos diversos responsáveis pela aquisição, consolidação e evocação de informações. Podemos classificar a memória de variadas formas, levando em conta seus diferentes fatores como: o tipo de conteúdo, a função que exercem ou o tempo que permanecem armazenadas (IZQUIERDO, 2002).

No cérebro existem os neurônios do sistema colinérgico mediados pelo neurotransmissor acetilcolina, esse sistema esta presente em grande quantidade alcançando todas as partes do encéfalo sendo por isso auxiliar no processo de integração das diversas áreas do córtex. Mais ainda, outros sistemas, como o sistema dopaminérgico estão envolvidos nos processos da memória, nas funções motoras e motivacionais e na memorização. Deste modo, ambos os sistemas são importantes no processo de aprendizado e desempenham também papéis na atividade motora e nos estados de humor do indivíduo (ALMEIDA, 2006).

Uma hipótese colinérgica para a doença de Alzheimer associa o sistema colinérgico como mais importante no processo cognitivo, sendo esse o mais afetado no Mal de Alzeimer tardio ou típico. Para reversão de déficits cognitivos e melhora na qualidade de vida dos pacientes nos estágios mais avançados, busca-se principalmente restaurar esse sistema através de agonistas colinérgicos diretos e indiretos (BALASA et al., 2011; TERRY; BUCCAFUSCO, 2003).

1.2 Ansiedade

Ansiedade é uma experiência caracterizada por um estado de tensão, apreensão e desconforto que é percebido pelo organismo quando ocorre algum desequilíbrio homeostásico. A ansiedade pode ter causas fisiológicas ou ser originada de estímulos externos, geralmente apresentando reações fisiológicas específicas que podem ser mais ou menos intensas conforme o indivíduo (ALMEIDA, 2006; SHEARER, 2007)

O sistema gerador de respostas à ansiogênese tem função adaptativa de manuntenção da integridade do organismo, mas quando a exposição ao fator ansiogênico é crônica (repetição dos estímulos que seriam temporários) ou em excesso, seus efeitos tornam-se prejudiciais. Enquanto transtorno por cronicidade a ansiedade é recorrente e atinge a população como um todo, tendo maior prevalência dentre todos os demais transtornos de origem neurológica. Também é fácilmente diagnosticada e frequente na população mais jovem, com idade inferior a 18 anos (ALMEIDA, 2006; SHEARER, 2007; ULRICH-LAI, HERMAN, 2009).

Existem ainda diferentes níveis de ansiedade, diretamente relacionados com os níveis de alerta do indivíduo. Quando os níveis de ansiedade ultrapassam o alerta o indivíduo atinge seu ápice de desempenho cognitivo, mas ao ultrapassar esse ponto a capacidade cognitiva declina abruptamente. A ansiedade enquanto doença ou transtorno em desenvolvimento ocasiona sérios prejuisos para o indivíduo, como a diminuição no rendimento cognitivo, danos fisiológicos gerando doenças e prejuízo do convívio social (ALMEIDA, 2006; SHEARER, 2007).

Segundo Gamaro e colaboradores (1997) a adrenalina apresenta sua curva dose-resposta na forma de “u” invertido, onde baixas doses auxiliam no processo mnemônico e doses altas o atrapalham. Essas alterações são mediadas pela glicose sanguínea, também alterada durante os processos gerados pela ansiedade. Existe uma relação direta da adrenalina com a consolidação de memórias.

1.3 Tiazolidinonas

As substâncias denominadas tiazolidinonas apresentam uma estrutura heterocíclica com cinco membros contendo um átomo de enxofre, um átomo de nitrogênio e uma carbonila. Essas substâncias tem aplicações diversas, sendo usadas tanto na medicina com aplicação na agricultura, a exemplo: antirretroviral, anti-inflamatória, antibacteriana, anti-helmíntica, tuberculostática, antifúngica, anticâncer, anti-histamínica e inseticida (CUNICO; GOMES; VELLASCO, 2008; LIESEN et al., 2008; VERMA et al., 2008).

Também são conhecidos derivados tiazolidínicos que apresentam variadas ações no sistema nervoso central, como anticonvulsivante, antipsicótica, analgésica, hipnótica e anti-amnésica (VERMA et al., 2008). Esta classe de heterociclicos também foi estudada como agonista do receptor muscarínico 1 para o combate ao Mal de Alzheimer (CHANDRA et al., 2008).

1.4 Justificativa e Objetivo

A expectativa de vida dos humanos tem aumentado e com ela os problemas que a idade avançada traz consigo, dentre eles as doenças degenerativas evidenciadas no envelhecimento. Não existe no mercado um medicamento de ação pró-mnésica (incremento na memória) específica, o que existe são medicamentos capazes de reduzir alguns sintomas da perda de memória mas são incapazes de pausar a neurodegeneração. A evocação de curta duração é uma das primeiras fases perdida em indivíduos idosos, sendo progressiva até casos mais graves onde afeta lembranças de episódios da vida, como acontecimentos da infância, denominada evocação da memória de longa duração (ALMEIDA, 2006; IZQUIERDO, 2002).

A busca por novos medicamentos é importante devido a uma série de fatores, como a falta de seletividade das drogas, que levam aos efeitos colaterais tão indesejados. Assim, o refinamento dos medicamentos depende de uma busca contínua por novas drogas que mantenham a função mas que tenham poucos efeitos adversos (BALASA et al., 2011; TERRY; BUCCAFUSCO, 2003).

O objetivo do presente trabalho foi colaborar na elucidação dos efeitos de dois compostos de tiazolidinonas, AK13 e AK26, sobre a evocação da memória, bem como seus possíveis efeitos sobre a ansiedade.

2 Revisão de Literatura

2.1 Memória

2.1.1 Definição de memória

A memória é o que define um indivíduo e faz com que ele seja diferente de todos os demais pois ninguém passará exatamente pelas mesmas circunstâncias ou percebe um estímulo da mesma forma ou ainda recorda as mesmas experiências. Tudo isso vai variar conforme as experiências prévias e a condição daquele indivíduo no momento da aquisição e armazenamento da memória (DALMAZ; NETTO, 2004; IZQUIERDO, 2002).

Perceber estímulos externos ou internos e responde-los adequadamente requer uma rede de células capazes de reter essas situações. Quando há percepção de informações, sejam fisiológicas ou estímulos sensoriais e benéficas ou prejudiciais, elas são processadas gerando uma resposta do organismo, baseado no arsenal de informações já armazenadas. É necessário manter as respostas, adequadas ou não, para prever as ações futuras com maior sucesso. Através desse mecanismo que os grupos neuronais derivaram na estrutura complexa do sistema nervoso.

Manter respostas que sejam úteis ou que geram benefício e prazer, bem como identificar os estímulos potencialmente perigosos quer já tenham sido vivenciados ou que possam ser evitados é a principal função do hipocampo e do sistema límbico (Fig 1). Conectados diretamente ao córtex frontal que é a área de processamento, onde são feitas decisões e estabelecidas as respostas para os

estímulos, seja uma memória a ser retida ou uma ação a ser tomada imediatamente (DALMAZ; NETTO, 2004).

