

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**O ENVOLVIMENTO DE PROTEÍNAS QUINASES NA  
FACILITAÇÃO DO APRENDIZADO ESPACIAL  
INDUZIDO POR CREATINA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Mauren Assis de Souza**

**Santa Maria, RS, Brasil 2009**

# **O ENVOLVIMENTO DE PROTEÍNAS QUINASES NA FACILITAÇÃO DO APRENDIZADO ESPACIAL INDUZIDO POR CREATINA**

---

**Por**

**Mauren Assis de Souza**

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

**Orientador Michele Rechia Fighera**

**Co-Orientador Luiz Fernando Freire Royes**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2009**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

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

**O envolvimento de proteínas quinases na facilitação do  
aprendizado espacial induzido por creatina em ratos**

elaborada por

**Mauren Assis de Souza**

como requisito parcial para obtenção do grau de

**Mestre em Farmacologia**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

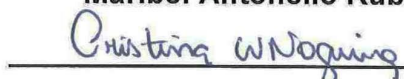


**Michele Rechia Fighera**

**(Orientadora)**



**Maribel Antonello Rubin (UFSM)**



**Cristina Wayne Nogueira (UFSM)**

**Santa Maria, 20 de novembro de 2009**



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus orientadores Luiz Fernando e Michele pela orientação e pelos ensinamentos transmitidos, além da confiança na realização desse trabalho. Também pela amizade e companheirismo nos momentos fora do laboratório.

Aos professores Carlos Mello, Maribel Rubin, Juliano Ferreira, pela convivência e sugestões durante o trabalho.

Aos meus pais Neuza e Mauro pelo constante apoio, incentivo e exemplos a serem seguidos.

As minhas avós Isabel e Olga e a tia Jaqueline pelo constante apoio e orações.

Ao meu namorado, Matheus por todo amor, carinho, apoio, paciência e companheirismo que sempre demonstrou.

A toda família que de uma forma ou outra sempre contribuíram nesta caminhada.

Aos meus colegas e também grandes amigos, Léo, Mauro, Samurai, Fred, Luiz, Lelé, Maurício, Aninha, André, Silvia, Letícia, Marcus, Mirian, Cristina, Felipe, pela amizade e conhecimentos compartilhados e por tornar essa caminhada mais simples e divertida, e em especial a Ana Flávia e a Danieli.

Aos colegas do 18 pelos auxílios, amizade e descontração, principalmente no vôlei.

Aos funcionários do 21, principalmente a Dona Cleci e o Florindo, por toda ajuda prestada.

À Universidade Federal de Santa Maria por tornar possível o sonho da graduação e pós-graduação em uma universidade pública e de qualidade.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida.

Por último, mas não menos importante, a Deus pelos dons da vida, e por ter me colocado no caminho de todas essas pessoas.

## RESUMO

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

### **O envolvimento de proteínas quinases na facilitação do aprendizado espacial induzido por creatina**

Autor: Mauren Assis de Souza  
Orientador: Michele Rechia Fighera  
Local e Data da Defesa: Santa Maria, 20 de novembro de 2009.

O declínio cognitivo associado a doenças neurodegenerativas é um sintoma cada vez mais comum encontrado em pacientes, provavelmente devido ao aumento da expectativa de vida da população. Dada a escassez de medidas terapêuticas efetivas para o déficit de memória apresentado por pacientes, evidencia-se a importância da busca de novos compostos e do estudo de seus mecanismos de ação. Nesse contexto, recentes estudos mostraram a eficácia de algumas substâncias com ação neuroprotetora, como a creatina (Cr), na terapia de pacientes com déficit de memória e em modelos experimentais. A Cr é um composto guanidínico sintetizado endogenamente nos rins, fígado, pâncreas e cérebro, que apresenta ação neuroprotetora e neuromoduladora no sistema nervoso central. Estudos mostram que a administração de compostos guanidínicos, como a Cr, podem estar relacionados com a melhora da memória devido à interação com o sítio das poliaminas no receptor N-metil-D-Aspartato (NMDA) e por atuar como tampão energético intracelular. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi investigar o envolvimento do transportador de Cr (CreaT), das proteínas quinases dependente de AMPc (PKA) e dependente de  $Ca^{2+}$ /calmodulina II (CaMKII) na melhora do aprendizado espacial induzido por Cr no hipocampo de ratos. Após o treino no labirinto de Barnes, os ratos foram injetados no hipocampo, bilateralmente, com Cr e/ou 3-ácido guanidínico propiônico (3-GPA, um inibidor do transportador de creatina); Cr e/ou [N-[2-(p-Bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinoline sulfonamide, Di-HCl Salt] (H-89, um inibidor da PKA); Cr e/ou 1,8-Naphthoylene benzimidazole-3-carboxylic acid (STO-609, um inibidor da CaMKII). A administração de 3-GPA, H-89 e STO-609 diminuiu o efeito facilitatório da Cr na memória espacial de ratos, observado no teste do labirinto de Barnes. De acordo com esses resultados, decidimos investigar o envolvimento da ativação do elemento de ligação responsivo ao AMPc (pCREB), PKA (pPKA) e CaMKII (pCaMKII) após a administração de Cr no hipocampo de animais treinados no labirinto de Barnes. Trinta minutos após a injeção de Cr, foi observado um aumento nos níveis de pCREB e pCaMKII, mas não nos níveis de pPKA no hipocampo de ratos. Estes achados sugerem que a facilitação do aprendizado espacial induzido pela Cr depende do seu transporte para o meio intracelular, assim como, envolve a via de sinalização celular da CaMKII/CREB no hipocampo de ratos.

