

**POLIAMINAS MODULAM A MEMÓRIA NAS
TAREFAS DE MEDO CONDICIONADO E ESQUIVA
INIBITÓRIA EM RATOS**

Daiane Bolzan Berlese



UFSM

Tese de Doutorado

**POLIAMINAS MODULAM A MEMÓRIA NAS TAREFAS DE
MEDO CONDICIONADO E ESQUIVA INIBITÓRIA EM RATOS**

Daiane Bolzan Berlese

PPGBT

SANTA MARIA – RS – BRASIL

2004

**POLIAMINAS MODULAM A MEMÓRIA NAS
TAREFAS DE MEDO CONDICIONADO E ESQUIVA
INIBITÓRIA EM RATOS**

por

Daiane Bolzan Berlese

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

PPGBT

SANTA MARIA – RS – BRASIL

2004

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 Tese de Doutorado

**POLIAMINAS MODULAM A MEMÓRIA NAS TAREFAS DE
MEDO CONDICIONADO E ESQUIVA INIBITÓRIA EM RATOS**

elaborada por

Daiane Bolzan Berlese

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA:

Maribel Antonello Rubin
(Orientadora)

Carlos Fernando de Mello
(Co-Orientador)

Tatiana Emanuelli

Jorge Alberto Quillfeldt

Adair Roberto Soares dos Santos

Santa Maria, 3 de setembro de 2004.

*Quando não houver caminho,
Mesmo sem amor, sem direção
A sós ninguém está sozinho
É caminhando que se faz o caminho
Quando não houver desejo
Quando não restar nem mesmo dor
Ainda há de haver desejo
Em cada um de nós aonde Deus colocou...*

Sérgio Britto

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ser a fonte impulsionadora dos meus dias e por colocar tantos anjos em meu caminho.

Ao meu esposo Gustavo, pelo amor, companheirismo, atenção, dedicação e paciência em todos estes anos. Obrigado por estar sempre ao meu lado e suportar a distância.

Agradeço aos meus pais, Dérico e Marí Izabel e aos meus irmãos, Denise e Dérico Junior pelo amor, carinho, união, risos e lágrimas. Muito obrigado!

Certamente me faltariam palavras para agradecer aos meus orientadores, Maribel e Carlos, vocês foram muito mais do que orientadores foram e serão eternos amigos e para sempre irão ocupar um espaço enorme em meu coração.

Em especial, gostaria de agradecer a minha grande amiga Patricia Dutra Sauzem pelo exemplo de amizade, lealdade e dedicação incansável.

Aos amigos e colegas, de iniciação científica, mestrado, doutorado e especialmente a todos que trabalharam neste projeto. Agradeço a vocês pela descontração e pela ajuda constante. Levo comigo minha eterna gratidão.

Ao Departamento de Física, especialmente ao Paulino Silva de Aguiar, que nunca mediu esforços para fazer, refazer e consertar nossos equipamentos.

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

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
I. INTRODUÇÃO	1
I.1 – MEMÓRIA	2
I.1.1 – TIPOS DE MEMÓRIA	3
I.1.2 – NOÇÕES SOBRE A FORMAÇÃO DA MEMÓRIA.....	5
I.1.3 – HIPOCAMPO	8
I.1.4 – AMÍGDALA	12
I.2 – RECEPTOR N-METIL-D-ASPARTATO – NMDA	15
I.2.1 – PAPEL DO RECEPTOR NMDA NA MEMÓRIA	18
I.3 – POLIAMINAS	20
I.3.1 – ESTRUTURA E METABOLISMOS DAS POLIAMINAS.....	20
I.3.2 – FUNÇÃO DAS POLIAMINAS	25
II. OBJETIVOS	32
II.1. OBJETIVO GERAL	33
II.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
III. ARTIGO 1	35
IV. ARTIGO 2	43
V. DISCUSSÃO	50
VI. CONCLUSÕES	59
VII. REFERÊNCIAS	62

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACPD – Ácido 1-aminociclopentano-1,3-carboxílico
- AMPA – Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico
- AMPc – Adenosina monofosfato cíclica
- ANOVA – Análise de variância
- AP-5 – Ácido D-2-amino-5-fosfonopentanóico
- CaMKII – Proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina do tipo II
- CNQX – Cianonitro-quinoxalinodieno
- CPG – Ácido DL-beta-clorofenil glutâmico
- CREB – Proteína ligante do elemento responsivo ao AMPc
- GABA – Ácido δ -aminobutírico
- MCPG – α -metil-4-carboxifenilglicina
- MgluR – Receptor glutamatérgico metabotrópico
- MK-801 – (+)5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,b]-ciclohepteno-5-10-amino
- MTA – Metiltioadenosina
- NMDA – N-metil-D-aspartato
- NOS – Óxido nítrico sintase
- ODC – L- ornitina descarboxilase
- PBS – Tampão fosfato em salina
- PKA – Proteína quinase A
- PKC – Proteína quinase dependente de cálcio
- SAM – S-adenosil-metionina
- SAM-D – S-adenosil-metionina descarboxilada
- SNC – Sistema Nervoso Central
- SPD – Espermidina

LISTA DE FIGURAS

Figura I.1 – Hipocampo11

Figura I.2 – Amígdala.....14

Figura I.3 – Representação esquemática do receptor NMDA17

Figura I.4 – Estrutura química das poliaminas.....21

Figura I.5 – Biossíntese e ciclo de interconversão das poliaminas24

Figura I.6 – Ação modulatória da espermidina sobre o receptor
NMDA.....29

LISTA DE TABELAS

Tabela I.1 – Distribuição de poliaminas no cérebro de ratos adultos.....26

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

POLIAMINAS MODULAM A MEMÓRIA NAS TAREFAS DE MEDO CONDICIONADO E ESQUIVA INIBITÓRIA EM RATOS

Autora: Daiane Bolzan Berlese
Orientadora: Maribel Antonello Rubin
Co-orientador: Carlos Fernando de Mello
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 3 de setembro de 2004.

As poliaminas endógenas, putrescina, espermina e espermidina são aminas alifáticas que interagem com diversos alvos celulares como ácidos nucléicos e proteínas. Elas atuam como moduladores endógenos de diversos canais iônicos, incluindo o subtipo de receptor glutamatérgico *N*-metil-D-aspartato (NMDA). Os processos mediados pelo receptor NMDA incluem plasticidade sináptica e formação de circuitos neurais. Acredita-se que a ativação dos receptores NMDA na amígdala é crítica para aquisição da memória do medo em ratos. No entanto, pouco se sabe sobre o papel de moduladores endógenos do receptor NMDA, como as poliaminas, no aprendizado do medo condicionado Pavloviano. Assim, num primeiro momento nós investigamos o efeito da administração intra-amígdala de arcaína, um antagonista do sítio das poliaminas no receptor NMDA, e da espermidina, sobre a tarefa do medo condicionado clássico. Para isso, os ratos foram canulados bilateralmente nas amígdalas e, após a recuperação cirúrgica, os animais foram treinados e testados na tarefa do medo condicionado contextual e auditivo. Microinjeções bilaterais de arcaína (0,0002-0,2 nmol), espermidina (0,002-20 nmol) ou a associação de espermidina e arcaína, foram realizadas imediatamente antes do treino ou imediatamente após o treino do medo condicionado. A administração de arcaína diminuiu, enquanto espermidina aumentou o medo condicionado ao contexto e auditivo. A arcaína numa dose que não apresentou efeito *per se* reverteu o efeito facilitatório causado pela espermidina. Nenhuma das drogas estudadas alteraram a atividade motora, a ansiedade e a sensibilidade dos animais ao choque. Estes resultados indicam que as poliaminas endógenas e exógenas modulam a aquisição e/ou o início da consolidação da tarefa do medo condicionado na amígdala em ratos. Tendo em vista a falta de estudos na literatura avaliando o período de tempo em que o processamento da memória no hipocampo é sensível as poliaminas, avaliou-se o efeito da espermidina administrada no hipocampo sobre a memória em ratos utilizando-se o teste de esquiva inibitória. Os animais receberam microinjeções bilaterais de espermidina (0,02-2 nmol), 30 minutos antes do treino, imediatamente após o treino, 6 horas após o treino ou 10 minutos antes do teste na região CA1 do hipocampo dorsal. Espermidina na dose de 0,2 nmol melhorou a performance dos ratos na tarefa de esquiva inibitória quando administrada 30 minutos antes ou imediatamente após o treino. Estes resultados sugerem que o efeito modulatório da espermidina na aquisição e/ou início da consolidação da memória na tarefa de esquiva inibitória no hipocampo ocorre dentro de uma “janela temporal” limitada.

ABSTRACT

Doctoral These
Post Graduation Program in Toxicology Biochemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

POLYAMINES MODULATE MEMORY IN FEAR-CONDITIONING AND INHIBITORY AVOIDANCE TASKS IN RATS.

Author: Daiane Bolzan Berlese
Advisors: Maribel Antonello Rubin
Carlos Fernando de Mello
Date and place of defense: Santa Maria, September 3rd, 2004.

The polyamines, spermine, spermidine and putrescine, are a group of aliphatic amines that interact with diverse cellular targets such as nucleic acids and proteins. The polyamines may act as physiological modulators of *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. The processes mediated by NMDA receptor include synaptic plasticity and formation of neural circuitry. Amygdalar NMDA receptors activation has been implicated in the acquisition of fear memories in rats. However, little is known about the role of endogenous modulators of the NMDA receptor, such as polyamines, in Pavlovian fear conditioning learning. Therefore, the present study was conducted to investigate whether the immediate pre-training or post-training bilateral infusion of arcaine, an antagonist of the NMDA receptor polyamine binding site, and/or spermidine, an agonist of the NMDA receptor polyamine binding site, into the amygdala affected classical fear conditioning in rats. Bilateral microinjections of arcaine (0,0002-0,2 nmol) decreased, while spermidine (0,002-20 nmol) increased contextual and auditory fear conditioning. Arcaine co-administration, at a dose that had no effect *per se*, reversed the facilitatory effect of spermidine. These results provide evidence that endogenous and exogenous polyamines modulate the acquisition and/or early consolidation of the fear conditioning task in the amygdala. Little is known thus far about the period of time during which memory processing in the hippocampus is sensitive to polyamines, and whether polyamines affect memory retrieval. The present study valued the effect of bilateral infusions of spermidine (0,02-2 nmol), a polyamine agonist, into the CA1 region of the rat dorsal hippocampus on inhibitory avoidance learning 30 minutes pre-training, immediately post-training, 6 hours post-training or 10 minutes pre-test. Bilateral microinjections of 0,2 nmol spermidine prolonged step-down latencies compared to the respective control group when administered 30 minutes pre-training or immediately post-training. These results provide evidence that the modulatory effects of spermidine on the acquisition and/or early consolidation of memory of inhibitory avoidance tasks in the hippocampus occur within a limited time window.

I. INTRODUÇÃO

I.1 – MEMÓRIA

A memória desperta o interesse e a imaginação do homem desde a Antigüidade, de tal forma que a pergunta de Santo Agostinho, feita há dezessete séculos, parece hoje ainda mais atual e relevante do que quando foi formulada:

"Chego aos campos e vastos palácios da memória onde estão os tesouros de inumeráveis imagens trazidas por percepções de toda espécie. Aí está também escondido tudo o que pensamos, quer aumentando quer diminuindo ou até variando de qualquer modo os objetos que os sentidos atingiram. Enfim, jaz aí tudo o que se lhes entregou e depôs, se é que o esquecimento ainda o não absorveu e sepultou...

...Quem poderá explicar o modo como elas se formaram, apesar de se conhecer por que sentidos foram recolhidas e escondidas no interior?... (Santo Agostinho, O palácio da memória, Confissões, Livro X; Dias, 1969).

Como muito apropriadamente declara o professor Dr. Iván Izquierdo, um estudioso da área de neurobiologia da memória, "... somos aquilo que recordamos, literalmente. Não podemos fazer aquilo que não sabemos como fazer, nem comunicar nada que desconheçamos, isto é, nada que não esteja na nossa memória... ...Eu sou quem sou, cada um é quem é, porque todos lembramo-nos de coisas que nos são próprias e exclusivas, e não pertencem a mais ninguém. As nossas memórias fazem com que cada ser humano ou animal seja um ser único, um indivíduo".