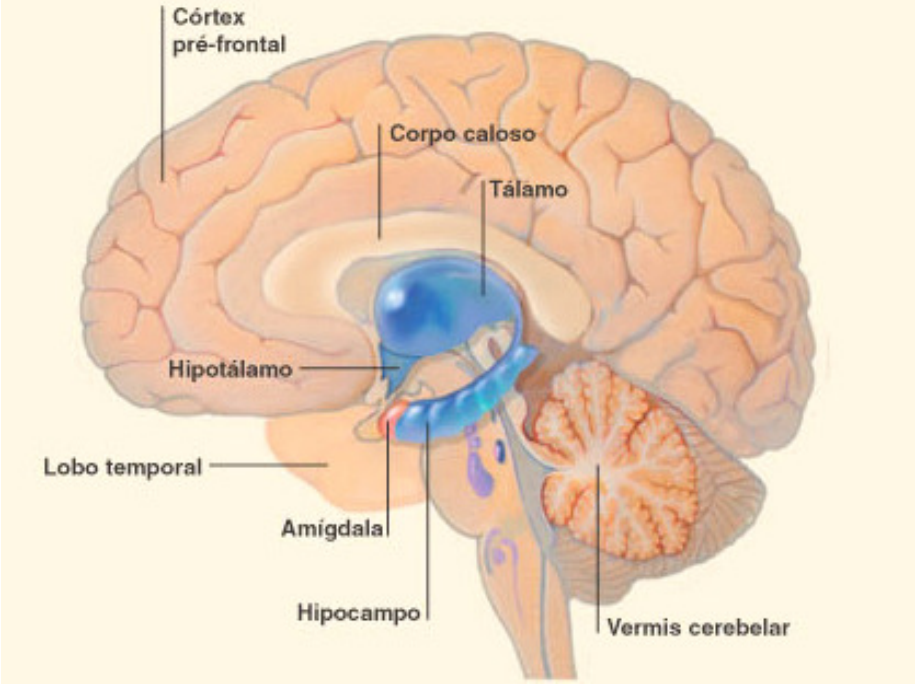


Figura 1: Identificação dos componentes do Sistema Límbico. Imagem retirada de: http://www.guia.heu.nom.br/sistema_limbico.htm

2.1.2 Formação da memória e os seus mecanismos

É reconhecido que a experiência é fator crucial para estabelecer a memória, logo é necessário que uma informação seja percebida pelo sistema nervoso, seja através dos sentidos, seja ela interna causada por algum desequilíbrio fisiológico. Se esta percepção estiver alterada a memória poderá ser influenciada.

Episódios emocionais são aqueles recordados com maior intensidade e detalhes, portanto a forma como o indivíduo reage diante do estímulo pode aumentar a capacidade de gerar memória sobre determinado evento. Sabe-se que a amigdala tem importante papel na regulação dos estados de humor e de alerta do indivíduo. A liberação de noradrenalina e ativação de β-adrenoceptor nos núcleos lateral e basal da amigdala e nucleo basal acessório logo após treinamento, em ratos e camundongos, provoca aumento na consolidação de memórias a longo prazo, bem como seus antagonistas geram o efeito oposto (ROOSENDAAL; MC EWEN; CHATTARJI, 2009).

Da mesma forma receptores GABAergicos presentes na amígdala quando são inibidos podem aumentar a consolidação de memórias e quando são ativados reduzi-la. Substâncias endocanabinódes são conhecidas por inibir as atividades GABAergicas, logo pode ser essa inibição nos núcleos lateral e basal da amigdala e núcleo basal acessório que geram um aumento na consolidação de memórias. A amigdala é considerada centro de processamento das emoções, onde são determinadas as memórias moduladas pelas sensações que provocam ao indivíduo, sendo um importante ponto de controle da ansiedade sobre a memória e sua consolidação (MC GAUGH, 2000; ROOSENDAAL; MC EWEN; CHATTARJI, 2009).

Segundo Izquierdo e Medina (1997) a modulação da memória durante a esquiva inibitória utiliza diferentes receptores para sua formação. As memórias recentes são moduladas localmente por sinapses GABAergicas, colinérgicas, noradrenérgicas e segundos mensageiros. Extrínsecamente são moduladas pela amígdala e pelo septo medial que lida com os componentes emocionais das memórias. A modulação de memórias tardias é baseada nos receptores dopamina-D_1, β-noradrenalina e 5HT1A (receptor serotonina) no hipocampo e vias dopaminérgicas, noradrenérgicas e serotoninérgicas.

Os fatores que afetam a memória estão genéticamente ligados aos ritmos circadiano dos animais, inclusive uma das teorias que explica a diferença nas memórias de longa duração e de curta duração se baseia nas oscilações da atividade fisiológica ao longo do tempo. Pesquisas recentes demonstram a expressão de genes que determinam o ritmo circadiano também aparecem nas regiões cerebrais responsáveis pelo aprendizado e memória, como a amígdala, o hipocampo e a área tegumentar ventral. Demonstram a importância da manutenção de períodos normais de sono e atividades diárias na formação da memória (GERSTNER et al., 2009)

2.1.3 Classificação da memória

A memória pode ser classificada segundo diferentes aspectos, como o tempo que permanece armazenada, sua função, forma de aquisição ou ainda se pode ser declarada ou não, como a memória motora (caminhar ou dirigir). Classificando-

a quanto ao tempo em que a informação permanece armazenada, consideramos memórias de curta e longa duração ou tempo determinado e tempo indeterminado de armazenamento. Cada uma utilizando mecanismos diferentes do cérebro, embora compartilhem as mesmas vias estruturais para armazenamento da informação (IZQUIERDO, 2002).

A memória de curta duração é requerida para aprendizado e funções motoras por exemplo, por ser rapidamente criada e rapidamente acessada. Já a memória de longa duração, bem como a consolidação de memórias levam tempo, para que seja possível determinar o que será recordado e o nível de "importância" daquela informação. Alguns hormônios relacionados a ansiedade, como os adrenais (adrenalina e hormônio glicocorticóide) quando liberados em maior quantidade tem seu papel para determinar a importância da informação modulando as áreas responsáveis pela memória (MC GAUGH, 2000).

Tanto a memória de curta duração quanto a de longa duração apresentam três fases distintas: a fase de aquisição, que transforma os estímulos sensoriais percebidos em informação; a fase de consolidação, onde a informação é armazenada por tempo indeterminado ou por espaço de tempo determinado; a fase de evocação, onde se percebe que ocorreu a memorização pelo resgate da informação requerida. Para consolidação das memórias de longa duração temos a média entre 3 a 6h e memórias que foram adquiridas a menos tempo serão consideradas de curta duração, podendo ser evocadas e consolidadadas como memória de longa duração (IZQUIERDO, 2002).