Palavras-chaves: Memória espacial, Labirinto de Barnes, creatina, proteínas quinases.

## **ABSTRACT**

Dissertation of Master Degree  
Graduating Program in Pharmacology  
Federal University of Santa Maria

### **The involvement of protein kinases on spatial learning enhancement induced by creatine**

Author: Mauren Assis de Souza

Advisor: Michele Rechia Figuera

Date and place: Santa Maria, November, 20<sup>th</sup>, 2009.

Decline cognitive related to neurodegenerative diseases are very common in patients, probably in function of aging. Since there are few effective therapeutics approaches to loss memory treatment, but studies about new therapeutics approaches are necessary regarding neuroprotective drugs. Thus, recent works have been showing the efficacy of some neuroprotective compounds like creatine (Cr) in treatment of patients and experimental models with memory deficit. Creatine is a guanidine compound synthesized from glycine, arginine and S-adenosylmethionine in the kidneys, liver and brain that have been presented neuroprotective and neuromodulatory effect in the central nervous systems. Some works suggest that guanidine compounds like Cr could enhance learning by modulation polyamines binding sites at the N-methyl-D-Aspartate (NMDA) receptor and act as energetic buffer intracellular. In these context, the propose of this work was investigate the involvement of Cr transporter (CreaT), cAMP-dependent protein kinase A (PKA) and Ca<sup>2+</sup>/ calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) signaling pathway in the spatial learning after intrahippocampal injection of Cr. After training on Barnes Maze, Cr and/or 3-GPA (inhibitor CreaT), Cr and/or H-89 (PKA inhibitor), Cr and/or STO-609, (inhibitor of CaMKII) bilateral intrahippocampus administration was performed. The results showed that intrahippocampal administration of 3-GPA, H-89 and STO-609 attenuated the facilitatory effect of Cr on spatial learning performed on Barnes Maze. Therefore, we decide investigate the involvement of the PKA (pPKA), CaMKII (pCaMKII) and CREB (pCREB) activation after intrahippocampus creatine administration in rats trained on Barnes Maze. The results showed that Cr enhanced pCREB levels and pCaMKII levels. Thirty minutes after creatine administration was observed pCREB and pCaMKII levels enhancement, on the other hand, pPKA levels enhancement was not observed. These data suggest that spatial learning enhancement elicited by Cr may be mediated by trans-cellular creatine transports, as well, CaMKII/CREB intracellular pathway in rat hippocampus

Keywords: Spatial learning, Barnes Maze, creatine, protein kinase

# SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>AGRADECIMENTOS</b> .....   | <b>5</b>  |
| <b>RESUMO</b> .....   | <b>6</b>  |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | <b>7</b>  |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....  | <b>10</b> |
| <b>LISTA DE FIGURAS E TABELAS</b> .....   | <b>12</b> |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....  | <b>13</b> |
| <b>2. OBJETIVOS</b> .....   | <b>17</b> |
| 2.1. OBJETIVO GERAL.....  | 18        |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....   | 18        |
| <b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....   | <b>19</b> |
| 3.1. MEMÓRIA .....  | 20        |
| 3.1.1 <i>Classificação da Memória</i> .....   | 21        |
| 3.1.2 <i>Noções Sobre a Formação da Memória</i> .....   | 23        |
| 3.1.3 <i>Hipocampo</i> .....  | 25        |
| 3.1.4 <i>Memória Espacial</i> .....   | 26        |
| 3.1.5 <i>Hipocampo e Memória Espacial</i> .....   | 28        |
| 3.1.6 <i>Participação da PKA, CaMKII, CREB na Memória Espacial</i> .....  | 29        |
| 3.2 CREATINA.....   | 35        |
| 3.2.1 <i>Efeito Neuroprotetor da Creatina</i> .....   | 38        |
| 3.2.2 <i>Efeito Neuromodulador da Creatina</i> .....  | 41        |
| <b>4. CAPÍTULOS</b> .....   | <b>44</b> |
| 4.1 CAPÍTULO I – A AÇÃO DAS PROTEÍNAS QUINASE DEPENDENTE DE AMPC (PKA) E PROTEÍNA QUINASE DEPENDENTE DE CÁLCIO/CALMODULINA (CAMKII) HIPOCAMPAIS, NA FACILITAÇÃO DO APRENDIZADO ESPACIAL INDUZIDO POR CREATINA ..... | 46        |
| 4.2 CAPÍTULO II – O ENVOLVIMENTO DA ATIVAÇÃO DE CREB NA FACILITAÇÃO DO APRENDIZADO ESPACIAL INDUZIDO POR CREATINA.....  | 68        |
| <b>5. DISCUSSÃO</b> .....   | <b>89</b> |