Portanto, mais do que um exercício para a nossa curiosidade, descobrir os caminhos tortuosos pelos quais a memória se forma, e se mantém, parece ser uma oportunidade única de prolongar a individualidade humana frente às várias doenças neurodegenerativas que surgiram com o aumento da expectativa de vida da população, como o mal de Alzheimer (Izquierdo, 2002).

I.1.1 – TIPOS DE MEMÓRIA

A memória pode ser classificada quanto a diferentes aspectos, como o seu conteúdo e o tempo de sua duração. Quanto ao seu conteúdo, as memórias podem ser classificadas como "declarativas", que são aquelas que conseguimos verbalizar, como um fato; ou "de procedimento", que são aquelas memórias que não conseguimos verbalizar. Na segunda categoria (memória "de procedimento") incluem-se atividades motoras complexas, como dirigir um automóvel, tocar piano, andar de bicicleta, etc... (Bear *et al.*, 2002).

O aprendizado e a formação desses dois tipos de memória dependem de estruturas cerebrais diferentes. As memórias de procedimento são menos estudadas, porque parecem ser menos suscetíveis ao esquecimento. Assim, pacientes com dificuldade de lembrar fatos podem, com frequência, não ter dificuldade para dirigir um carro ou andar de bicicleta. As memórias declarativas, por outro lado, são

bastante estudadas e são classificadas quanto ao seu tempo de duração como imediata, de curta e de longa duração (Izquierdo, 2002).

A memória imediata pode ser ilustrada como a memória de um número de telefone que consultamos na lista telefônica, e que geralmente esquecemos logo após tê-lo digitado. Este tipo de memória não deixa "traços", ou seja, não forma "arquivos", e parece depender da atividade elétrica de células de uma região cerebral denominada córtex pré-frontal. As memórias de curta duração (que duram poucas horas) e as memórias de longa duração (que duram meses, ou anos), por outro lado, formam "traço" de memória. O período em que ocorre a formação do traço de memória é chamado de período de "consolidação". Durante esse período (que na memória de longa duração corresponde a algumas horas após o aprendizado), a memória é lábil e sensível a vários tratamentos (fármacos e drogas de abuso, por exemplo) ou eventos, como um traumatismo craniano (Izquierdo, 2002; Squire & Kandel, 2003).

Muitas memórias são adquiridas por meio da associação de um estímulo com um outro estímulo ou com uma resposta. Quem primeiro estabeleceu isto foi o fisiologista russo Ivan Pavlov no início do século XX. Este tipo de memória adquirida por meio da associação, o qual denominamos condicionamento clássico, envolve a associação entre dois estímulos, o incondicionado, que evoca uma resposta e não depende de nenhum outro estímulo, e o condicionado, que é um estímulo neutro cuja resposta muda por sua associação com outro estímulo (Izquierdo, 2002).

I.1.2 – NOÇÕES SOBRE A FORMAÇÃO DA MEMÓRIA

Há evidências de que formamos memória por mais de um mecanismo bioquímico, dependendo do tipo da memória formada. Há evidências, também, de que os mecanismos pelos quais formamos a memória de um fato (aprendemos), são diferentes dos mecanismos pelos quais a evocamos (lembramos deste fato) (Abel & Lattal, 2001; Izquierdo, 2002).

Experiências mostram que a formação da memória de longa duração depende de eventos relacionados à síntese protéica. O aumento na síntese protéica decorre de outras alterações no cérebro, e é apenas uma das modificações cerebrais observadas durante o processo de formação de memória. De fato, alterações na liberação de neurotransmissores pelos neurônios e na eficiência na comunicação entre tais neurônios no hipocampo, córtex cerebral e outras estruturas encefálicas, antecedem a alteração da síntese protéica, e parecem ser eventos neuroquímicos primários para a formação da memória (McGaugh, 2000; McGaugh & Izquierdo, 2000).

Um dos principais neurotransmissores liberados pelos neurônios localizados nas estruturas cerebrais envolvidas na formação da memória é o glutamato. O glutamato liberado se liga a receptores específicos, denominados: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA), cainato, *N*-metil-D-aspartato (NMDA) e receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mRGLU), que estão localizados no

neurônio que recebe a informação (neurônio-alvo). Quando o glutamato se liga a tais receptores, provoca alterações no neurônio-alvo, abrindo canais iônicos e ativando enzimas como a proteína quinase A, proteína quinase C, proteína ligante do elemento responsivo ao AMPc (CREB), etc..., que por sua vez ativam mecanismos intracelulares que culminam com a síntese protéica descrita acima, e no aumento na efetividade da transmissão de informações entre estes neurônios e outros neurônios, aos quais o neurônio-alvo se comunica. Tal alteração nas conexões entre os neurônios tem sido denominada "plasticidade sináptica". Todos esses processos estão sujeitos à modulação, inclusive por outros neurotransmissores diferentes do glutamato entre estes, dopamina, noradrenalina, serotonina, acetilcolina, ácido δ -aminobutírico (GABA), poliaminas, que são liberados por neurônios presentes na própria estrutura (no caso, hipocampo) ou em estruturas adjacentes, como a amígdala (uma estrutura do cérebro envolvida na percepção e modulação do medo, e de outras emoções) (Cahill & McGaugh, 1998, McGaugh, 2000, Abel & Lattal, 2001; McGaugh, 2002).

Tal gama de alternativas de modulação permite que o processo de formação de memória seja muito variável, de tal forma que uma maior facilidade ou dificuldade para formar memórias de dados e eventos dependeria, entre outros fatores, do seu significado biológico. Se esse evento fosse de pouca relevância, ele estaria fadado ao esquecimento.

Há que se considerar, também, que a evocação da memória não é tão somente a "reativação" do traço de memória.

Freqüentemente, quando evocamos uma dada memória, somente restituímos parte dela. Também é comum confundirmos pensamentos e associações ligadas diretamente à memória evocada. Assim, o processo de evocação da memória implica também em uma "reconsolidação" da memória prévia, uma vez que a informação armazenada é modificada durante a sua evocação. Isto avança um pouco o conceito de memória, porque faz com que o traço de memória seja suscetível a transformações (Izquierdo, 2002; Dalmaz & Netto, 2004).

De fato, a memória é extremamente dinâmica, e conforme afirmam Dalmaz e Netto "lembrar implica num processo ativo de reconstrução e não se assemelha a assistir a uma fita de vídeo do passado". Enfim, tão dinâmica quanto à própria memória, é a plasticidade cerebral que a acompanha, a qual parece ser o mecanismo pelo qual aprendemos e lembramos (Dalmaz & Netto, 2004).

Duas estruturas cerebrais estão particularmente envolvidas na aquisição, consolidação e evocação da memória, o hipocampo e a amígdala.

I.1.3 – HIPOCAMPO

O hipocampo (do grego “cavalo- marinho”) é uma região do córtex cerebral, situada medialmente ao ventrículo lateral. Ventralmente ao hipocampo estão três importantes regiões corticais que cercam o sulco rinal; o córtex entorrinal; que ocupa a margem medial do sulco rinal, o córtex perirrinal; na margem lateral, e o córtex para-hipocampal, que situa-se lateralmente e posteriormente ao sulco rinal (Fig. I.1) (Bear *et al.*, 2002).

A região hipocampal ocupa a maior parte das paredes ventro-posterior e ventro-lateral do córtex cerebral. Todos os principais componentes do hipocampo podem ser vistos simultaneamente em cortes horizontais (Paxinos & Watson, 1986). Prosseguindo da fissura rinal para a borda medial do córtex, encontram-se seis estruturas distintas: córtex entorrinal, parassúbicula, pré-subículo, subículo propriamente dito, os campos CA1-CA3 no corno de Ammon e o giro denteado. O hipocampo (corno de Ammon e giro denteado) estende-se anteriormente abaixo do corpo caloso para o nível posterior do septo (Paxinos & Watson, 1986).

A grande via de entrada de informações no hipocampo é o córtex entorrinal. O córtex entorrinal envia informações ao hipocampo por meio de um feixe de axônios chamado *via perforante*. Estes axônios estabelecem sinapses em neurônios do giro denteado (Paxinos & Watson, 1986).

Os neurônios do giro denteado projetam axônios (chamados de fibras musgosas) que estabelecem sinapses em células de CA3, que por sua vez, projetam axônios, que se ramificam. Um ramo deixa o hipocampo pelo fórnix, que circunda o tálamo antes de terminar no hipotálamo, e o outro ramo, chamado colateral de *Schaffer*, forma sinapses excitatórias em neurônios da CA1 (Lorente de Nó, 1934). A informação neural é transmitida a partir da região CA1 ao subículo, assim, como outras áreas, constituindo uma saída da informação pré-processada no hipocampo (Paxinos & Watson, 1986).

O hipocampo e suas conexões parecem ser de grande importância para a aquisição, consolidação e evocação da memória, uma vez que manipulações farmacológicas e bioquímicas nestas áreas alteram a retenção de memória em diferentes tarefas (Morris, 1989; Chou & Lee, 1995; Izquierdo & Medina, 1995; Bernabeu *et al.*, 1996; Rubin *et al.*, 2000). De fato, a administração intra-hipocampal do ácido DL-beta-clorofenil glutâmico (CNQX), um antagonista do receptor glutamatérgico AMPA, causa prejuízo da aquisição, início da consolidação e evocação, mas não da consolidação tardia da memória na tarefa de esquila inibitória (Jerusalinsky *et al.*, 1992; Bianchin *et al.*, 1994).

O α -metil-4-carboxifenilglicina (MCPG), um antagonista de receptores glutamatérgicos metabotrópicos, quando injetado no hipocampo, piora o início da consolidação da memória. Por outro lado, a administração do ácido 1-aminociclopentano-1,3-carboxílico (ACPD), um

agonista de receptores glutamatérgicos metabotrópicos, melhora a performance dos ratos na esquiva inibitória (Bianchin *et al.*, 1994).

Estudos mostram que ratos com lesões no fórnix, hipocampo ou córtex entorrinal, apresentam uma piora na formação da memória recente, sem alterar a memória remota. Desta maneira, o hipocampo parece ser necessário para o armazenamento e evocação da memória somente para um período de tempo limitado após o aprendizado (Squire & Alvarez, 1995; Lynch, 2003).

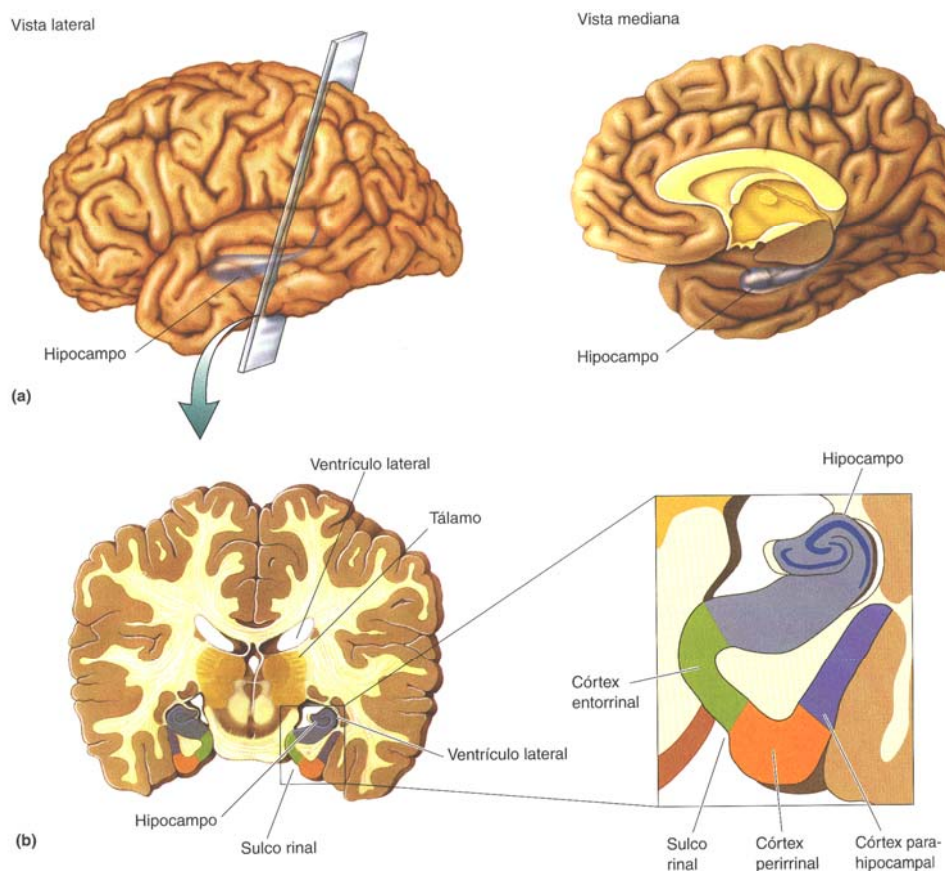


Fig. I.1- Hipocampo, (a) vistas laterais e mediais do lobo temporal mostrando a localização do hipocampo, (b) uma secção coronal na altura do hipocampo e um esquema demonstrando o hipocampo e o córtex no lobo temporal medial (adaptado de Bear *et al.*, 2002).