Conforme McGaugh, diferentes locais no cérebro processam as diferentes formas de memória sendo a amígdala responsável pela consolidação por ser capaz de regular os processos nessas regiões. A anfetamina aplicada na região dorsal do hipocampo aumenta memória espacial para plataformas ocultas, em ratos submetidos ao labirinto aquático. Já quando a mesma é aplicada na região do striatum aumenta apenas a memória para as plataformas que apresentam dicas/pistas visuais. Quando essa aplicação é feita na amígdala ambas as plataformas são melhor recordadas, ainda que os receptores na amigdala estejam bloqueados. Temos então que o hipocampo é a segunda parte essencial na modulação da consolidação das memórias, mas isso ocorre de forma simultânea com outras regiões, ver Fig.2 as influências na consolidação da memória (MC GAUGH, 2000).

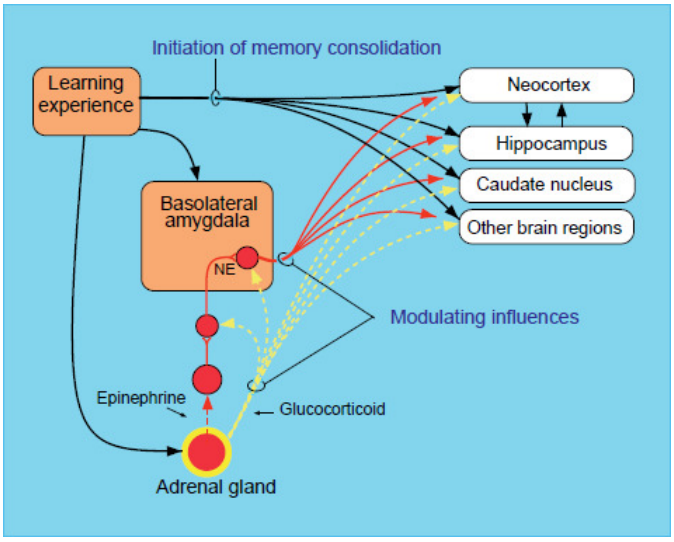


Figura 2: **Regulação dos sistemas neurobiológicos na consolidação da memória**. Experimentos ativando processos armazenamento celular dependente de tempo em variadas regiões cerebrais relacionadas nas diferentes formas de memória estão representados. Os experimentos também desencadearam a liberação de hormônios relacionados com a ansiedade advindos da região medular e córtex da adrenal e ativaram a liberação de noradrenalina no núcleo baso-lateral da amígdala, um importante efeito para permitir a modulação da consolidação. A amígdala modula a consolidação de memórias por influenciar a neuroplasticidade em outras regiões cerebrais.
(MC GAUGH, 2000)

2.2 Ansiedade

2.2.1 Conceito de Ansiedade

A ansiedade é gerada como uma resposta do organismo para qualquer perturbação na homeostase ou um desequilíbrio na fisiologia. Esse é um princípio básico que mantém o organismo alerta e em funcionamento perfeito, como para continuar acordado por exemplo de olhos abertos. Esse alerta funciona para cada estímulo externo, onde os sentidos captam uma situação de perigo ou o olfato percebe um predador espreitando; ou ainda um estímulo interno de origem fisiológica, por exemplo uma dor ou infecção. Os estímulos percebidos são processados pelas regiões da amígdala, sistema límbico e córtex pré-frontal que ativam sistemas efetores, o sistema locus coeruleus-norepinefrina ou o eixo hipotálamo-adrenal-pituitária (ROOSENDAAL; MCEWEN; CHATTARJI, 2009; MELLO et al., 2003).

2.2.2 Mecanismos reguladores e efetores da ansiedade

A resposta fisiológica frente situações que geram a ansiedade é formada por uma eficiente rede de sistemas neuronais e hormonais, visando manter a integridade do indivíduo. Envolvidos na resposta ansiogênica temos o hipotálamo ativando a liberação liberação do hormônio corticoide (CRH), liberador de corticotrofina e o sistema locus coeruleus-norepinefrina (LC-NE), bem como seus respectivos componentes periféricos respectivamente, o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e o sistema nervoso simpático (SNS). Esses últimos são os responsáveis pela ativação de regiões cerebrais, órgãos periféricos e funções fisiológicas a partir da liberação central. Como principais respostas para ativação conjunta desses sitemas ocorrem: aumento da atenção, da frequencia cardiaca e do metabolismo basal e interferencia nas funções neurológicas basais. Existe uma coesão de funções do eixo HPA e do sistema LC-NE, sem que percam sua independência (MELLO et al., 2003; ULRICH-LAI, HERMAN, 2009).

O sistema LC-NE opera como um sistema de emergência que reduz a atividade de funções básicas, como alimentação ou o sono, para então promover aumento de atividade do sistema autônomo periférico, não sendo contínuo com o SNS mas mesmo assim atuando como um conjunto. O SNS ativado responde com aumento da pressão arterial, da frequência cardíaca e disponibilidade de glicose sanguínea. Ambos sistemas interagem multidirecionalmente com outras regiões cerebrais, tais como: amigdala (envolivida nas respostas ao medo, ansiedade e na memória emocional), sistema dopaminérgico mesolímbico (prazer e sistema recompensa) e o córtex pré-frontal medial (modula a execução de comportamentos complexos e a flexibilidade afetiva). A resposta para ansiedade envolve processos neurais e hormonais diversos já citados e é possível observar uma diagramação desse circuito na Fig.3 (MELLO et al., 2003; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009);

O CRH é produzido no núcleo paraventricular do hipotálamo e apresenta dois receptores na região anterior da pituitária, resultando na liberação de hormônio adenocorticotrófico Esses receptores de CRH são reguladores mútuos onde o receptor tipo 1 ou receptor mineralocorticoide (MR), com alta afinidade mensageiro-receptor, funciona como gerador do sinais da ansiedade para funcionamenteo basal normal, já o receptor tipo 2 ou receptor glicocorticoide (GR)

funciona durante os picos de cortisol com efeito inibitório do eixo HPA. O ACTH liberado pela pituitária ativa receptores na glândula adrenal para a produção e liberação de hormônio glicocorticóide, o cortisol em humanos (MELLO et al., 2003).