|                              |           |
|------------------------------|-----------|
| 5.1 DISCUSSÃO GERAL .....    | 90        |
| <b>6. CONCLUSÕES .....</b>   | <b>97</b> |
| 6.1 CAPÍTULO I .....         | 98        |
| 6.2 CAPÍTULO II .....        | 98        |
| <b>7. BIBLIOGRAFIA .....</b> | <b>99</b> |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                       |   |
|-----------------------|---|
| 3-GPA                 | 3-guanidinopropiônico ácido                                   |
| AC                    | Adenilato ciclase   |
| ADP                   | Difosfato de adenosina  |
| AGAT                  | L-arginina: glicina amidinotransferase                        |
| AMPA                  | Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico |
| AMPC                  | 3', 5' -adenosina monofosfato cíclico                         |
| ATP                   | Trifosfato de adenosina                                       |
| AVE                   | Acidente vascular encefálico                                  |
| BDNF                  | Fator neurotrófico derivado do encéfalo                       |
| Ca <sup>2+</sup> /CaM | Cálcio/Calmodulina  |
| CaMKII                | Proteína quinase dependente de cálcio-calmodulina II          |
| CK                    | Creatina Kinase   |
| Cr                    | Creatina  |
| CreaT                 | Transportador de creatina                                     |
| CREB                  | Proteína ligante do elemento responsivo ao AMPC               |
| DA                    | Doença de Alzheimer   |
| DP                    | Doença de Parkinson   |
| ERN                   | Espécies reativas de Nitrogênio                               |
| ERO                   | Espécies Reativas de Oxigênio                                 |
| GABA                  | Ácido $\delta$ -aminobutírico                                 |
| GAMT                  | S-adenosilmetionina: N-guanidinoacetato metiltransferase      |
| H-89                  | N-(2-bromocinamilamino) etil-5-isoquinolina sulfonamida       |
| LTP                   | Potencialização de longa duração                              |
| mGlu-R                | Receptores glutamatérgicos metabotrópicos                     |

|         |   |
|---------|---|
| NMDA    | N-Metil-D-Aspartato   |
| pCaMKII | proteína quinase dependente de $\text{Ca}^{2+}$ /CaM II fosforilada |
| PCr     | Creatina fosforilada  |
| pCREB   | Proteína ligante do elemento responsivo ao AMPc fosforilada         |
| PKA     | proteínas quinase A   |
| PKC     | Proteína quinase C  |
| PKG     | Proteína quinase G  |
| pPKA    | Proteína quinase A fosforilada                                      |
| SNC     | Sistema Nervoso Central   |
| STO-609 | 7H-Benzimidazol[2,1-a]benz[de]isoquinolina-7-3-ácido carbo.         |
| TCE     | Traumatismo crânio – encefálico                                     |

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 – Classificação das memórias e regiões do SNC associadas       | 20 |
| Figura 2 – Cascata de eventos envolvida na formação da memória          | 24 |
| Figura 3 – Hipocampo e seus microcircuitos                              | 26 |
| Figura 4 – Cascata de sinalização AMPc/PKA                              | 30 |
| Figura 5 – Cascata de ativação da CaMKII                                | 33 |
| Esquema 1 – Esquema representativo da reação da enzima creatina quinase | 35 |
| Figura 6 – Biossíntese da creatina                                      | 37 |
| Figura 7 – Creatina no SNC  | 42 |

---

## 1. INTRODUÇÃO

# 1. INTRODUÇÃO

A memória é a capacidade que temos de armazenar informações que possam ser recuperadas e utilizadas posteriormente (LENT, 2004). As memórias podem ser classificadas de acordo com o tempo que duram e com seu conteúdo, existindo uma correlação entre estas memórias e as zonas cerebrais que intervêm em sua formação e talvez em seu armazenamento (SQUIRE & ZOLA, 1996; IZQUIERDO & MACGAUGH 2000; SQUIRE & KANDEL, 2003). Quanto ao tempo podem ser classificadas como memória imediata, de curta e de longa duração e quanto ao conteúdo podem ser classificadas como explícita ou declarativa e implícita ou não-declarativa (LEES & JONES, 2000; KANDEL, 2001; BEAR et al., 2002; LENT, 2004).

O processo de formação da memória envolve eventos moleculares, que ocorrem em lugares e estruturas diferentes no sistema nervoso central (IZQUIERDO et al., 2006). Alterações na liberação de neurotransmissores pelos neurônios, e eficiência na comunicação entre tais neurônios no hipocampo, córtex cerebral e outras estruturas encefálicas, parecem ser eventos neuroquímicos primários para a formação da memória (McGAUGH, 2000; McGAUGH & IZQUIERDO, 2000). A habilidade para armazenar, codificar e recuperar informações sobre localizações espaciais, configurações ou rotas é característica da memória espacial que permite lembrar a localização de objetos ou encontrar o caminho dentro do meio ambiente (KESSELS et al., 2001). Neste contexto, estudos com roedores (EICHENBAUM, 2002) e com primatas (BRASTED et al., 2003) revelam que o hipocampo exerce um papel importante na memória espacial.