I.1.4 – AMÍGDALA

A amígdala é uma estrutura cerebral em forma de noz, localizada profundamente no lobo temporal (Fig. 1.2). Ela é formada por três subdivisões principais: as áreas corticomédial, basolateral e central. A amígdala, especialmente o complexo basolateral, apresenta um importante papel nos processos de aprendizado e memória (Maren, 1999; Bear *et al.*, 2002).

A amígdala faz inúmeras conexões com outras regiões encefálicas responsáveis pela consolidação da memória. Ela recebe informações do núcleo geniculado medial do tálamo (auditivo), do córtex perirrinal (visual), do córtex insular (gustatório e somatossensorial), do núcleo talâmico posterior (somatossensorial), do hipocampo (memória espacial e contextual) e do córtex piriforme (olfatório), assim as informações provenientes de todos os sistemas sensoriais chegam a amígdala, particularmente aos núcleos basolaterais (Maren, 1999; McGaugh, 2002).

Cada sistema sensorial apresenta um padrão de projeções diferentes para os núcleos da amígdala e interconexões dentro da amígdala, que permitem a integração de informações provenientes de diferentes sistemas sensoriais. Duas grandes vias, a *via amigdalofugal ventral* e a *estria terminal* conectam a amígdala com o hipotálamo (Paxinos & Watson, 1986; Sah *et al.*, 2003).

As áreas relacionadas com a memória declarativa incluem, córtex entorrinal, córtex parahipocampal e o hipocampo. Projeções entre a

amígdala e estas estruturas são recíprocas e fortes (McDonald, 1998; Pitkänen, 2000). A informação proveniente do hipocampo para a amígdala origina-se principalmente na região subicular e os núcleos basais são os principais alvos (Sah *et al.*, 2003).

Está estabelecido que a amígdala, especialmente o complexo basolateral, tem um papel crucial na aquisição e na expressão de respostas comportamentais relacionadas com o medo. Assim, lesões na amígdala de ratos, impedem a formação da memória no medo condicionado Pavloviano (Blanchard & Blanchard, 1972, Sah *et al.*, 2003).

Portanto, as alterações morfofisiológicas que ocorrem na amígdala após um aprendizado podem influenciar na consolidação da memória em outras regiões cerebrais (McGaugh, 2002). Manipulações farmacológicas na amígdala também podem influenciar na modulação da memória. Assim, a injeção de lidocaína na amígdala, prejudica a consolidação, mas não a evocação da memória na esquiva inibitória (Parent & McGaugh, 1994).

A amígdala está mais envolvida com os aspectos emocionais do aprendizado, enquanto o hipocampo está mais relacionado com os aspectos espaciais e contextuais de uma tarefa, embora é evidente que a consolidação da memória envolve interações entre os sistemas neurais (McGaugh, 2000).

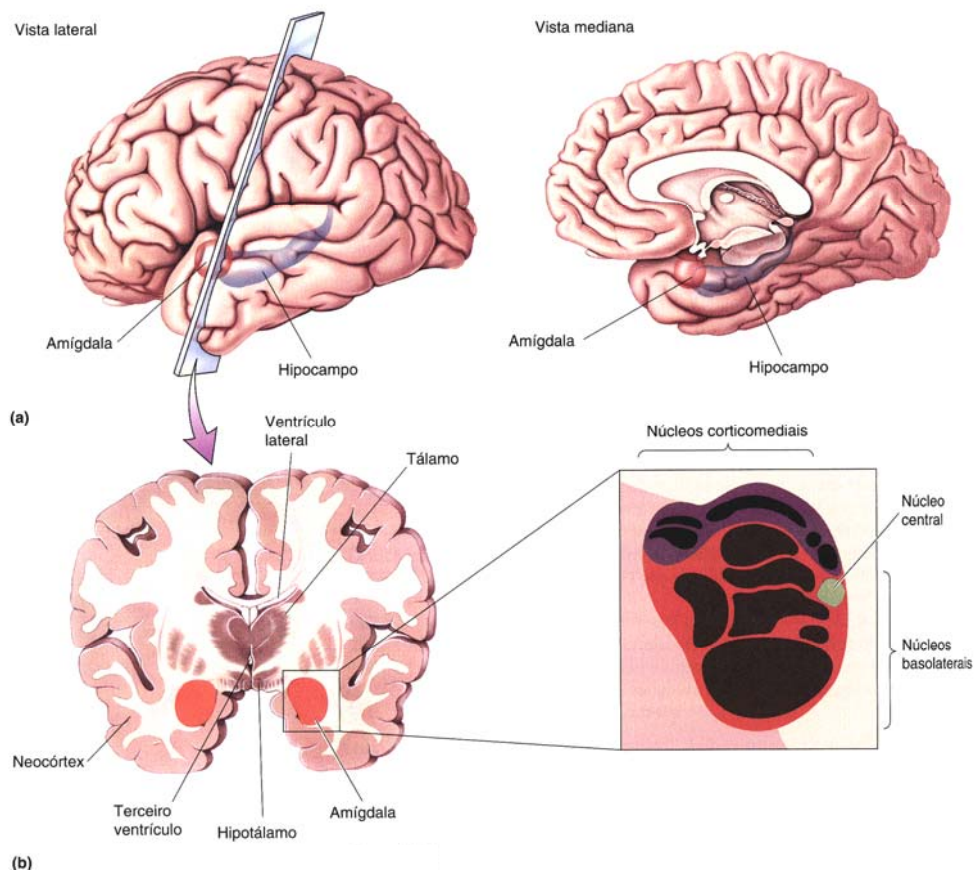


Fig. I.2- Amígdala, (a) vistas laterais e mediais do lobo temporal mostrando a localização da amígdala, (b) uma secção coronal na altura da amígdala e um esquema demonstrando os núcleos basolaterais, corticomediais e central (adaptado de Bear *et al.*, 2002).

I.2 – RECEPTOR N-METIL-D-ASPARTATO – NMDA

O receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) é um subtipo de receptor glutamatérgico formado por subunidades heteroméricas que agrupadas formam um poro central com condutância seletiva para cálcio (Ca^{2+}) e sódio (Na^+). O NMDA possui várias subunidades denominadas NR1 (onde se liga a glicina), NR2 (A-D) (onde se liga o glutamato) e NR3 (A-B) (Yamakura & Shimoji, 1999; Prybylowski & Wenthold, 2004). A ativação deste receptor resulta no influxo de Ca^{2+} e Na^+ bem como no efluxo de potássio (K^+), ocasionando a despolarização celular (Scatton, 1993; Ozawa *et al.*, 1998).

No potencial de repouso o canal está bloqueado por íons Mg^{2+} (Riedel *et al.*, 2003), impedindo a passagem de outros íons através do canal NMDA. O Mg^{2+} sai do poro somente quando a membrana está despolarizada. Sendo assim, é necessária uma despolarização prévia dos receptores glutamatérgicos pós-sinápticos do tipo AMPA para que haja a ativação do canal NMDA. Portanto, a entrada de íons através do canal NMDA é dependente de voltagem, além de ser ativada por neurotransmissor (Bear *et al.*, 2002). Este bloqueio voltagem-dependente do canal do NMDA por Mg^{2+} pode ser visto como um mecanismo protetor intrínseco contra a entrada excessiva de Ca^{2+} na célula e subsequente toxicidade neuronal (Scatton *et al.*, 1991).

A entrada de Ca^{2+} no terminal pré-sináptico ocasiona a liberação de neurotransmissores, incluindo o glutamato, na fenda sináptica. O

glutamato ativa seus diversos tipos de receptores permitindo o influxo de Na^+ e Ca^{2+} para o interior do neurônio pós-sináptico.

O receptor NMDA é modulado por vários compostos, tanto endógenos quanto exógenos, os quais se ligam em sítios específicos associados a este receptor. Dentre estes, existem sítios de ligação para agonistas e antagonistas, tais como glutamato/NMDA, sítio onde se liga dizocilpina (MK-801) e Mg^{2+} (produzindo bloqueio voltagem-dependente do canal), sítio modulatório para a glicina (co-agonista do receptor NMDA) e zinco, bem como sítios de ligação para poliaminas (Ranson & Stec, 1988; Shing *et al.*, 1990; Williams *et al.*, 1991; Riedel *et al.*, 2003) (Fig. 1.3).

O influxo de cálcio que acompanha a ativação do receptor NMDA também é responsável pela ativação de proteínas quinases dependentes de cálcio como proteína quinase C e a proteína quinase dependente de cálcio-calmodulina II, as quais são responsáveis por algumas respostas celulares mediadas pelo receptor NMDA, que inclui plasticidade sináptica (Bliss & Collingridge, 1993; Izquierdo & Medina, 1995; Elgersma & Silva, 1999; Teyler, 1999; McGaugh & Izquierdo, 2000).

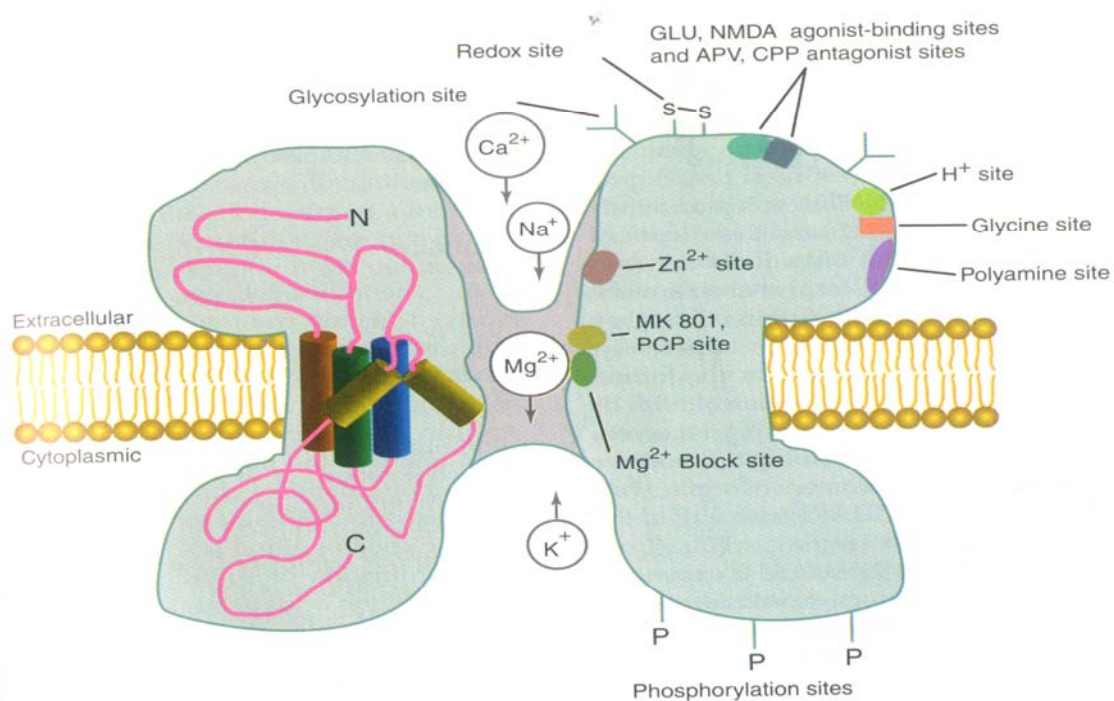


Fig. I.3 – Representação esquemática do receptor NMDA (adaptado de Zigmond *et al*, 1999).