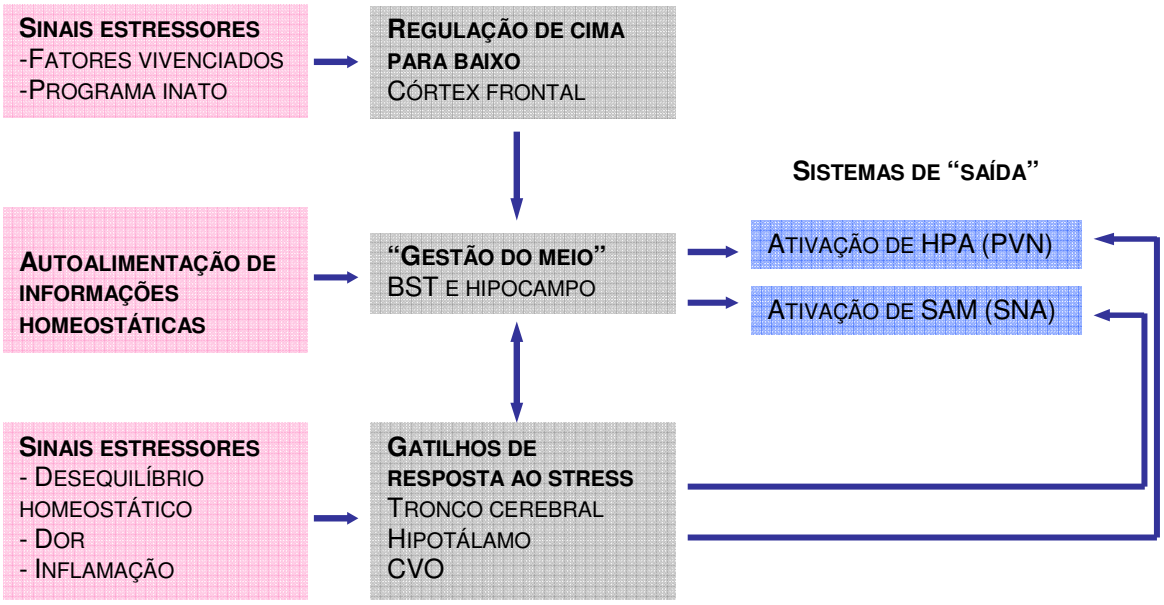


Figura 3. Esquema geral das vias regulatórias do stress agudo no cérebro. Os estressores ativam o tronco cerebral e/ou estruturas límbicas do córtex frontal. O tronco cerebral pode gerar respostas rápidas do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e do sistema nervoso autônomo (SNA) através de projeções diretas para os neurônios hipofisiotróficos no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) ou a neurônios nos gânglios do sistema autonomo (desencadeadores de resposta ao estresse). Em contrapartida, as regiões límbicas do córtex frontal não têm conexões diretas com o eixo HPA ou o SNA e, portanto, necessitam de intermediação sináptica antes de conseguir acessar neurônios autônomos ou neuroendócrina (top-down regulation). Uma grande quantidade destes neurônios mediadores estão localizados no núcleo hipotalâmico que também responde ao estado homeostático, proporcionando um mecanismo através do qual as informações límbicas descendentes podem ser moduladas de acordo com o estado fisiológico do animal ("Gestão do meio").
BST= núcleo leito da estria terminal; CVO= órgão circumventricular; SAM, sistema simpatoadrenomedular.

(Imagem traduzida de ULRICH-LAI, 2009)

Os prejuízos, quase sempre advindos, da liberação crônica de cortisol em excesso são : resistência a insulina e consequente aumento da gordura visceral, osteopenia e osteorporose, inibição da imunidade celular de linfócitos T e a supressão crônica do sistema dopaminérgico mesolímbico. Os efeitos desejados apenas para momentos críticos envolvem o aumento da função cardíaca, mobilização de nutrientes e glicose e a inibição do processo de crescimento/desenvolvimento e das funções reprodutivas, além de implicações

imunológicas. A resposta hormonal mediada pelos glicocorticóides na corrente sanguínea tem seus benefícios evolutivos evidenciados apenas por picos ocasionais em situações restritas onde é necessário um esforço de ação (MELLO et al., 2003).

Estudos em ratos e primatas demonstram que a cronicidade dessa resposta ansiogênica resulta uma exposição excessiva aos glicocorticóides os quais afetam o hipocampo negativamente, induzindo a regressão de processos dendríticos, inibindo a neurogênese, deixando os neurônios mais vulneráveis em situações prejudiciais (como: hipóxia/isquemia, tóxicos metabólicos, hipoglicemia e exposição aos radicais livres) e promove neurotoxicidade mesmo na ausência de situações prejudiciais (MELLO et al., 2003).

2.2.3 Ansiedade e a memória

Os hormônios corticóides liberados pela glândula adrenal são mediadores principais da ansiedade e também atingem de forma indireta a amigdala, aumentando os efeitos e ativação dos receptores de adrenalina. A amigdala tem papel chave na mediação dos efeitos da ansiedade na memória, tanto na consolidação como na evocação das mesmas, além de outras regiões cerebrais que também estão envolvidas na formação de memórias e são sensíveis aos glicocorticóides. A ansiedade crônica acaba gerando uma melhora no armazenamento de memórias ansiogênicas, mas também reduz a capacidade de evocação de outras memórias e a memória de trabalho. Assim sendo, uma quantidade moderada de ansiedade pode ser benéfico ao processo mnemônico, mas em demasia é fator negativo (ROOSENDAAL; MCEWEN; CHATTARJI, 2009).

2.2.4 Transtornos gerados pela ansiedade crônica

Os transtornos psicológicos classificados dentro da ansiedade incluem: agorafobia, o medo de locais abertos e de deixar determinado ambiente de conforto; o transtorno do pânico, onde a ansiedade atinge de forma aguda e imprevisível gerando paralisia e sintomas fisiológicos agudos; as fobias específicas, ansiedade aguda ou medo direcionado a um objeto, local ou situação

específico; a fobia social, onde a ansiedade é relacionada diretamente ao convívio social; o transtorno de ansiedade generalizada, onde a ansiedade é aumentada em todas as situações normais ou comuns aos demais indivíduos gerando crises agudas; o transtorno obsessivo-compulsivo, em que são auto-impostas rotinas ou atividades não comuns ou pensamentos alienados para tentar aliviar crises de ansiedade aguda (SHEARER, 2007).

Segundo Shearer (2007), existem estudos comprovando que a psicoterapia de enfrentamento dos estímulos embora não seja eficaz para todos os espectros dos transtornos de ansiedade pode melhorar seus resultados com auxílio da farmacologia. Há que ser observado ainda o alto índice de desempenho obtido com efeito placebo, mas que não supera a terapia aliada ao composto mais adequado.

2.3 Tiazolidinonas

Essas substâncias heterocíclicas contendo dois heteroátomos são extensamente pesquisadas por sua variedade de atividades biológicas. Existem diferentes metodologias que podem ser utilizadas na sua síntese e de derivados e a principal rota sintética envolve reações multicomponentes entre um aldeído ou uma cetona, uma amida primária e ácido mercaptoacético. Essas reações podem ainda ser realizadas em uma etapa, a reação one-pot, ou em duas etapas (CUNICO; GOMES; VELLASCO, 2008; NEUENFELD et al., 2011).

Os compostos pesquisados no presente trabalho foram obtidos através de reações multicomponentes entre benzaldeídos substituídos, uma amina e ácido mercaptoacético, sob refluxo de tolueno. Na Fig.4 é possível observar a estrutura geral para as tiazolidinonas com destaque em vermelho os locais onde foram inseridos os substituintes dos compostos utilizados no trabalho. Respectivamente temos AK13 e AK 26 com substituintes na posição 2-F e 4-CH_3 como é possível observar na Fig.5. É interessante observar a diferença na natureza química dos substituintes, enquanto AK13 possui um átomo de Flúor que é um elemento oxidante, AK26 possui um grupo metil que é redutor.