O hipocampo é de grande importância para a formação da memória, tanto na fase de aquisição/consolidação quanto na fase de evocação (IZQUIERDO & MEDINA, 1995). Acredita-se que um aumento na liberação de neurotransmissores, principalmente o glutamato, seja o primeiro passo para a formação da memória (McGAUGH, 2000; McGAUGH & IZQUIERDO, 2000). Quando o glutamato se liga a seus receptores, provoca alterações no neurônio-alvo, abrindo canais iônicos, modificando segundos mensageiros, ativando proteína quinase C (PKC), proteína quinase G (PKG), CaMKII, PKA e proteína ligante do elemento responsivo ao AMPc (CREB), entre outras. Estas proteínas ativam mecanismos intracelulares que

resultam no aumento da síntese protéica e da efetividade da transmissão de informações entre os neurônios, com os quais o neurônio-alvo se comunica. Tais alterações entre os neurônios têm sido denominadas "plasticidade sináptica" (McGAUGH, 2000; 2002; & IZQUIERDO, 2000). Todos os processos de formação de memória e sinalização celular estão sujeitos à modulação, inclusive por outros neurotransmissores diferentes do glutamato que são liberados por neurônios presentes na própria estrutura ou em estruturas adjacentes (BLISS & COLLINGRIDGE, 1993; IZQUIERDO, 1993; CAHILL & MCGAUGH, 1998, MCGAUGH, 2000, ABEL & LATTAL, 2001; MCGAUGH, 2002).

Dada a escassez de medidas terapêuticas efetivas para o déficit de memória apresentado por pacientes, evidencia-se a importância da busca de novos compostos e do estudo do seu mecanismo de ação (BRUNBECH & SABERS, 2002). Uma das principais tendências das investigações é a pesquisa de novas drogas com propriedades neuroprotetoras (ELINOS-CALDERÓN et al., 2009; WILDBURGER et al., 2009). Nesse contexto, recentes estudos mostraram a eficácia de algumas substâncias com ação neuroprotetora, como a Cr, na terapia de pacientes com déficit de memória (WATANABE et al. 2002; RAE et al. 2003; VALENZUELA et al. 2003) e em modelos experimentais (BENDER et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2008).

A Cr é um composto guanidínico sintetizado endogenamente nos rins, fígado, pâncreas (PERSKY & BRAZEAU) e cérebro (BRAISSANT et al., 2001), é transportada para o músculo e cérebro por um processo de transporte ativo de alta afinidade (WICK et al., 1999). Já o derivado fosforilado da Cr, a fosfocreatina (PCr), é um composto de alta energia que pode doar reversivelmente um grupo fosfato ao ADP para formar ATP, reação esta catalisada pela enzima creatina quinase (WALLIMANN et al, 1998). Devido a sua importância fisiológica como mecanismo de reserva energética, principalmente no músculo (WYSS & KADDURAH-DAOUK, 2000), como transportador de ATP dos sítios de produção (mitocôndria) para os sítios de consumo (citosol) (WALLIMANN et al., 1998) e como tampão energético (PAN & TAKAHASHI, 2007), a Cr tem sido utilizada por atletas como suplemento alimentar, para melhorar a performance em exercícios de alta intensidade e curta duração (PERSKY & BRAZEAU, 2001).

Os benefícios da suplementação com Cr vão além destes obtidos pelos atletas, pois ela apresenta propriedades antioxidantes diretas (LAWLER et al., 2002; SESTILI et al., 2006) e também neuroprotetoras em uma variedade de modelos de

doenças neurológicas tais como, hipóxia, esclerose lateral amiotrófica, acidente vascular encefálico, doença de Parkinson e acidemias orgânicas (HOLTZMAN et al., 1998; KLIVENYI et al., 2004; WICK et al., 1999; MALCON et al., 2000; ROYES et al., 2003; 2006).

Além de seu efeito neuroprotetor, alguns estudos têm sugerido que a Cr pode ser sintetizada nos astrócitos, captada pelos neurônios (BRAISSANT et al., 2001) e liberada após estimulação elétrica de forma exocitótica (ALMEIDA et al., 2006). Estes dados sugerem que Cr não é somente sintetizada e captada por neurônios, mas também liberada de uma maneira dependente de potencial de ação, sugerindo fortes evidências para seu papel como neuromodulador no cérebro (ALMEIDA et al., 2006).

Estudos têm sugerido que a Cr além de exercer ação neuroprotetora e neuromoduladora tem envolvimento em processos fisiológicos importantes como o aprendizado e a memória. Recentes estudos têm mostrado que a suplementação oral de Cr aumenta os escores em testes de inteligência e reduz a fadiga mental em sujeitos submetidos a sucessivos testes de cálculos (WATANABE et al. 2002; RAE et al. 2003; VALENZUELA et al. 2003). Nesse sentido, há relatos na literatura de que a administração de compostos guanidínicos, como a Cr, podem estar relacionados com a melhora da memória devido à interação com o sítio das poliaminas no receptor NMDA (GIBSON et al. 2002; BERGER et al. 2006). De fato, vários estudos têm mostrado que o receptor NMDA está diretamente envolvido na formação de memórias aversivas (IZQUIERDO et al., 1992; ROESLER et al., 1998) e espaciais (MORRIS et al., 1989; SHAPIRO & EICHENBAUM, 1999).

Neste contexto Oliveira e colaboradores (2008) verificaram que a administração intrahipocampal de creatina resulta em melhora no aprendizado espacial, provavelmente por modular o sítio das poliaminas no receptor NMDA, entretanto ainda não é conhecido o mecanismo pelo qual a creatina pode contribuir com a melhora do aprendizado e da memória em ratos.



---

## **2. OBJETIVOS**

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Verificar farmacologicamente e bioquimicamente o mecanismo de ação pelo qual a creatina melhora a memória espacial em ratos.