I.2.1 – PAPEL DO RECEPTOR NMDA NA MEMÓRIA

Tem sido proposto que receptor NMDA desempenha um papel fundamental para os processos de aprendizagem e memória, uma vez que a administração sistêmica ou intracerebral de bloqueadores do receptor NMDA alteram o aprendizado e a memória de ratos em diversas tarefas (Izquierdo & Medina, 1995, 1997). Podemos citar como exemplo que a injeção intracérebroventricular de um antagonista do receptor NMDA, ácido-D-2-amino-5-fosfonopentanóico (AP5), causa prejuízo no desempenho dos ratos no labirinto aquático de Morris (Morris *et al.*, 1986). Efeito similar foi demonstrado para este composto na tarefa de esquiva inibitória quando injetado na amígdala (Izquierdo *et al.*, 1992, Jerusalinsky *et al.*, 1992).

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

De modo geral, antagonistas do receptor NMDA apresentam ação dependente do tempo. Assim, o AP5 prejudica a aquisição e o início da consolidação, mas não é capaz de alterar a evocação da memória na tarefa de esquiva inibitória em ratos (Izquierdo *et al.*, 1992; Jerusalinsky *et al.*, 1992; Izquierdo & Medina, 1995).

A administração de AP5 imediatamente antes do treino, e antes do teste, no núcleo basolateral da amígdala também bloqueia a aquisição e a expressão do medo condicionado contextual (Fanselow & Kim, 1994; Maren *et al.*, 1996). Desta forma, a ativação dos receptores NMDA na amígdala é importante para o aprendizado do medo condicionado, embora as cascatas moleculares que regulam estes receptores e seu envolvimento na consolidação da memória do medo ainda não estejam bem esclarecidas (Lee & Kim, 1998; Malkani & Rosen, 2001).

O receptor NMDA obviamente não trabalha sozinho. Neurônios colinérgicos, opióides e noradrenérgicos da amígdala e neurônios colinérgicos no hipocampo e GABAérgicos em ambos também têm sido apontados no processo de consolidação da memória (Izquierdo, 1991; McGaugh, 2002). A administração intra-amígdala de oxotremorina (agonista colinérgico muscarínico), e propranolol (bloqueador β -adrenérgico), respectivamente facilitaram e prejudicaram o desempenho dos ratos em tarefas de memória (Salinas *et al.*, 1997). Contudo a injeção intracerebroventricular do agonista GABAérgico baclofen prejudicou a retenção de memória em ratos (Zarrindast *et al.*, 2001).

Como veremos a seguir, as poliaminas são moduladores endógenos do canal NMDA e exercem um importante papel na modulação da memória.

I.3 – POLIAMINAS

I.3.1 – ESTRUTURA E METABOLISMOS DAS POLIAMINAS

As poliaminas são aminas alifáticas simples compostas por uma, duas ou três cadeias carbonadas flexíveis, as quais são conectadas por átomos de nitrogênio. Elas também apresentam grupamentos amino primário nas extremidades da cadeia carbonada. Como mostra a figura I.4, putrescina (1,4-diaminobutano) é uma di-amina primária, espermidina (mono-*N*-3-aminopropil-1,4-diaminobutano) é uma tri-amina e espermina (bis-*N*-3-aminopropil-1,4-diaminobutano) é uma tetra-amina, todas contêm grupamentos aminos primários ou secundários (Carter, 1994; Teti *et al.*, 2002).

Estes grupos amino das poliaminas conferem um caráter fortemente básico às mesmas. Em pH fisiológico, elas encontram-se completamente protonadas, resultando em cátions orgânicos de baixo peso molecular.

As poliaminas são encontradas em todas as células eucarióticas, incluindo células do sistema nervoso de vertebrados. Estas moléculas foram descobertas em 1678 por Lewenhoek que observou a presença de fosfato de espermina cristalizado em sêmen frio e seco (Lewenhoek, 1678).

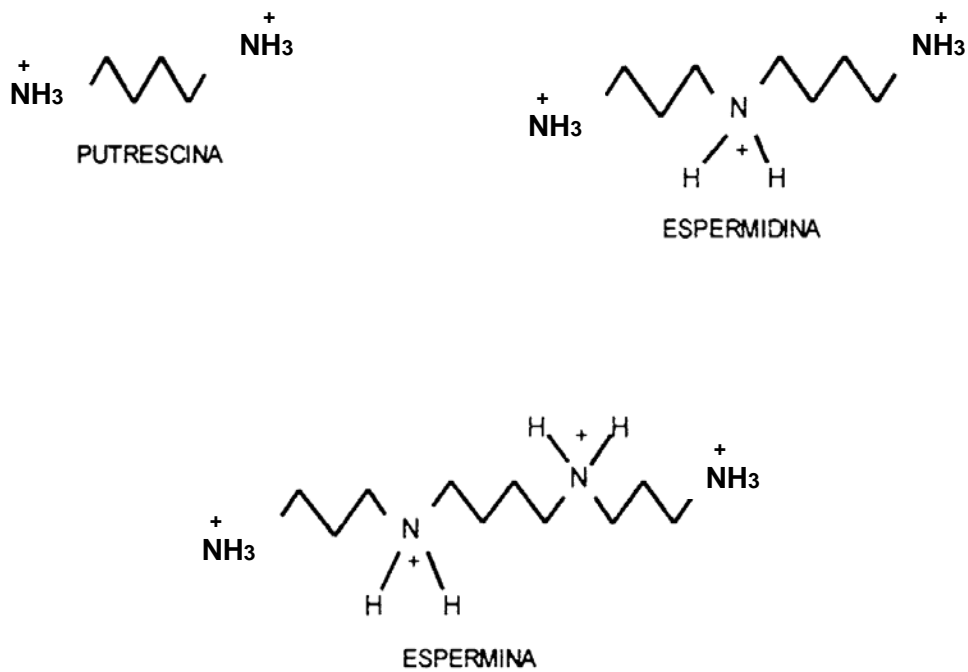


Fig. I.4 - Estrutura química das poliaminas (adaptado de Williams, 1997).

O aminoácido ornitina é o principal precursor das poliaminas endógenas. No fígado, a ornitina participa do ciclo da uréia, no qual a enzima arginase converte arginina em ornitina, resultando na liberação de uréia. A ornitina formada pode então ser convertida em citrulina pela adição do grupo carbamil fosfato originado, em reação catalisada pela ornitina carbamil transferase, a qual está ausente nos neurônios (Stryer, 1981; Bredt & Snyder, 1992).

No encéfalo de vertebrados, a ornitina é formada a partir da clivagem hidrolítica do aminoácido arginina em uma reação catalisada pela arginase (Fig. I.5) (Seiler, 1981; Carter, 1994; Seiler, 1994).

A ornitina formada é então descarboxilada por ação da enzima ornitina descarboxilase, dando origem à putrescina, precursora da espermidina e da espermina. A enzima espermidina sintase transfere um grupo aminopropil da S-adenosil-metionina descarboxilada (SAM-D) para a putrescina, dando origem a espermidina. A espermidina formada pode vir a sofrer ação da enzima espermina sintase, a qual transfere um segundo grupo aminopropil de outra molécula de SAM-D para a espermidina originando a espermina (Tabor & Tabor, 1984; Seiler, 1994).

Esta rota de síntese de poliaminas é reversível, ou seja, a espermina pode ser convertida em espermidina e esta em putrescina. O primeiro passo desta interconversão é a acetilação da espermina na posição N1. Após este passo, a poliamina acetilada sofre quebra oxidativa, liberando

os grupos aminopropil provenientes da SAM-D por ação da enzima poliamina oxidase (Seiler, 1994).

Estudos têm demonstrado que a rota de interconversão de poliaminas no SNC é responsável por 70% da putrescina formada a partir da espermidina, enquanto somente 30% da putrescina é formada pela descarboxilação da ornitina (Seiler & Bolkenius, 1985; Carter, 1994).

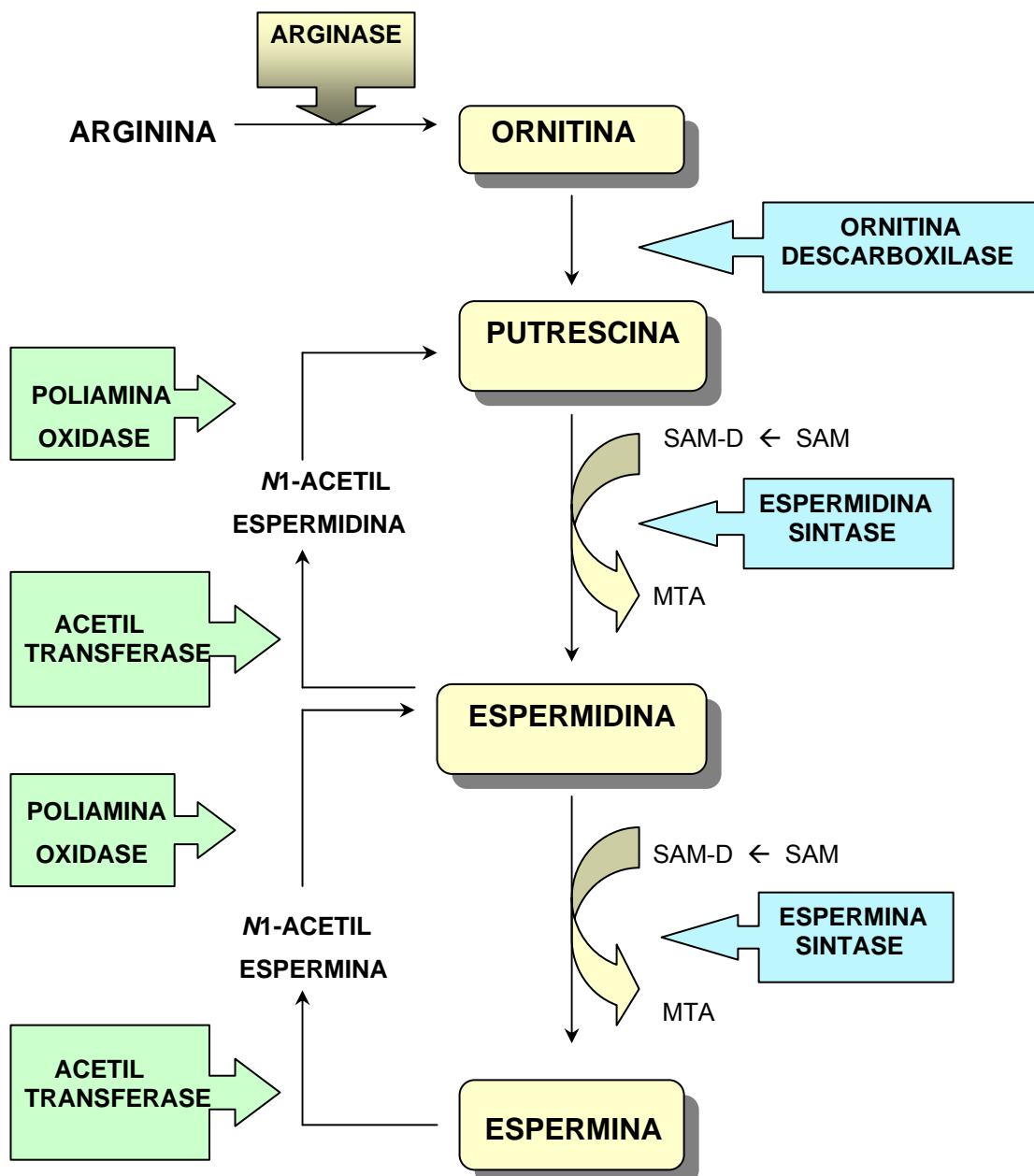


Fig. I.5 -. Biossíntese e ciclo de interconversão das poliaminas. S-adenosilmetionina (SAM); S-adenosilmetionina descarboxilada (SAM-D); metiltoadenosina (MTA) (adaptado de Carter, 1994 e Rock & MacDonald, 1995).