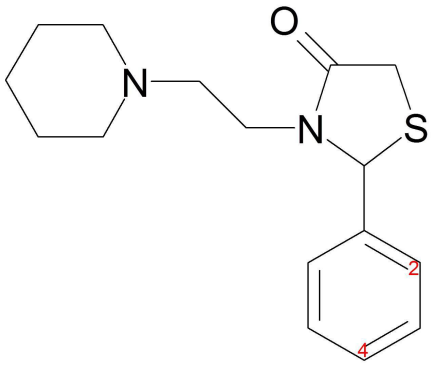


Figura 4: Estrutura Geral de Tiazolidinona com 2 e 4 marcando o ponto de inserção dos substituintes utilizados na síntese dos compostos pesquisados.

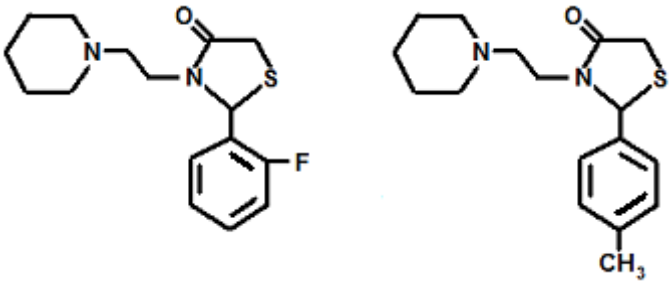


Figura 5: Estrutura de AK13 (2-F) e AK26(4-CH_3)

3 Materiais e Métodos

3.1 Obtenção dos compostos e camundongos

Dois compostos diferentes as moléculas AK26(4-CH_4) e AK13(2-F), pertencentes ao grupo das tiazolidinonas, solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) 20% foram utilizadas no teste farmacológico. A obtenção dos compostos foi realizada no Laboratório de Síntese Orgânica do NuQuiA (Núcleo de Química Aplicada) do Departamento de Química Orgânica da UFPel sob responsabilidade e supervisão do Prof. Dr. Wilson João Cunico Filho.

Foram utilizados camundongos machos, albinos, swiss da linhagem CF1, com idade entre dois meses e dois meses e meio obtidos do Biotério Central da UFPel. A massa desses animais variando entre 30 e 50g. Os animais foram adaptados na sala de experimentação 30min antes dos ensaios, para minimizar efeito estressor do transporte entre biotério e sala de experimentação. Os testes de ansiedade utilizaram animais que já haviam passado pelo teste de memória, com uma pausa de 14 dias aproximadamente entre os testes, para reduzir o número de animais sacrificados.

Foram formados cinco grupos experimentais para cada composto, a saber: três diferentes doses (0,1mg/Kg, 0,5mg/Kg e 1,0mg/Kg), seguindo Chandra e colaboradores (2008) e dois grupos controles (solução salina 0,9% e DMSO 20%). A administração das doses foi efetuada por via intraperitoneal com seringa hipodérmica em um volume de 0,1 ml/10g de massa do animal.

A manipulação animal foi realizada seguindo os princípios éticos para a experimentação animal relatado por Goldim (1995). Foram utilizadas todas as estratégias que visam minimizar o número de animais para cada experimento,

planejando segundo o relato da literatura e cálculo amostral para o modelo de esquiva ativa. Os ensaios experimentais escolhidos visam induzir mínimo desconforto possível e em muitos casos a metodologia descrita na literatura foi adaptada, abdicando-se de medidas que poderiam trazer mais danos aos animais e ou introduzindo alternativas para menor desconforto. Todos os procedimentos operacionais realizados estão embasados em Manual sobre cuidados e usos de animais em laboratório (1996), e Manual para Técnicos em Bioterismo (1996). Tais procedimentos são de uso habitual por autores que trabalham e publicam na área. Obedecem às normas propostas pela Declaração Universal dos Direitos dos Animais (1978) e International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (1985).

O descarte do material biológico é efetuado acondicionando os animais, que são eutanasiados individualmente, em saco plástico sob refrigeração em freezer exclusivo para tal. O descarte final do material foi feito pelo Biotério Central.

3.1.1 Memória: Esquiva inibitória

Segundo Almeida (2006) um dos testes mais difundidos na avaliação da memória é a esquiva inibitória, que divide-se em duas etapas, uma de treinamento e uma etapa de teste. A diferença entre os tempos de permanência sobre a plataforma nas duas etapas é considerada quantitativa para memória. Esse teste pode ser utilizado para avaliar as três fases da memória, tanto aquisição como a consolidação e a evocação, bem como avaliar as memórias de longa e de curta duração. No presente trabalho foi avaliada apenas a fase de evocação da informação, tanto para memória de curta como de longa duração.

O método utilizado para testar a evocação foi adaptado de Netto & Izquierdo (1985) e Almeida (2006) que indicam a aplicação do composto antes do teste para esse fim. O equipamento da esquiva inibitória é uma caixa de condicionamento automatizada, medindo 40x25x25cm, o assoalho formado por uma grade de barras de bronze paralelas com 1mm de diâmetro e espaço de 1cm entre as barras, onde é possível aplicar uma diferença de potencial elétrico (ddp) variável. A caixa contém uma plataforma isoladora com 5x5x4cm.

O experimento foi executado em duas etapas, uma de treinamento e outra de teste. No treinamento o animal foi colocado sobre a plataforma, suavemente, para

então medir-se o tempo que leva para que ele desça até a grade com suas quatro patas. Assim que ele colocar todas as patas na grade, receberá uma descarga elétrica intermitente de 0,4mA durante 10s para o condicionamento de medo do animal. No teste o animal recebeu as doses por injeção intraperitoneal e após 30min colocou-se o animal sobre a plataforma, de forma gentil e mensurando o tempo para que coloque novamente todas as patas sobre a grade, com um limite máximo de 180s. Nessa etapa os animais não receberam descargas elétricas ao descerem da plataforma (Ver apêndice A).

Para diferenciar a memória de curta e de longa duração faz-se uma variação no intervalo dado entre treino e teste, estipulamos o intervalo de 3h entre o treinamento e teste, para memória de curta duração. Para a memória de longa duração o intervalo dado é de 24h.

Para cada um dos compostos foram utilizados 18 animais por grupo experimental, sendo três grupos que receberam diferentes concentrações de cada composto e dois grupos controle por composto, totalizando 20 grupos experimentais e 360 animais utilizados no total. Os experimentos foram efetuados em diferentes animais para a memória de curta e longa duração evitando qualquer interferência.