### **2.2. Objetivos Específicos**

Para um melhor entendimento dos experimentos realizados, convém dividi-los em:

#### **Capítulo I**

1. Verificar a participação do transportador de Cr (CreaT) na melhora da memória espacial induzida pela administração intra-hipocampal de Creatina.
2. Verificar a participação da PKA, e da CaMKII na melhora da memória espacial induzida pela administração intra-hipocampal de Cr.

#### **Capítulo II**

1. Verificar se a administração intra-hipocampal de Cr induz a ativação de CREB no hipocampo de ratos após o teste do Labirinto de Barnes.
2. Verificar se a administração intra-hipocampal de Cr induz a ativação da PKA e CaMKII no hipocampo de ratos, após o teste do Labirinto de Barnes.

---

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Memória

A memória envolve um complexo mecanismo que abrange armazenar informações que possam ser recuperadas e utilizadas posteriormente (LENT et al., 2004).

A memória não é considerada como uma simples entidade, mas sim, diversas entidades separadas que dependem de diferentes sistemas cerebrais que podem interagir entre si (SQUIRE & ZOLA-MORGAN, 1996). De acordo com esta visão, foram estabelecidas classificações para os diversos tipos memórias, que levam em conta diferentes critérios, tais como origem, tempo de retenção e função (Figura 1). É válido ressaltar que essas classificações foram feitas a partir de estudos com humanos, sendo estendidas para estudos com outros animais.

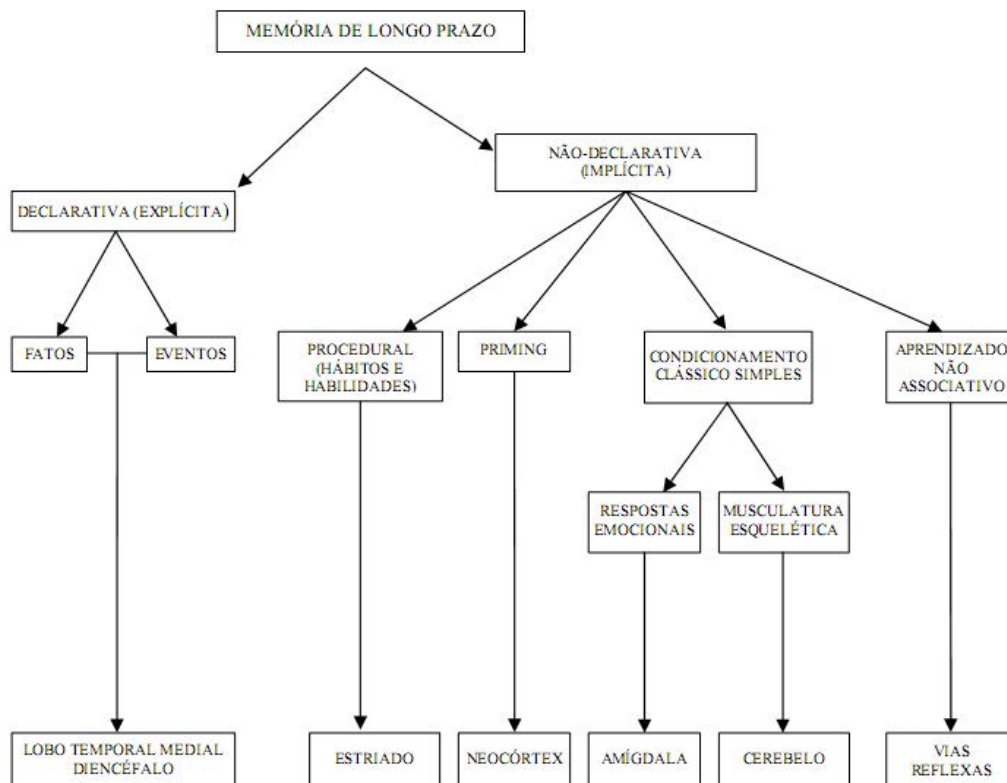


Figura 1. Classificação das memórias e regiões do SNC associadas. Adaptado de SQUIRE & ZOLA-MORGAN, 1996.

### 3.1.1 Classificação da Memória

As memórias podem ser classificadas de acordo com o tempo que duram e com seu conteúdo, existindo uma correlação entre estas memórias e as zonas cerebrais que intervêm em sua formação e talvez em seu armazenamento (SQUIRE & ZOLA, 1996; IZQUIERDO & MACGAUGH 2000; SQUIRE & KANDEL, 2003).

Do ponto de vista da duração as memórias podem ser classificadas em memória de trabalho, de curta e de longa duração (SQUIRE & ZOLA, 1996; IZQUIERDO & MACGAUGH 2000; SQUIRE & KANDEL, 2003).

A memória de trabalho é breve e fugaz, gerencia a realidade mantendo a informação de alguns segundos a, no máximo, alguns minutos, até que esta seja processada. Ela é processada fundamentalmente no córtex pré-frontal, dependendo apenas da atividade elétrica dos neurônios (CURTIS & D'ESPOSITO, 2003).