O catabolismo terminal das poliaminas é catalisado por amino-oxidases dependentes de cobre. Pela desaminação oxidativa do grupamento amino primário, cada intermediário do ciclo da interconversão pode ser transformado em um aldeído, que é posteriormente oxidado em um aminoácido ou em um grupamento gama-lactâmico. Os produtos finais do catabolismo das poliaminas, bem como as poliaminas acetiladas, podem então ser excretadas na urina (Carter, 1994, Teti *et al.*, 2002).

I.3.2 – FUNÇÃO DAS POLIAMINAS

As poliaminas estão amplamente distribuídas no sistema nervoso central (tabela I.1). Como a troca de poliaminas entre o sangue e o cérebro é bastante limitada, acredita-se que apenas uma pequena fração de poliaminas encefálicas provenha de tecidos periféricos. Portanto, se supõe que no SNC haja um sistema fechado que metaboliza as poliaminas (Shin *et al.*, 1985; Diler *et al.*, 1993).

Estudos recentes mostram que a espermina e a espermidina diminuem a lipoperoxidação induzida por alguns agentes pró-oxidantes (Bellé *et al.*, 2004). As poliaminas também estão envolvidas nos processos de crescimento e diferenciação celulares por ativação da síntese do RNA e da síntese protéica (Campbel *et al.*, 1978; Tabor & Tabor, 1984; Grilo, 1985; Celano *et al.*, 1989) e morte celular programada ou apoptose (Ha *et al.*, 1997). Assim, não é surpreendente o fato de suas

concentrações estarem aumentadas no cérebro em casos de tumores cerebrais (Seiler, 1981). Morrison e Kish em 1995 mostraram que os níveis de poliaminas no cérebro estão alterados em pacientes com doença de Alzheimer.

Tabela I.1. Distribuição de poliaminas no cérebro de ratos adultos

	Putrescina (nmol g ⁻¹)	Espermidina (nmol g ⁻¹)	Espermina (nmol g ⁻¹)
Córtex frontal	9,4 ± 1,3	235 ± 22	221 ± 20
Hipocampo	7,1 ± 1,2	420 ± 107	334 ± 64
Hipotálamo	22,9 ± 2,0	591 ± 109	253 ± 54
Bulbo	3,7 ± 0,8	1016 ± 77	157 ± 33
Cerebelo	13,0 ± 1,3	674 ± 58	381 ± 47

Valores expressos como média ± desvio padrão.

Dados retirados de Seiler & Schmitd-Glenewinkel, 1975.

Diversos estudos apontam as poliaminas como neurotransmissores e neuromoduladores (Williams *et al.*, 1991; Alexander *et al.*, 1992; Carter, 1994). Isto se deve ao fato das poliaminas serem armazenadas em vesículas sinápticas e liberadas de maneira cálcio-dependente, seguindo um estímulo químico ou elétrico. Além disso, há um sistema de recaptção de poliaminas de alta afinidade, que regula o nível extracelular e o tempo de efeito das poliaminas (Harman & Shaw, 1981; Seiler, 1994;

Williams *et al.*, 1989, 1991,1997; Cullis *et al.*, 1999; Reis & Regunathan, 2000).

A natureza policatiônica das poliaminas possibilita sua interação com ânions. Acredita-se que, por interagir com sítios aniônicos de macromoléculas, as poliaminas regulem, entre outras funções fisiológicas, o crescimento e diferenciação celular e o fluxo de íons por canais iônicos no SNC (Tabor & Tabor, 1984; Johnson, 1996; Williams, 1997; Patocka & Kuehn, 2000; Urdiales *et al.*, 2001).

O principal foco de estudo das poliaminas se deve a sua interação com o receptor NMDA, especialmente com a subunidade NR2B (Coughenour & Barr, 2001). Além disso, as poliaminas podem interagir com canais de potássio e com os receptores glutamatérgicos do tipo AMPA e cainato (Williams *et al.*, 1990, 1991; Scott *et al.*,1993; Williams, 1997; Pellegrini-Giampietro, 2003).

Espermina e espermidina atuam sobre o receptor NMDA de maneira bifásica, sugerindo dois efeitos distintos das poliaminas. A espermina, em altas concentrações não potencializa a ligação do [³H]MK-801, enquanto que baixas concentrações de espermina aumentam a condutância do receptor NMDA, por aumentar a frequência de abertura do canal (Rock & MacDonald, 1995; Johnson, 1996; Williams, 1997). Esta ação complexa das poliaminas sobre o receptor NMDA sugere que possa haver mais de um sítio de ligação de poliaminas associado a este receptor (Shing *et al.*, 1990; Yoneda & Ogita, 1991; Johnson, 1996; Worthen *et al.*, 2001).

A figura I.6 apresenta o esquema das possíveis ações modulatórias da espermina sobre o receptor NMDA (Johnson, 1996). Nesta figura podemos observar os quatro possíveis sítios de ligação das poliaminas no receptor NMDA:

Sítio 1: as poliaminas aumentam as correntes induzidas por glutamato na presença de concentrações saturantes de glicina;

Sítio 2: estimulação glicina-dependente: as poliaminas aumentam a afinidade do receptor pela glicina;

Sítio 3: uma inibição voltagem dependente, ou por diminuição da condutância do canal, ou como resultado de seu caráter catiônico na entrada do poro, ou por um bloqueio do canal aberto em um sítio dentro do poro como faz o magnésio;

Sítio 4: inibição da afinidade do receptor pelo glutamato.

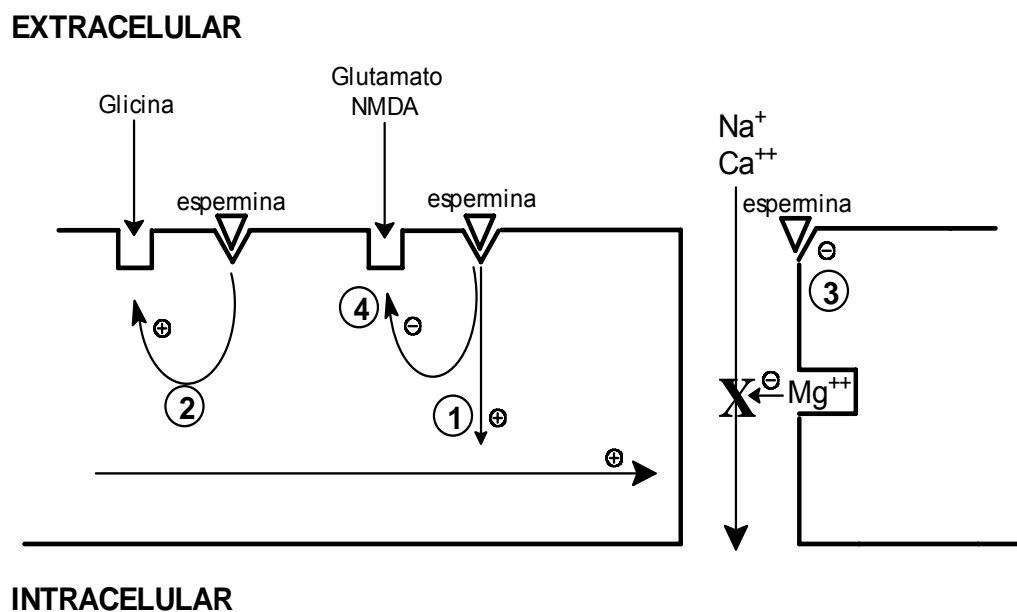


Fig. I.6 - Esquema de ações modulatórias da espermina sobre o receptor NMDA (adaptado de Johnson, 1996). \oplus Ação estimulatória das poliaminas; \ominus ação inibitória das poliaminas.

Rock & MacDonald (1995) relatam que os três antagonistas dos sítios das poliaminas no receptor NMDA testados (arcaína, dietilenotriamina e putrescina) reduzem as correntes através do receptor NMDA, reduzindo a condutância do mesmo, sempre na ausência de agonistas do sítio das poliaminas. Dessa maneira, em altas concentrações, as poliaminas podem ter os mesmos efeitos que seus antagonistas.

Além disso, há estudos que mostram o envolvimento das poliaminas na modulação da memória (Shimada *et al.*, 1994; Khish *et al.*, 1998a; Khish *et al.*, 1998 b; Meyer *et al.*, 1998; Rubin *et al.*, 2000; Rubin *et al.*, 2001). Assim, altas doses de poliaminas (125-250 nmol), administradas por via intracerebroventricular, causam dano hipocampal, déficit de aprendizado e também potencializam a diminuição do aprendizado induzida por dizocilpina em ratos nas tarefas do labirinto aquático de Morris e do labirinto em T de 14 braços (Shimada *et al.*, 1994; Conway, 1998). Estes dados corroboram outros estudos que têm demonstrado que altos níveis de poliaminas cerebrais são neurotóxicas (Anderson *et al.*, 1975; Halonen *et al.*, 1993) e, conseqüentemente, reduzem o aprendizado e a memória.

Por outro lado, a espermidina é capaz de atenuar o déficit de memória induzido por antagonistas NMDA (Kishi *et al.*, 1998a; Meyer *et al.*, 1998), bem como, por antagonistas muscarínicos e glutamatérgicos metabotrópicos (Kishi *et al.*, 1998b). Mikolajczac e colaboradores (2002)

também demonstraram que a espermidina melhora a memória de curta duração em ratos.

A administração intra-hipocampal e intra-amigdalar de espermidina (0.02-20 nmol) imediatamente após o treino, melhora a memória dos ratos na tarefa de esquiva inibitória. Enquanto que a arcaína (antagonista do sítio das poliaminas no receptor NMDA) é capaz de reduzir a memória e reverter o efeito facilitatório causado pela espermidina nesta tarefa (Rubin *et al.*, 2000; Rubin *et al.*, 2001).

Apesar dos receptores NMDA amigdalares estarem envolvidos na memória do medo, os estudos com moduladores endógenos do receptor NMDA, como as poliaminas, tem um papel pouco conhecido no aprendizado do medo condicionado Pavloviano. Também não se sabe ao certo sobre o período de tempo que o processamento da memória no hipocampo é sensível às poliaminas, e se as poliaminas afetam a evocação da memória.

II. OBJETIVOS

II.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da administração intra-amígdala das poliaminas, arcaína e espermidina sobre as fases de aquisição e consolidação da memória em ratos utilizando o teste do medo condicionado clássico e estudar o efeito da administração intra-hipocampal da espermidina sobre as fases de aquisição, consolidação e evocação da memória em ratos utilizando a tarefa de esquiva inibitória.

II.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Investigar os efeitos produzidos pela arcaína, antagonista do sítio das poliaminas no receptor NMDA, sobre as fases de aquisição e consolidação da memória em ratos, utilizando o teste do medo condicionado.
- ❖ Examinar o efeito da administração intra-amígdala da poliamina espermidina sobre as fases de aquisição e consolidação da memória em ratos, utilizando o teste do medo condicionado.
- ❖ Investigar o papel do receptor NMDA nos possíveis efeitos induzidos pela espermidina, utilizando o teste do medo condicionado.

- ❖ Examinar o efeito da administração intra-amígdala de arcaína e espermidina sobre a ansiedade, sensibilidade ao choque, atividade motora.

- ❖ Avaliar o efeito da administração intra-hipocampal de espermidina sobre as fases de aquisição, consolidação e evocação da memória em ratos na tarefa de esquiva inibitória.

- ❖ Avaliar o efeito da administração intra-hipocampal de espermidina sobre a atividade motora, exploratória, sensibilidade ao choque e ansiedade dos animais.

III. ARTIGO 1

The Journal of Neuroscience, 24(9): 2328-2334, 2004.