3.1.2 Ansiedade: Ocultar defensivo

O teste de Ocultar Defensivo representa uma situação nova em um ambiente estressante para o animal. O comportamento ansioso é evidenciado na tentativa de padronizar o ambiente, escondendo aquilo que chamaria atenção de um possível predador ou competidor. Nesse teste se avalia a quantidade de esferas que são recobertas por palha, que seriam um indicativo dos níveis de ansiedade do animal (ALMEIDA, 2006).

Os animais foram divididos em grupos de 10 animais, marcados e pesados para receber a aplicação dos respectivos compostos. Para cada tiazolidinona são utilizados dois controles, NaCl 0,9% e DMSO 20% e três doses de tiazolidinona (0,1, 0,5 e 1,0mg/kg). Trinta minutos após a aplicação os animais foram colocados em caixas plásticas contendo serragem abundante e 20 bolas de vidro, distribuídas em quatro linhas de cinco bolas, uniformemente espaçadas. Os

animais permanecem na caixa por 30min e então foram retirados para contar o número de bolas recobertas e/ou parcialmente recobertas em até dois terços (ALMEIDA, 2006; KAURAV et al, 2012).

3.1.3 Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o programa SPSS de cálculo e análise estatística. Os testes estatísticos para a memória foram analisados, separadamente para ambos intervalos, pelo teste estatístico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Mann-Whitney. Os dados foram apresentados graficamente em mediana e intervalo interquartil (25 e 75%).

Para a ansiedade os resultados foram analisados pelo teste estatístico ANOVA seguido pelo teste de DUNCAN, apresentados graficamente em média e erro padrão.

4 Resultados e Discussão

4.1 Memória de Longa duração

É possível observar na Fig.6 que a substância AK26 não apresentou efeito sobre a evocação da memória de longa duração nas doses utilizadas.

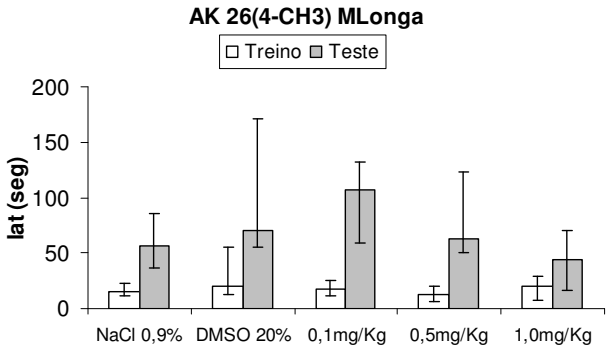


Figura 6: Efeito de AK26 sobre a memória de longa duração. Tiaz= AK 26 ip. N=18. Dados expressos em mediana e intervalo interquartil. Kruskal-Wallis. P<0,05.

Conforme o desempenho dos animais, observado na Fig.7, AK13 não promoveu nenhum efeito na evocação da memória de longa duração nas doese utilizadas, embora uma dose maior possa ser avaliada.

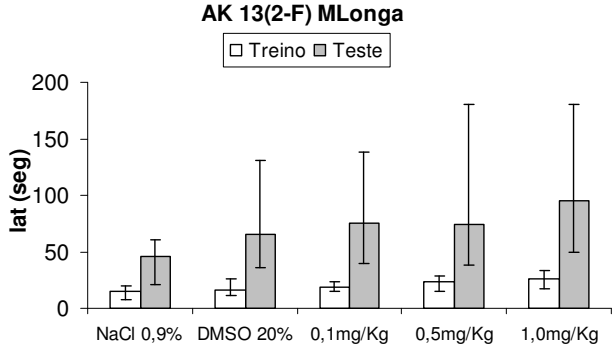


Figura 7: Efeito de AK13 sobre a memória de longa duração. Tiaz= AK13, ip. N=18. Dados expressos em mediana e intervalo interquartil. Kruskal-Wallis. P<0,05.

4.2 Memória de Curta duração

Conforme mensurado no desempenho dos camundongos em Fig.8 é possível afirmar que a substância AK26 não obteve atividade sobre a evocação da memória de curta duração, nas doses utilizadas.

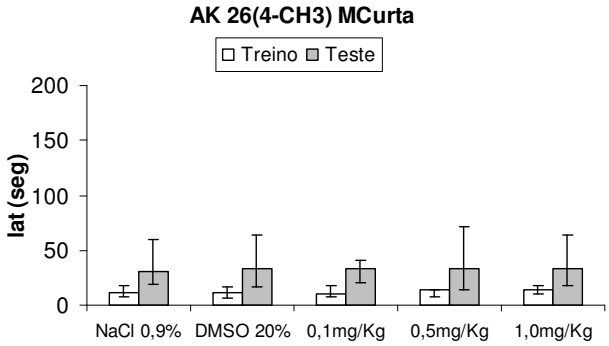


Figura 8. Efeito de AK26 sobre a memória de curta duração. Tiaz= AK26, ip. N=18. Dados expressos em mediana e intervalo interquartil. Kruskal-Wallis. P<0,05.

Sobre a evocação na memória de curta duração, AK13 também não apresentou efeito nas doses utilizadas, pode observar-se na Fig.9 o gráfico correspondente.

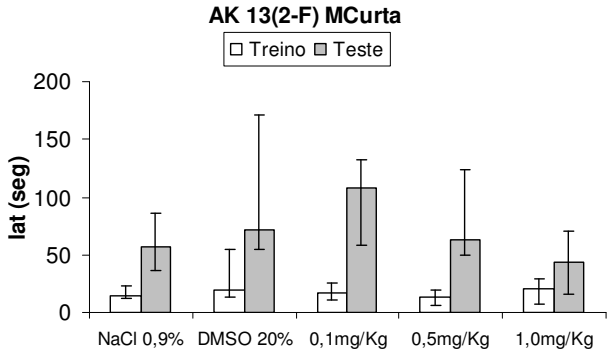


Figura 9. Efeito de AK13 sobre a memória de curta duração. Tiaz= AK13, ip. N=18. Dados expressos em mediana e intervalo interquartil. Kruskal-Wallis. P<0,05.

4.3 Ansiedade

Conforme a Fig.10 a substância AK26 na dose de 0,1 e 0,5 mg/Kg apresentou efeito ansiolítico. Os resultados indicam uma redução no nível de ansiedade sem prejuízo do processo cognitivo.

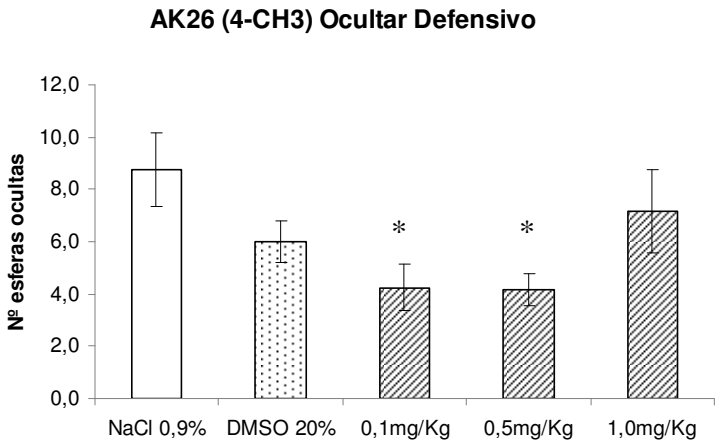


Figura 10. Efeito de AK26 sobre o ocultar defensivo. N=10. Dados expressos em média ± erro.*p=0,05 em relação aos controles. ANOVA/DUCAN.