A memória de curta duração (minutos ou poucas horas) permite suprir os processos mnemônicos enquanto a memória definitiva não foi ainda construída. As memórias não são adquiridas imediatamente na sua forma final, durante os primeiros minutos ou horas após sua aquisição, elas são suscetíveis à interferência por outras memórias, por drogas ou por outros tratamentos. A fase em que só temos completa a memória de curta duração e a de longa duração ainda não está fixada, é uma fase lábil e sensível a fármacos, traumatismos e até mesmo a outras memórias.

As memórias de longa duração são aquelas que podem ser recordadas durante dias, meses ou anos após terem sido consolidadas (armazenadas) (RANGANATH & BLUMENFELD, 2005). A formação de uma memória de longa duração envolve uma série de processos metabólicos no hipocampo e em outras regiões cerebrais (IZQUIERDO & MEDINA, 1997). O conjunto destes processos e seu resultado final denominam-se consolidação. Há consenso entre diversos pesquisadores, que as memórias consistem na modificação de determinadas sinapses de distintas vias (IZQUIERDO, 2002).

Quanto ao conteúdo as memórias podem ser divididas em declarativa, não-declarativa e operacional.

As memórias declarativas são aquelas acessíveis à consciência adquiridas de forma explícita (SQUIRE & ZOLA, 1996). Elas são fáceis de formar, mas também

facilmente esquecidas. As estruturas do lobo temporal medial, especialmente o hipocampo são importantes para a formação destas memórias (EICHENBAUM, 1999). A memória declarativa ou explícita corresponde a memórias que podem ser descritas por meio de palavras, no caso dos seres humanos. Subdivide-se em memória declarativa episódica, que abrange aquelas memórias que possuem uma referência temporal (autobiográfica), e em memória declarativa semântica, que envolve conceitos atemporais (conhecimentos, cultura). Um exemplo de memória declarativa episódica é a lembrança de uma data de aniversário ou de óbito (fatos referendados no tempo), e de memória declarativa semântica é a lembrança que as pessoas nascem, crescem, desenvolvem-se, envelhecem e morrem (fatos independentes da época em que estejam ocorrendo, logo atemporais).

Memória não-declarativa ou implícita corresponde àquelas memórias que não podem ser descritas por meio de palavras. Subdivide-se em: memória não declarativa de representação perceptual; de procedimentos; associativa e não-associativa. A memória não declarativa de representação perceptual lida com representações sem significado aparente conhecido (imagens, sons), mas úteis como dicas facilitatórias da evocação (fenômeno descrito na literatura inglesa como priming) de informações inerentes. A de procedimentos lida com hábitos, habilidades e regras (andar de bicicleta, uso gramatical da língua materna). A memória não-declarativa associativa lida com a associação de dois ou mais estímulos (condicionamento pavloviano ou clássico), ou de um estímulo a uma resposta (condicionamento operante) (IZQUIERDO & MACGAUCH, 2000). Já a não-associativa lida com a atenuação ou intensificação de uma resposta (habituação ou sensibilização, respectivamente), através da repetição de um mesmo estímulo (por exemplo, sonoro ou doloroso, respectivamente).

Memória operacional: corresponde ao processamento contínuo das informações recém adquiridas e/ou recém evocadas, permitindo o raciocínio e o planejamento do comportamento (SQUIRE & KANDEL, 2003; SQUIRE & ZOLA, 1996). Corresponde à memória de trabalho descrita acima, e diferencia-se das demais por não armazenar arquivos (GOLDMAN-RAKIC, 1996).

As memórias declarativas requerem o lobo temporal medial e o hipocampo enquanto as memórias não-declarativas envolvem estruturas diferentes como a amígdala, gânglios da base e cerebelo (ALBRIGHT et al., 2000; LEES & JONES, 2000).

### 3.1.2 Noções Sobre a Formação da Memória

Os mecanismos de consolidação da memória começaram a ser desvendados após uma seqüência de estudos. Primeiro Cajal, em 1894, propôs que a estabilização das memórias era devido a modificações entre as conexões neuronais. Após em 1949, Hebb postulou que as sinapses são amplificadas quando ambos os neurônios são simultaneamente ativados, melhorando esta sinapse (DITYATEV & BOLSHAKOV, 2005). Estes estudos culminaram com a descoberta do fenômeno da potencialização de longa duração (LTP) no hipocampo de mamíferos (BLISS & LOMO, 1973). Assim, a princípio a LTP, uma forma de plasticidade sináptica cuja duração pode ser medida durante horas, semanas ou meses, foi proposta como sendo a “base” para a consolidação das memórias. Entretanto, já é sabido que o mecanismo molecular da formação de memórias possui semelhanças e diferenças aos mecanismos da LTP (IZQUIERDO et al., 1992; IZQUIERDO & MEDINA, 1995; IZQUIERDO, 2002).