IV. ARTIGO 2

Neurobiology of Learning and Memory, *in press*.

V. DISCUSSÃO

No presente estudo, nós mostramos que as poliaminas amigdalares endógenas estão envolvidas na aquisição e/ou início da consolidação do medo condicionado, uma vez que a administração de arcaína antes ou imediatamente após o treino da tarefa de medo condicionado diminuiu a resposta de imobilidade dos ratos nas sessões de teste do medo condicionado contextual e do medo condicionado ao tom.

Interessantemente, a dose de arcaína que causou piora na retenção do medo condicionado (0,02 nmol, após o treino) é a mesma que piora a performance dos ratos na esQUIVA inibitória (Rubin *et al.*, 2001). Isto sugere que as poliaminas amigdalares têm um importante papel na consolidação de ambas as tarefas. Entretanto, a potência da arcaína varia entre as duas tarefas, uma vez que a dose de 0,2 nmol de arcaína piora a performance na esQUIVA inibitória (Rubin *et al.*, 2001), mas não no medo condicionado. A razão desta diferença entre as duas tarefas ainda é desconhecida, mas pode ser devido a diferentes intensidades de choque entre as tarefas (0,6 mA no medo condicionado e 0,4 mA na esQUIVA inibitória). Da mesma maneira, sabe-se que o efeito amnésico de uma única dose de AP5 injetada intra-amígdala depende da intensidade do choque usado (Walker & Davis, 2000).

A administração intra-amígdala de espermidina antes do treino, ou imediatamente após o treino, aumentou a percentagem de imobilidade dos animais tanto para o medo condicionado ao contexto como para o

medo condicionado ao tom, de maneira dose-dependente. As doses de espermidina acima de 0,2 nmol (antes do treino) e de 2-20 nmol (após o treino) fizeram com que a percentagem de respostas de imobilidade dos animais retornasse aos valores encontrados para o grupo controle. É de se destacar que a forma da curva dose-resposta para a espermidina tem o formato de U-invertido, e que é a imagem especular da curva obtida para o antagonista do sítio das poliaminas, arcaína. A curva dose-resposta para a espermidina na tarefa do medo condicionado tem o mesmo formato que a obtida para a tarefa de esquiva inibitória (Rubin *et al.*, 2001), sugerindo que baixas doses de poliaminas regulam a função amigdalár, provavelmente através da modulação dos receptores NMDA. O fato da arcaína, em uma dose que não teve efeito *per se* no condicionamento ao contexto e ao tom, ter revertido o aumento do medo condicionado induzido pela administração pré-treino e pós-treino de espermidina, sugere o envolvimento dos receptores NMDA para os efeitos descritos para a espermidina.

Evidências neuroquímicas e eletrofisiológicas indicam que as poliaminas modulam o receptor NMDA de maneira bifásica (Williams *et al.*, 1991; Rock & MacDonald, 1995; Williams, 1997). Concentrações micromolares de poliaminas, aumentam a ligação de [³H]MK-801 e [³H]TCP no receptor NMDA, enquanto que altas concentrações de poliaminas não alteram a ligação destes compostos, resultando numa curva dose-resposta bifásica (Ranson & Stec, 1988; Sacaan & Jonhson,

1990; Williams, 1997). Assim, baixas concentrações de poliaminas aumentam as respostas mediadas pelo receptor NMDA, enquanto que altas doses tendem a inibir as respostas mediadas por este receptor (McGurk *et al.*, 1990; Sprosen & Woodruff, 1990; Williams, *et al.*, 1990; Rock & MacDonald, 1995). Contudo, o fato das poliaminas causarem efeitos eletrofisiológicos e neuroquímicos bifásicos no receptor NMDA *in vitro* e no medo condicionado, não implica que haja uma relação causa-efeito entre estes fenômenos. Deve-se considerar que as poliaminas também regulam de maneira bifásica os receptores do tipo AMPA (Pellegrini-Giampietro, 2003). Entretanto, esta regulação ocorre de maneira inversa àquela do receptor NMDA. Ou seja, baixas concentrações de poliaminas inibem, enquanto que altas concentrações aumentam a condutância iônica no receptor AMPA. Como está descrito que a ativação de receptores ionotrópicos não-NMDA amigdalares facilita a aquisição do medo condicionado (Rogan *et al.*, 1997), é pouco provável o envolvimento do receptor AMPA no efeito facilitador das poliaminas. Assim, se a espermidina atuasse no medo condicionado via receptor AMPA, seria esperado que ela causasse uma redução na aquisição do mesmo, uma vez que baixas doses de poliaminas inibem a condutância iônica no receptor AMPA. Portanto, o envolvimento de receptores AMPA no efeito facilitador da memória seria incongruente com os efeitos eletrofisiológicos descritos para as poliaminas no receptor AMPA.

No segundo artigo, nós mostramos que a espermidina modula a aquisição ou início da consolidação da memória na tarefa de esquiva inibitória. Assim a administração intra-hipocampal de espermidina (0,2 nmol) melhorou a performance dos ratos na tarefa de esquiva inibitória, apenas quando administrada 30 minutos antes do treino, e imediatamente após o treino. Por outro lado, a administração intra-hipocampal de espermidina 6 horas após o treino ou 10 minutos antes do teste não alterou a performance dos ratos na mesma tarefa, sugerindo que o efeito modulatório da memória pela espermidina na esquiva inibitória esteja limitada a uma janela temporal.

Os resultados deste trabalho não só confirmam achados prévios de que a administração intra-hipocampal de espermidina imediatamente após o treino melhora a performance dos ratos na tarefa de esquiva inibitória (Rubin *et al.*, 2000), como demonstram que o papel modulatório das poliaminas na memória é dependente do tempo. Outros compostos também apresentam ação tempo-dependente para a tarefa de esquiva inibitória. Assim, o CNQX, um antagonista do receptor AMPA, é amnésico quando administrado no hipocampo 0, 90 ou 180 minutos após o treino ou imediatamente antes do teste, mas não apresenta efeito quando administrado 360 minutos após o treino (Jerusalinsky *et al.*, 1992; Bianchin *et al.*, 1994). Além disso, o MCPG, um antagonista de receptores glutamatérgicos metabotrópicos, é amnésico somente quando injetado imediatamente após o treino, enquanto que a administração de ACPD, um

agonista de receptores glutamatérgicos metabotrópicos, melhora a performance dos ratos na esquiva inibitória quando administrado imediatamente após o treino (Bianchin *et al.*, 1994).

De modo geral, antagonistas do receptor NMDA também apresentam ação dependente do tempo. Assim, o AP5, um antagonista competitivo do receptor NMDA, causa amnésia quando injetado no hipocampo 15 minutos antes do treino, imediatamente após o treino, mas não é capaz de causar amnésia quando injetado 90 minutos após o treino, ou imediatamente antes do teste, na tarefa de esquiva inibitória em ratos (Izquierdo *et al.*, 1992; Jerusalinsky *et al.*, 1992; Izquierdo & Medina, 1995). No presente estudo, observamos que a espermidina causou melhora da memória apenas quando administrada no hipocampo 30 minutos antes ou imediatamente após o treino, e não teve efeito 6 horas após o treino, ou antes do teste. Assim pode-se afirmar que a janela temporal de ação da espermidina sobre a memória é similar àquela dos antagonistas do receptor NMDA.

O fato de a espermidina melhorar a memória dentro de uma janela temporal coincidente com antagonistas do receptor NMDA não necessariamente implica no seu envolvimento com este receptor. No entanto, está bem estabelecido que a administração intra-hipocampal de arcaína, imediatamente após o treino na esquiva inibitória causa amnésia e previne a melhora da memória causada pela espermidina (Rubin *et al.*,

2000). Este fato constitui evidência relevante do envolvimento do receptor NMDA na melhora da memória causada pela espermidina.

Experimentos com camundongos transgênicos demonstram que a superexpressão da subunidade NR2B dos receptores NMDA, ao qual as poliaminas se ligam (Coughenour & Barr, 2001), melhora o desempenho desses animais em testes comportamentais de memória, como o medo condicionado e o labirinto aquático de Morris (Tang *et al.*, 1999).

O receptor NMDA também está diretamente envolvido na formação do óxido nítrico (East & Garthwaite, 1991), o qual apresenta um papel importante para os processos de aprendizado e memória (Bohme *et al.*, 1993; Prendergrast *et al.*, 1997). De fato, inibidores da óxido nítrico sintase (NOS) pioram a aquisição e a consolidação da memória na tarefa de esQUIVA inibitória (Bernabeu *et al.*, 1995). Em 1994, Hu *et al.*, demonstraram que as poliaminas são inibidores da NOS e este fato poderia explicar o déficit de memória causado pela arcaína neste trabalho, mas não o efeito bifásico da arcaína e da espermidina. Além disso, apesar da arcaína e da espermidina serem inibidoras da NOS, o efeito destas poliaminas sobre a memória é marcadamente antagônico, o que praticamente afasta um possível envolvimento da NOS nos efeitos mnemônicos da espermidina e da arcaína. Contudo, não podemos excluir um envolvimento do óxido nítrico na melhora da memória causada pela espermidina, particularmente em vista da relação estreita entre a NOS e o receptor NMDA (Aarts *et al.*, 2002). Ou seja, doses baixas de

espermidina, como as utilizadas neste trabalho, poderiam aumentar a síntese de óxido nítrico via receptor NMDA e melhorar a memória, enquanto que doses altas poderiam inibir a NOS, piorando a memória. No entanto, mais estudos são necessários para esclarecer a interação entre as poliaminas e o óxido nítrico, no que se refere aos processos de aquisição, consolidação e evocação da memória.

A principal preocupação em tarefas de aprendizados aversivos, particularmente quando se investiga o efeito de drogas na fase de aquisição, é saber se o tratamento farmacológico afeta os aspectos motivacionais do aprendizado, como a sensibilidade ao choque e a ansiedade. Neste estudo foi demonstrado que a arcaína e a espermidina (em doses que alteram o medo condicionado) e a espermidina (em dose que melhora a memória dos ratos na esQUIVA inibitória) não alteraram a sensibilidade ao choque, a ansiedade e a locomoção dos animais. Todas as medidas comportamentais indicaram que a arcaína e a espermidina afetaram especificamente a aquisição ou o início da consolidação (ou ambos) da tarefa do medo condicionado e esQUIVA inibitória, e não alteraram os aspectos motivacionais do aprendizado.

Os resultados deste estudo não só mostram que as poliaminas possuem ação relevante na modulação do aprendizado e da memória como abrem um leque de possibilidades de estudos complementares sobre as funções das poliaminas. Assim, embora a participação da amígdala na modulação de memórias espaciais possa ser explicada pela

interconexão neural entre a amígdala e outras estruturas do córtex medial ou do neocórtex, seria importante investigar mais a respeito do papel das poliaminas endógenas na amígdala e em outras estruturas cerebrais, e especialmente qual o papel das poliaminas endógenas na evocação e extinção da memória do medo. Outra investigação importante é se a janela temporal sensível as poliaminas no hipocampo é a mesma sensível as poliaminas amigdalares, tendo em vista que não se sabe se a ação modulatória das poliaminas na memória é dependente da estrutura e/ou da ativação dos receptores NMDA.

A diminuição do medo condicionado induzida pela arcaína pode ter aplicações terapêuticas, uma vez que fármacos que interrompem os processos de consolidação podem ser usados no tratamento da síndrome de estresse pós-traumático (Walker *et al.*, 2002).

Enfim, sabendo que as poliaminas são agentes modulatórios da memória e que seu metabolismo está alterado em processos patológicos, como na doença de Alzheimer e na síndrome de Down, aprofundar o conhecimento sobre este assunto poderia contribuir para o tratamento destas e de outras doenças que levam ao prejuízo da memória.