Na Fig. 11 é possível observar efeito ansiolítico apenas para a menor concentração (0,1mg/Kg) de AK13.

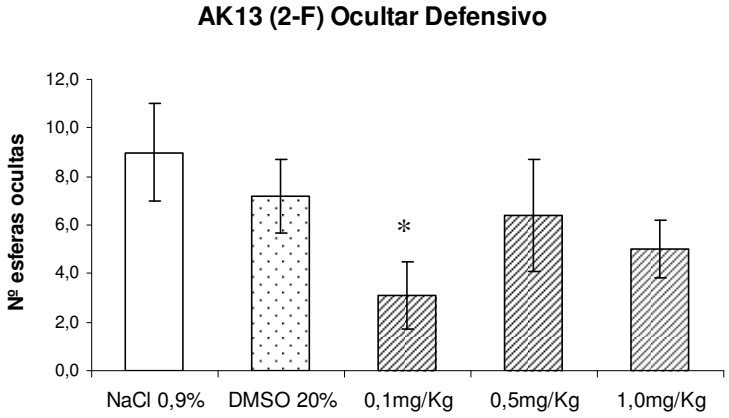


Figura 11. Efeito de AK13 sobre o ocultar defensivo. N=10. Dados expressos em média ± erro.*p=0,05 em relação aos controles. ANOVA/DUCAN.

4.4 Discussão

Analisando-se os resultados podemos perceber que nenhuma das tiazolidinonas apresentou efeito sobre a evocação da memória de curta ou longa duração nas doses testadas. Contudo, seria interessante testar o efeito de doses maiores de 1,0 mg/kg de AK13 (2-F) sobre a memória de longa duração devido ao resultado observado (Fig.5).

Foi verificado efeito ansiolítico de ambas as substâncias, mas em diferentes doses. Contudo, o teste de ocultar defensivo utilizado neste trabalho, segundo Thomas e colaboradores (2009), está mais relacionado com a tensão do indivíduo do que um comportamento ansioso, uma vez que cavar é um comportamento tipicamente preservado nos roedores. Esse teste mede o comportamento de cavar repetitivamente frente a um estímulo inócuo (bolas de vidro), semelhante ao comportamento observado em pessoas com transtorno compulsivo obsessivo (TOC) onde o padrão de comportamento normal é repetido muitas vezes sem que haja sentido ou uma razão específica (THOMAS et al., 2009).

É interessante ressaltar que o efeito ansiolítico demonstrado por ambas as tiazolidinonas não demonstre prejuízo sobre a evocação da memória, pois os benzodiazepínicos que são fármacos ansiolíticos mais utilizadas pela população, apresentam a amnésia como efeito adverso ou interferências no processo cognitivo. Embora não tenha apresentado efeitos sobre a memória as substâncias foram testadas apenas para a evocação que é a fase posterior ao armazenamento da informação. Isso sugere que os compostos não tenham efeito ansiolítico direto, gerando as respostas contrárias ao stress de redução na evocação da memória.

Considerando que qualquer substância com efeito ansiolítico pode vir a ser um auxiliar no tratamento das desordens de ansiedade (Shearer 2007), seria interessante aprofundarmos os estudos para busca de um novo fármaco ansiolítico sem efeito sobre a memória. Deste modo, as perspectivas futuras sugerem analisar o efeito ansiolítico apresentado por estas substâncias em outros testes comportamentais para a ansiedade como o de labirinto em cruz elevado. Ainda seria interessante também, realizar análises sobre as demais fases da memória, como a fase de aquisição que pode sofrer prejuízo frente a drogas ansiolíticas.

5 Conclusão

Com base nos resultados obtidos foi possível concluir que ambas as tiazolidinonas são possíveis drogas ansiolíticas e não apresentam prejuízos cognitivos. São necessários estudos adicionais em diferentes modelos animais para especificar os efeitos ansiolíticos, bem como eliminar a possibilidade de interferência nas demais fases da memória.

Referências

AAALAC (Associação Internacional para avaliação e acreditação de laboratórios de cuidados com animais); COBEA (Colégio Brasileiro em Experimentação Animal) **Manual sobre cuidados e usos de animais em laboratório**, Edição em Português. Goiás, 1996.

ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia:** Fundamentos Práticos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 384p.

BALASA, M.; GELPI, E.; ANTONELL, A.; REY, M. J.; SANCHEZ-VALLE, R.; MOLINUEVO, J. L.; LLADO, A. Clinical features and *APOE* genotype of pathologically proven early-onset Alzheimer disease. **Neurology**, v.76, n. 20, p.1720-1725, 2011.

CAROL Donner, Sistema Límbico. Disponível em: <http://www.guia.heu.nom.br/sistema_limbico.htm> Acesso em: 5 jan. 2013.

CHANDRA, J. O. N. E. S.; MALVIYA, M.; SADASHIVA, C. T.; SUBHASH, M. N.; RANGAPPA, K. S. Effect of novel arecoline thiazolidinones as muscarinic receptor 1 agonist in Alzheimer's dementia models. **Neurochemistry International,** v.52, n.6-8, p.376–383, 2008.

CIOMS (Council for International Organizations of Medical Sciences) International Guidin of Principles for Biomedical Research Involving animals, 1985.

COBEA (Colégio Brasileiro em Experimentação Animal) **Manual para técnicos em bioterismo**. 2.ed. São Paulo: H.A. Rothshild, 1996.

CUNICO, W.; GOMES, C. R. B; VELLASCO, W. T. J. Chemistry and biological activities of 1,3-thiazolidin-4-ones. **Mini-Reviews in Organic Chemistry,** v.5, n.4, p.336-344, 2008.