Acredita-se que um aumento na liberação de neurotransmissores, principalmente o glutamato, seja o primeiro passo para a formação da memória (MCGAUGH, 2000; MCGAUGH & IZQUIERDO, 2000). Uma vez liberado, o glutamato une-se aos receptores glutamatérgicos denominados: ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA), no neurônio pós-sináptico, permitindo a entrada de íons  $\text{Na}^{2+}$  na célula produzindo despolarização. Como consequência da despolarização o íon  $\text{Mg}^{2+}$  desobstrui o canal do receptor NMDA, que passa a responder ao glutamato, permitindo a entrada de íons  $\text{Ca}^{2+}$  na célula. Os receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGlu-R) também podem ser ativados e induzir a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  das reservas intracelulares (IZQUIERDO & MEDINA, 1995; ABEL & LATTAL, 2001). Como consequência disso, são ativadas proteínas como a PKC, a CaMKII, e PKA, que por sua vez ativam mecanismos intracelulares que culminam com a síntese protéica, e no aumento da transmissão de informações entre neurônios (Figura 2). Tais alterações entre os neurônios têm sido denominada "plasticidade sináptica" (MCGAUGH & IZQUIERDO, 2000; MCGAUGH, 2000; 2002). Todos esses processos estão sujeitos à modulação, inclusive por outros neurotransmissores diferentes do glutamato entre estes, dopamina, noradrenalina,

serotonina, acetilcolina, ácido  $\delta$ -aminobutírico (GABA), poliaminas. Estes compostos 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).

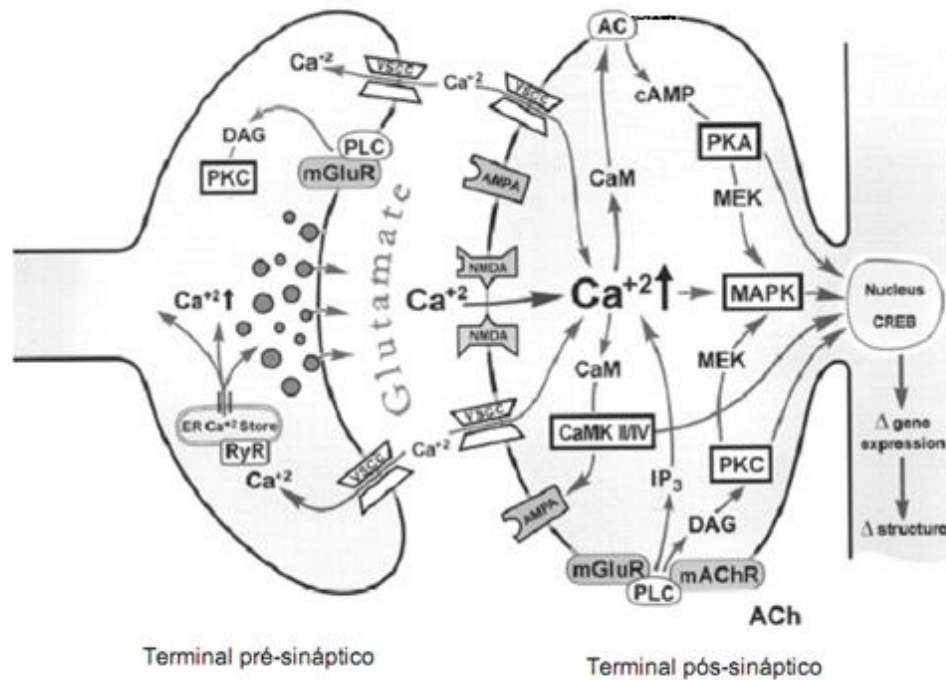


Figura 2. Esquema da seqüência de modificações de um terminal sináptico glutamatérgico envolvido na formação da memória. RyR: retículo endoplasmático; mGLU:receptores glutamatérgicos metabotrópicos; PLC: fosfolipase C ;DAG: diacilglicerol; MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno; VSCC: canal de cálcio voltagem-dependente (adaptado de GILBERT & LASLEY, 2002).

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). Nesse contexto, uma das principais estruturas cerebrais envolvidas no processo de formação da memória é o hipocampo.



### 3.1.3 Hipocampo

O hipocampo é a estrutura central para a formação de memórias declarativas, sendo que várias regiões corticais como a pré-frontal, a entorrinal e a parietal participam do processo (IZQUIERDO, 2002).

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.

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, parassúbulo, pré-subúbulo, subúbulo 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 subúbulo, assim, como outras áreas, constituindo uma saída da informação pré-processada no hipocampo (PAXINOS & WATSON, 1986) (Figura 3).

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 (Figura 3) (MORRIS, 1989; CHOU & LEE, 1995; IZQUIERDO & MEDINA, 1995; BERNABEU et al., 1996; RUBIN et al., 2000).

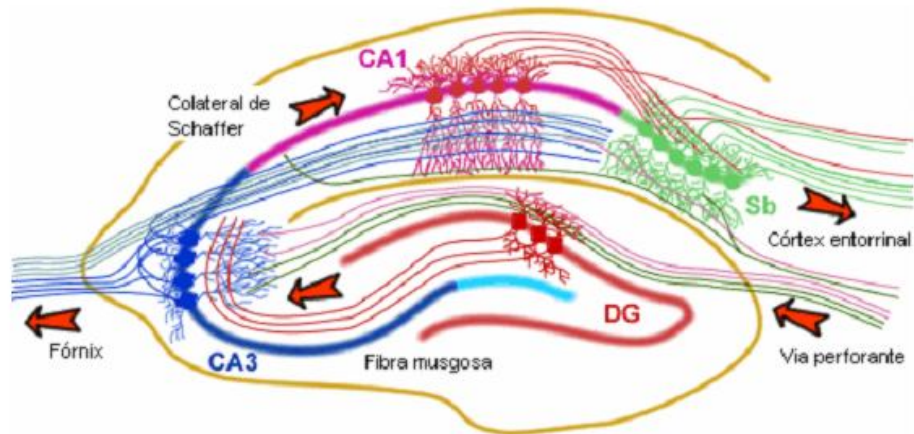


Figure 3. Representação esquemática do hipocampo e seus microcircuitos. (Adaptado de: The University of British Columbia, 2006. Disponível em: <http://www.psych.ubc.ca>).