VI. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que:

- ❖ A arcaína, antagonista do sítio das poliaminas no receptor NMDA, administrada intra-amígdala prejudicou a aquisição e a consolidação da memória dos ratos no teste do medo condicionado.
- ❖ A espermidina, administrada intra-amígdala, melhorou a aquisição e a consolidação da memória dos ratos no teste do medo condicionado.
- ❖ A arcaína, em uma dose que não apresentou efeito *per se*, reverteu à melhora da memória causada pela espermidina no teste do medo condicionado.
- ❖ A administração intra-amígdala de arcaína e espermidina em doses que alteraram o medo condicionado, não alteraram a ansiedade, sensibilidade ao choque e atividade motora dos animais.
- ❖ A administração intra-hipocampal de espermidina facilitou a memória dos ratos no teste de esquiva inibitória somente nas fases de aquisição e/ou início consolidação e não alterou a consolidação tardia e a evocação da memória.

- ❖ A administração intra-hipocampal de espermidina não alterou a atividade motora, exploratória, sensibilidade ao choque e ansiedade dos animais.

VII. REFERÊNCIAS

- AARTS, M., LIU, Y., LIU, L., BESSHOH, S., ARUNDINE, M., GURD, J. W., WANG, Y., SALTER, M. W. & TYMIANSKI, M. Treatment of ischemic brain damage by perturbing nmda receptor-psd-95 protein interactions. **Science**, **298**: 846–850, 2002.
- ABEL, T. & LATTAL M. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. **Current Opinion in Neurobiology**, **11**: 180–187, 2001.
- ALEXANDER, S. P. H., KENDALL, D. A. & HILL, S. J. Excitatory amino acid-induced phosphoinositide turnover in guinea pig cerebral cortical slices: selective enhancement by spermine of the response to DL-1-aminocyclopentane-trans-1,3-dicarboxilate. **Journal of Neurochemistry**, **59**: 610–615, 1992.
- ANDERSON, D. J., CROSSLAND, J. & SHAW, G. G. The action of sprmidine and spermine on the central nervous systems. **Neuropharmacology**, **14**: 571–577, 1975.
- BEAR, M. F., CONNORS B. W. & PARADISO, M. A. **Neurociência: desvendando o sistema nervoso**. 2^a edição, Porto Alegre: Artmed Editora S.A, 2002.
- BELLÉ, N. A V., DALMOLIN, G. D., FONINI, G., RUBIN, M. A & ROCHA, J. B. T. Polyamines reduces lipid peroxidation induced by different pro-oxidant agents. **Brain Research**, **1008**: 245–251, 2004.
- BERNABEU, R., DE STEIN, M. L., FIN, C., IZQUIERDO, I. & MEDINA J. H. Role of hippocampal NO in the acquisition and consolidation of inhibitory avoidance learning. **NeuroReport**, **6**: 1498–1500, 1995.

- BERNABEU, R., SCHMITZ, P., FAILLACE, M. P., IZQUIERDO, I. & MEDINA, J. H. Hippocampal cGMP and cAMP are differentially involved in memory processing of inhibitory avoidance learning. **NeuroReport**, **7**: 585–588 , 1996.
- BIANCHIN, M., FIN, C., SCHIMITZ, P. K., DA SILVA, R. C., MEDINA, J. H. & IZQUIERDO, I. Memory of inhibitory avoidance in the rat is regulated by glutamate metabotropic receptors in the hippocampus. **Behavioural Pharmacology**, **5**: 356–359, 1994.
- BLANCHARD, D. C. & BLANCHARD, R. J. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. **Journal of Comparative Physiology and Psychology**, **81**: 281–290, 1972.
- BLISS, T. V. P. & COLLINGRIDGE, G. L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, **361**: 31–39, 1993.
- BOHME, G. A., BON, C., LEMAIRE, M., REIBAUD, M., PICOT, O., STUTZMAN, J., DOBLE, A. & BLANCHARD, J. Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, **90**: 9191–9194, 1993.
- BREDT, D. S. & SNYDER, S. H. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. **Neuron**, **8**: 3–11, 1992.
- CAHILL, L. & MCGAUGH, J.L. Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. **Trends in Neurosciences**, **21**: 294–299, 1998.

- CAMPBELL, R. A., BARTOS, D., MORRIS, D. R., DAVES, G. D. JR. & BARTOS, F. Advances in polyamine research. Editora Raven Press, New York, 1ª edição, p. 1–10, 1978.
- CARTER, C. **Neuropharmacology of Polyamines**. Londres: Academic Press, 1994.
- CELANO, P., BAYLIN, S. B. & CASERO JR., R. A. Polyamines differentially modulate the transcription of growth-associated genes in human colon carcinoma cells. **Journal of Biological Chemistry**, **264**: 8922–8927, 1989.
- CHOU, J. C. & LEE, E. C. Differential involvement of hippocampal G-protein subtypes in the memory process of rats. **Neuroscience**, **64**: 5–15, 1995.
- CONWAY, E. C. Brain lesions and delayed water maze learning deficits after intracerebroventricular spermine. **Brain Research**, **800**: 10–20, 1998.
- COUGHENOUR, L. L. & BARR, B. M. Use of trifluoroperazine isolates a [³H]ifenprodil binding site in rat brain membranes with the pharmacology of the voltage-independent ifenprodil site on N-Methyl-D-aspartate receptors containing NR2B subunits. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, **296**: 150–159, 2001.
- CULLIS, P. M., GREEN, R. E., MERSON-DAVIES, L. & TRAVIS, N. Probing the mechanism of transport and compartmentalisation of polyamines in mammalian cells. **Chemistry & Biology**, **6**: 717–729, 1999.

- DALMAZ, C. & NETTO, C.A. **A memória**. *Ciência e Cultura*, **56**: 30–31, 2004.
- DIAS, G. **Antologia Poética**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Agir, 1969.
- DILER, A. S., LEFAUCONNIER, J. M., BERNARD, G., ZIYLAN, Y. Z. & BOURRE, J. M. Transport of a polyamine: spermidine across the blood brain barrier of adult and 6 day old rats. **Journal of Neurochemistry**, **61**: S50B, 1993.
- EAST, S. J. & GARTHWAITE, J. NMDA receptor activation in rat hippocampus induces cyclic GMP formation through the L-arginine-nitric oxide pathway. **Neuroscience Letters**, **123**: 17–19, 1991.
- ELGERSMA, Y. & SILVA A. J. Molecular mechanisms of synaptic plasticity and memory. **Current Opinion in Neurobiology**, **9**: 209–213, 1999.
- FANSELOW M. S. Odors released by stressed rats produce opioid analgesia in unstressed rats. **Behavioral Neuroscience**, **99**: 598–592, 1985.
- FANSELOW, M. S. & KIM, J. J. Acquisition of contextual Pavlovian fear conditioning is blocked by application of an NMDA receptor antagonist D,L-2-amino-5-phosphonovaleric acid to the basolateral amygdala. **Behavioral Neuroscience**, **108**: 210–212, 1994.
- FLOOD, J. F., BAKER, M. L. & DAVIS, J. L. Modulation of memory processing by glutamate receptor agonist and antagonists. **Brain Research**, **521**: 197–202, 1990.

- GRILO, M. A. Metabolism and function of polyamines. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, **17**: 943–948, 1985.
- HA, H. C., WOSTER, P. M., YAGER, J. D. & CASERO JR., R. A. The role polyamines catabolism in polyamine analogue-induced programmed cell death. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **94**: 11557–11562, 1997.
- HALONEN, T., SIVENIUS, J., MIETTINEN, R., HALMEKYTO, M., KAUPPINEN, R., SINERVIRTA, R., ALAKUIJALA, L., ALHONEN, L., MACDONALD, E., JANNE, J. & RIEKKINEN, P.J. Elevated seizure threshold and impaired spatial learning in transgenic mice with putrescine overproduction in the brain. **European Journal of Neuroscience**, **5**: 1233–1239, 1993.
- HARMAN, R. J. & SHAW, G. G. High-affinity uptake of spermine by slices of rat cerebral cortex. **Journal of Neurochemistry**, **36**: 1609–1615, 1981.
- HU, J., MAHMOUD, M. I. & EL-FAKAHANY, E. E. Polyamines inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. **Neuroscience Letters**, **175**: 41–45, 1994.
- IZQUIERDO, I. Different forms of posttraining memory processing. **Behavioural and Neural Biology**, **51**: 171–202, 1989.
- IZQUIERDO, I. Role of NMDA receptors in memory. **Trends in Pharmacological Sciences**, **12**: 128–129, 1991.

IZQUIERDO, I., DA CUNHA, C., ROSAT, R., JERUSALINSKY, D., FERREIRA, M.B.C. & MEDINA, J. H. Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. **Behavioural Neural Biology**, **58**: 16–26, 1992.

IZQUIERDO, I. & MEDINA, J.H. Correlation between the pharmacology of Long-term potentiation and the pharmacology of memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, **63**: 19–32, 1995.

IZQUIERDO, I. & MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology of Learning and Memory**, **68**: 285–316, 1997.

IZQUIERDO, I. **Memória**. Artmed Editora S.A., 2002.

JENSEN, T. S., & SMITH, D. F. Effect of emotions on nociceptive thresholds in rats. **Physiology and Behavior**, **28**: 597–599, 1982.

JERUSALINSKY, K., FERREIRA, M. B., WALZ, R., DA SILVA, R. C., BIACHIN, M., RUSCHEL, A. C., ZANATTA, M. S., MEDINA, J. H. & IZQUIERDO, I. Amnesia by post-training infusion of glutamate receptor antagonists into the amygdala, hippocampus, and enthorrhinal cortex. **Behavioural Neural Biology**, **58**: 76–80, 1992.

JOHNSON, T. D. Modulation of channel function by polyamines. **Trends in Pharmacological Sciences**, **17**: 22–27, 1996.

- KISHI, A., OHNO, M. & WATANABE, S. Concurrent activation of hippocampal glycine and polyamine sites of the *N*-methyl-D-aspartate receptor synergistically reverses working memory deficits in rats. **Neuroscience Letters**, **257**: 131–134, 1998a.
- KISHI, A., OHNO, M. & WATANABE, S. Spermidine, a polyamine site agonist, attenuates working memory deficits caused by blockade of hippocampal muscarinic receptors and mGluRs in rats. **Brain Research**, **793**: 311–314, 1998b.
- LEDOUX, J. E. Emotion circuits in the brain. **Annual Review of Neuroscience**, **23**: 155–184, 2000.
- LEE, H. & KIM, J. J. Amygdalar NMDA receptor are critical for new fear learning in previously fear-conditioning rats. **The Journal of Neuroscience**, **18**: 8444–8454, 1998.
- LESTER, L. S. & FANSELOW, M. S. Exposure to a cat produces opioid analgesia in rats. **Behavioral Neuroscience**, **99**: 756–759, 1985.
- LEWENHOECK, A. Observationes D. Anthonii Lewenhoeck, de Natis è semine genitali Animalculis. **Philosophical Transactions**, **12**: 1040–1043, 1678.
- LORENTE DE NÓ, R. Studies on the structure of the cerebral cortex II. Continuation of the study of the ammonic system. **Journal of Psychology and Neural**, **46**: 113–174, 1934.
- LYNCH, M. A. Long-term potentiation and memory. **Physiological Reviews**, **84**: 87–136, 2003.

MCDONALD, A. J. Cortical pathways to the mammalian amygdala. **Progress in Brain Research**, **55**: 257–332, 1998.

MCGAUGH, J. L. Memory- A century of consolodation. **Science**, **287**: 248–251, 2000.

MCGAUGH, J. L. & IZQUIERDO, I. The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. **Trends in Pharmacological Sciences**, **21**: 208–210, 2000.

MCGAUGH, J. Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective. **Trends in Neurosciences**, **25**: 456–461, 2002.

MALKANI, S. & ROSEN, J.B. N-methyl-D-aspartate receptor antagonism blocks contextual fear conditioning and differentially regulates early growth response-1 messenger RNA expression in the amygdala: implications for a functional amygdaloid circuit of fear. **Neuroscience**, **102**: 853–861, 2001.

MAREN, S., AHARONOV G., STOTE, D. L. & FANSELOW, M. S. N-methyl-D-aspartate receptor in the basolateral amygdala are required for both acquisition and expression of conditioning fear in rats. **Behavioral Neuroscience**, **110**: 1365–1374, 1996.