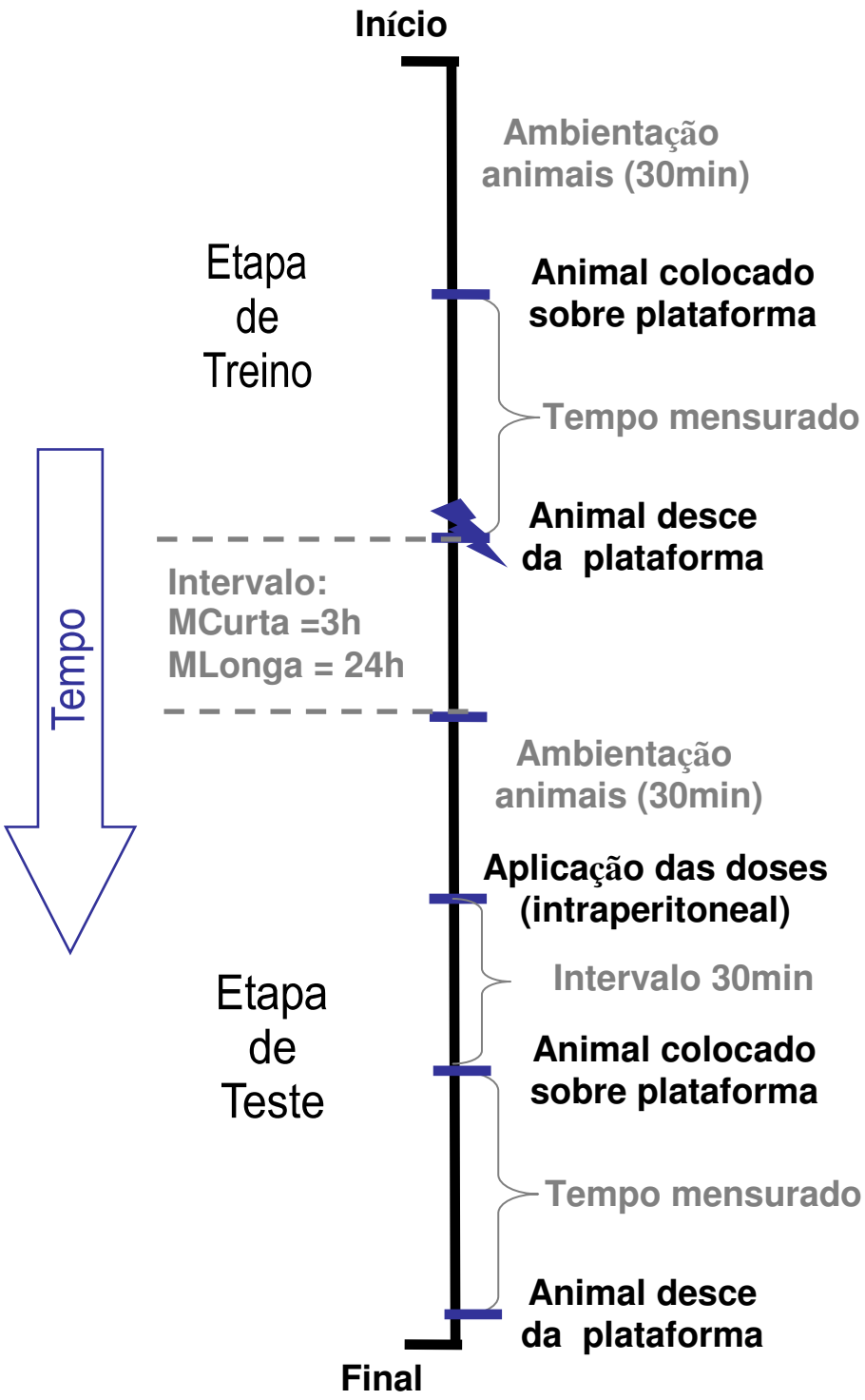
DALMAZ, C.; NETTO, C. A. A Memória. **Ciência e Cultura**, v.56, n1, p30-31, 2004

DA SILVA, A. L.; SILVA MARTINS, B. D.; LINCK, V. D. M.; HERRMANN, A. P.; MAI, N.; NUNES, D. S.; ELISABETSKY, E. MK801- and scopolamine-induced amnésias are reversed by na Amazonian herbal locally used as a “brain tonic”. **Psychopharmacology**, v.202, n.1-3, p.165-172, jan. 2009.

GAMARO, G. D.; DENARDIN JR, J. D.; MICHALOWSKI, M. B.; CATELLI, D.; CORREA, J. B.; XAVIER, M. H.; DALMAZ, C. Epinephrine effects on memory are not dependent on hepatic glucose release. **Neurobiology of learning and Memory**, v.68, n.3, p.221-229, 1997.

GOLDIM, J. R. Caso Clínico. **Bioética**, v.3, n.1, p.76-78, 1995.

GERSTNER, J. R.; LYONS, L. C.; WRIGHT JR, K. P.; LOH, D. H.; RAWASHDEH, O.; ECKEL-MAHAN, K. L.; ROMAN, G. W. Cyclin Behavior and Memory Formation. **The Journal of Neuroscience**, n.24, v.41, 12824-12830, out. 2009.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H.; Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.68, n.3, p.285-316, 1997.
IZQUIERDO, Iván. **Memória.** Porto Alegre: Artmed, 2002. 95 p.
KAURAV, B. P. S.; WANJAR, M. M.; CHANDEKAR, A.; CHAUNHAN, N. S.; LIESEN, A. P.; AQUINO, T. M.; GÓES, A. J. S.; LIMA, J. G.; FARIA, A. R.; ALVES, A. J. Métodos de obtenção, reatividade e importância biológica de 4-tiazolidinonas. **Quimica Nova,** v.31, n.2, p.369-376, 2008.
MC GAUGH, J. L. Memory, a Century of Consolidation, **Science**, v.287, n.5451, p.248-251, jan. 2000.
MELLO, A. A. F.; MELLO, M. F.; CARPENTER, L. L.; PRICE, L. H. Update on stress and depression: the role of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. **Revista Bresileira de Psiquiatria**, v.4, n.25, p231-238, 2003.
NETTO, C. A., IZQUIERDO, I. On How Passive is inhibitory avoidance.**Behavioral and Neural Biology**, v.43, n.3, p.327-330, 1985.
NEUENFELDT, P.D.; DRAWANZ, B.B.; AGUIAR, A.C.C.; FIGUEIREDO F. Jr.; KRETTLI, A.U.; CUNICO, W. Multicomponent synthesis of new primaquine thiazolidinone derivatives, **Synthesis**, n.23, p.3866-3870, 2011.
ROOSENDAAL, B.; MCEWEN, B. S.; CHATTARJI, S. Stres, memory and the amigdala. **Nature Reviews: Neuroscience**, v.10, p.423-433, jun. 2009.
SHEARER, S. L. Recent Advances in the Understanding and Treatment of Anxiety Disorders. **Primare Care: Clinics in Office Practice,** v.34, n.3, p.475-504, 2007.
TERRY, A. V. J; BUCCAFUSCO, J. J. The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics,** v.306, n.3, p.821-827, 2003.
THOMAS, A.; BURANT, A.; BUI, N.; GRAHAM, D.; YUVA-PAYLOR, L. A.; PAYLOR, R. Marble-burying reflects a repetitive and perseverative behavior more than novelty-induced anxiety. **Psycopharmacology,** v.204, n.2, p.361-373, 2009.
ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. Neural Regulations of endocrine and autonomic stress responses. **Nature Reviews: Neuroscience**, v.10, p.397-409, 2009.
UNESCO, **Declaração Universal dos Direitos do Animais**, de 27 de janeiro 1978.
VERMA, A.; SARAF, S. K. 4-Thiazolidinone - A biologically active scaffold**.** **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.43, p.897-905, 2008.

Apêndice A – Esquema do Teste de Esquiva inibitória