MAREN, S. Long-term potentiation in the amygdala: a mechanism for emotional learning and memory. **Trends in Neuroscience**, **22**: 561-567, 1999.

- MCGURK, J. F., BENNET, M. V. L. & ZUKIN, R. S. Polyamines potentiate responses of N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus* oocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **87**: 9971–9974, 1990.
- MEYER, R. C., KNOX, J., PURWIN, D. A., PURWIN, A., SPANGLER, E. L. & INGRAN, D. K. Combined stimulation of the glycine and polyamines sites of the NMDA blockade-induced learning deficits of rats in a 14-unit T-maze. **Psychopharmacology**, **135**: 290–295, 1998.
- MIKOLAJCZAK, P., OKULICZ-KOZARYN, I., DAMINSKA, E., NIEDOPAD, L., POLANSKA, A. & GEBKA, J. Effects of acamprosate and some polyamine site ligands of NMDA receptor on short-memory in rats. **European Journal of Pharmacology**, **444**: 83–96, 2002.
- MORRIS, R. G., ANDERSON, E., LYNCH, G. S. & BAUDRY, M. selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. **Nature**, **319**: 774–776, 1986.
- MORRIS, R. G. Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning rats and blockade of long-term potentiation in vivo by de N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. **The Journal of Neuroscience**, **9**: 3040–3057, 1989.
- MORRISON, L. D. & KISH, S. J. Brain polyamine levels are altered in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, **197**: 5–8, 1995.

- OZAWA, S., KAMIYA, H. & TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Progress in Neurobiology**, **54**: 581–618, 1998.
- PARENT, M. B. & MCGAUGH, J. L. Posttraining infusions of lidocaine into the amygdala basolateral complex impairs retention of inhibitory avoidance training. **Brain Research**, **661**: 97–103, 1994.
- PATOCKA, J. & KUEHN, G. D. Natural polyamines and their biological consequence in mammals. **Acta Medical**, **43**: 119, 2000.
- PAXINOS, G. & WATSON, C. The brain in stereotaxic coordinates. 2^a edição. New York: Academic press, 1986.
- PELLEGRINI-GIAMPIETRO, D. E. An activity-dependent spermidine-mediated mechanism that modulates glutamate transmission. **Trends Neuroscience**, **26**: 9–11, 2003.
- PITKÄNEN, A. Connectivity of the rat amygdaloid complex. **In: the amygdala: a functional analysis**. Aggleton JP. Oxford, UK: Oxford University Press, 31–115, 2000.
- PRENDERGRAST, M. A., BUCCAFUSCO, J. J. & TERRY JR, A. V. Nitric oxide synthase inhibition impairs spatial navigation learning and induces conditioned taste aversion. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, **57**: 347–352, 1997.
- PRYBYLOWSKI, K. & WENTHOLD, R.J. N-methyl-D-aspartate receptors: subunit assembly and trafficking to the synapse. **The Journal of Biological Chemistry**, **279**: 9673–9676, 2004.

- RANSON, R. W. & STEC, N. I. Cooperative modulation of [³H]MK-801 binding to the *N*-methyl-D-aspartate receptor-ion channel complex by L-glutamate, glycine and polyamines. **Journal of Neurochemistry**, **51**: 830–836, 1988.
- REIS, D. J. & REGUNATHAN, S. Is agmatine a novel neurotransmitter in brain? **Trends in Pharmacological Sciences**, **21**: 187–193, 2000.
- RIEDEL, G., WETZEL, W. & REYMANN, K. G. Metabotropic glutamate receptor in spatial and nonspatial learning in rats studied by means of agonist and antagonist application. **Learning And Memory**, **2**: 243–265, 1995.
- RIEDEL, G., PLATT, B. & MICHEAU, J. Glutamate receptor function in learning and memory. **Behavioural Brain Research**, **18**: 1–47, 2003.
- ROCK, D. M. & MACDONALD, R. L. Polyamine regulation of *N*-methyl-D-aspartate receptor channels. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, **35**: 463–482, 1995.
- ROGAN, M. T., STÄUBLI, U.V. & LEDOUX, J.E. AMPA receptor facilitation accelerates fear learning without altering the level of conditioned fear acquired. **Journal of Neuroscience**, **17**: 5928–5935, 1997.

- RUBIN, M. A., JURACH, A., ZANOLLA, G. R., BOEMO, R. L., SOUZA, D. O. & MELLO, C. F. Intrahippocampal GMP administration improves inhibitory avoidance performance through GABAergic and glutamatergic mechanisms in rats. **NeuroReport**, **8**: 3713–3716, 1997.
- RUBIN, M. A., BOEMO, R. L., JURACH, A., ROJAS, D. B., ZANOLLA, G. R., OBREGON, A. D. C., SOUZA, D. O. & MELLO, C. F. Intrahippocampal spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. **Behavioural Pharmacology**, **11**: 57–62, 2000.
- RUBIN, M. A., STIEGEMEIER, J. A., VOLKWEIS, M. A., OLIVEIRA, D. M., FENILI, A. C., BOEMO, R. L., JURACH, A. & MELLO, C. F. Intra-amygdala spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. **European Journal of Pharmacology**, **423**: 35–39, 2001.
- SACCAN, A. I. & JOHNSON, K. M. Characterization of the stimulatory and inhibitory effects of polyamines on [³H]N-(1-[thienyl]cyclohexyl) piperidine binding to the *N*-methyl-D-aspartate receptor ionophore complex. **Molecular Pharmacology**, **37**: 572–577, 1990.
- SAH, P., FABER, E. S. L., LOPEZ DE ARMENTIA, M. & POWER, J. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. **Physiological Reviews**, **83**: 803–834, 2003.

- 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. **Neurobiology of Learning and Memory**, **68**: 51–59, 1997.
- SCATTON, B. The NMDA receptor complex. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, **7**: 389–400, 1993.
- SCOTT, R. H., SUTTON, K. G. & DOLPHIN, A. C. Interactions of polyamines with neuronal ion channels. **Trends of Neuroscience**, **16**: 153–160, 1993.
- SEILER, N. & SCHMIDT-GLENEWINKEL, T. Regional distribution of putrescine, spermidine and spermine in relation to the distribution of RNA and DNA in the rat nervous system. **Journal of Neurochemistry**, **24**: 791–795, 1975.
- SEILER, N. Polyamine metabolism and function in brain. **Neurochemistry International**, **3**: 95–110, 1981.
- SEILER, N., BOLKENIUS, F. N., KNÖDGEN, B. The influence of catabolic reactions on polyamine excretion. **Biochemical Journal**, **255**: 319–322, 1985.
- SEILER, N. Formation, catabolism and properties of the natural polyamines. In *Neuropharmacology of Polyamines*. **Editora Academic Press**, p. 26–36, 1994.

- SHAW, G. G. & PATEMAN, A. J. The regional distribution of the polyamines spermidine and spermine in brain. **Journal of Neurochemistry**, **20**: 1225–1230, 1973.
- SHIMADA, A., SPANGLER, E. L., LONDON, E. D., INGRAM, D. K. Spermidine potentiates dizocilpine-induced impairment of learning performance by rats in a 14-unit T-maze. **European Journal of Pharmacology**, **262**: 293–300, 1994.
- SHIMIZU, E., TANG Y., RAMPON C. & TSIEN, J. Z. NMDA Receptor-Dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation. **Science**, **290**: 1170–1174, 2000.
- SHIN, W. W., FONG, W. F., PANG, S. F. & WONG, P. C. L. Limited blood-brain barrier transport of polyamines. **Journal of Neurochemistry**, **44**: 1056-1059, 1985.
- SINGH, L., OLES, R. & WOODRUFF, G. In vivo interaction of a polyamine with NMDA receptor. **European Journal of Pharmacology**, **180**: 391– 392, 1990.
- SNOW, A. E., TUCKER, S. M. & DEWEY, W. L. The role of neurotransmitters in stress-induced antinociception (SAI). **Pharmacology Biochemistry and Behavioral**, **16**: 47–50, 1982.
- SPROSEN, T. & WOODRUFF, G. N. Polyamines potentiate NMDA induced whole-cell currents in cultured striatal neurons. **European Journal of Pharmacology**, **179**: 477–478, 1990.

- SQUIRE, L. R. & ALVAREZ, P. Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. **Current Opinion in Neurobiology**, **5**: 169–177, 1995.
- SQUIRE, L. R. & KANDEL, E. R. **Memória: da mente às moléculas**, Porto Alegre, Artmed Editora S.A, 2003.
- STRYER, I. **Biochemistry**. San Francisco, Freeman, Pp.422–415, 1981.
- TABOR, C. W. & TABOR, H. Polyamines. **Annual Review of Biochemistry**, **53**: 749–790, 1984.
- TANG, Y., SHIMIZU, E., DUBE, G. R., RAMPON, C., KERCHNER, G. A., ZHUO, M., LIU, G. & TSIEN, J. Z. Genetic enhancement of learning and memory in mice. **Nature**, **401**: 63–69, 1999.
- TETI, D., VISALLI, M. & MCNAIR, H. Analysis of polyamines as markers of (patho)physiological conditions. **Journal of Chromatography B**: **781**: 107–149 , 2002.
- TEYLER, T. J. Use of brain slices to study long-term potentiation and depression as examples of synaptic plasticity. **Methods**, **18**: 109–116, 1999.
- URDIALES, J. L., MEDINA, M. A. & SANCHEZ-JIMENEZ, F. Polyamine metabolism revisited. . **European Journal of Gastroenterology and Hepatology**, **13**: 1015–1019, 2001.

- WALKER, D. L. & DAVIS M. Involvement of NMDA receptors within the amygdala in short-versus long-term memory for fear conditioning as assessed with fear-potentiated startle. **Behavioral Neuroscience**, **114**: 1019–1033, 2000.
- WALKER, D. L., RESSLER, K. J., LU K-T. & DAVIS, M. Facilitation of conditioned fear extinction by systemic administration or intra-amygdala infusions of D-cycloserine as assessed with fear-potentiated startle in rats. **The Journal of Neuroscience**, **22**: 2343–2351, 2002.
- WILLIAMS, K., ROMANO, C. & MOLINOFF, P. B. Effects of polyamines on the Binding of [³H]MK-801 to the *N*-methyl-D-aspartate receptor: Pharmacological evidence for the existence of a polyamine recognition site. **Molecular Pharmacology**, **36**: 575–581, 1989.
- WILLIAMS, K., DAWSON, V. L., ROMANO, C., DICHTER, M. A. & MOLINOFF, P. B. Characterization of polyamines having agonist, antagonist, and inverse agonist effects at the polyamine recognition site of the NMDA receptor. **Neuron**, **5**:199–208, 1990.
- WILLIAMS, K., ROMANO, C., DICHTER, M. A. & MOLINOFF, P. B. Minireview: Modulation of the NMDA receptor by polyamine. **Life Science**, **48**: 469–498, 1991.
- WILLIAMS, K. Interactions of polyamines with ion channels. **Biochemical Journal**, **325**: 289–297, 1997.
- WORTHEN, D. R., GIBSON, D. A., ROGERS, D. T., BENCE, A. K., FU, M., LITTLETON, J. M. & CROOKS, P. A. Endogenous indoles as novel polyamine site ligands at the *N*-methyl-D-aspartate receptor complex. **Brain Research**, **890**: 343–346, 2001.

- YAMAKURA, T. & SHIMOJI, K. Subunit- and site-specific pharmacology of the NMDA receptor channel. **Progress in Neurobiology**, **59**: 279–298, 1999.
- YONEDA, Y. & OGITA, K. Novel fourth binding sites of ³[H]-spermidine within the NMDA receptor complex. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, **287**: 455–475, 1991.
- ZARRINDAST, M. R., KHODJASTEHFAL, E., ORYAN, S., TORKAMAN-BOUTORABI, A. Effects of adenosine receptor agonists and antagonists on pentylentetrazole-induced amnesia. **European Journal of Pharmacology**, **411**: 283–288, 2001.
- ZIGMOND, M. J., BLOOM, F. E., LANDIS, S. C., ROBERTS, J. L. & SQUIRE, L. R. **Fundamental Neuroscience**, London: Academic Press, 1999.