### 3.1.4 Memória Espacial

A habilidade para armazenar, codificar e recuperar informações sobre localizações espaciais, configurações ou rotas é característica da memória espacial que permite lembrar a localização de objetos ou encontrar o caminho dentro do meio ambiente (KESSELS et al., 2001). Neste contexto, estudos com roedores (EICHENBAUM, 2002) e com primatas (BRASTED et al., 2003) revelam que o hipocampo exerce um papel importante na memória espacial.

Existem três teorias que tentam explicar a formação de uma representação mental da memória espacial, as quais consideram a noção de um sistema com componentes múltiplos.

#### 3.1.4.1 Teoria do Mapeamento Cognitivo

De acordo com O'keefe & Nadel, (1978) o hipocampo possui a capacidade de codificar relações espaciais na forma de um mapa cognitivo. Esses mapas envolvem uma organização na memória de dicas ambientais de acordo com a relevância das relações espaciais entre essas dicas (EICHENBAUM, 1999). A literatura em geral descreve essa memória com relação a dois tipos de referências, a referência aloccêntrica (centrado no mundo) significando uma representação formada com base em informações sobre a localização absoluta em nosso ambiente (distância e direção) independente do observador e a referência egocêntrica, a qual especifica a localização e orientação com respeito ao observador propriamente dito, que utiliza do posicionamento do próprio corpo para traçar coordenadas, como direita/esquerda, acima/abaixo e na frente/atrás (POTÌ, 2000; 2005).

#### 3.1.4.2 Teoria da Memória Operacional

De uma maneira diferente, a teoria de Olton (1979) considera que o hipocampo não é especializado na memória espacial, mas em um processo que consiste em manter e manipular informações ao presente momento ou contexto (ABRAHAMMS et al., 1997) e que o déficit de memória ocorreria porque a localização espacial seria codificada como um evento ou contexto.

#### 3.1.4.3 Teoria das Estratégias de Ligação

De acordo com Eichenbaum (2002), o hipocampo direito forma estratégias de ligação, captando características individuais diferentes da informação em nosso ambiente. As distintas características de uma cena ou de um objeto seriam processadas por meio de vias diferentes do cérebro, mas conectadas quando

necessário. O autor também sugere que o hipocampo relaciona memórias que apresentam duas características principais: a capacidade de comparar e contrastar informações e capacidade de fazer uso da memória em novas situações. Ainda segundo o pesquisador, além de estar associado à memória, o hipocampo também estaria ligado à capacidade de conectar informações.

### 3.1.5 Hipocampo e Memória Espacial

Estudos neuroanatômicos indicam que a memória espacial parece ser processada principalmente no Lobo Temporal Mesial, que consiste do hipocampo (incluindo o giro denteado e o complexo subicular) e áreas corticais adjacentes que são anatomicamente relacionadas ao hipocampo, como os córtices entorrinal, perirrinal e parahipocampal (ZOLA-MORGAN & SQUIRE, 1993; SQUIRE et al., 2004). Dentre as estruturas acima descritas, o hipocampo vem sendo descrito como essencial para a modulação da memória espacial. Segundo O'Keefe e Nadel (1978), o hipocampo é dedicado à criação e ao uso do espaço ou dos mapas cognitivos.

Existem evidências experimentais que fundamentam esse argumento:

1) Trabalhos realizados com animais mostram que danos no hipocampo ou nas suas conexões resultam em um profundo déficit na memória espacial, freqüentemente sem nenhum efeito em outra memória não-espacial (EICHENBAUM, 1999; BEST et al., 2001; BROADBENT et al., 2004). Nesse contexto, estudos mostraram que administração de lidocaína após treino em tarefa espacial não prejudica a retenção do aprendizado quando injetada no córtex perirrinal, mas afeta negativamente quando injetada no hipocampo de ratos (RIEDEL et al., 2003; ROSSATO et al., 2004). De forma complementar, Pothuizen et al. (2005) demonstraram que lesões na porção dorsal, e não na porção ventral do hipocampo, acarretaram déficit significativo no desempenho de testes de memórias espacial.

2) Estudos neurofisiológicos têm demonstrado que a ativação das células do hipocampo, "place cells" (células de localização) estão associadas com a localização do animal no espaço, sugerindo um papel central do hipocampo na codificação desse tipo de informação (EICHENBAUM, 1999). As células de localização são

neurônios piramidais do hipocampo que disparam seletivamente em situações de localização em um ambiente particular (O'KEEFE & DOSTROVSKY, 1971; O'KEEFE & NADEL, 1978). De fato, a exposição a um ambiente desconhecido ou já explorado no passado aumenta a ativação das células de localização da região CA1 em camundongos (WILSON & McNAUGHTON, 1993, 1994; LEUTGEB et al., 2005; CACUCCI et al., 2007).

### 3.1.6 Participação da PKA, CaMKII, CREB na Memória Espacial

Durante o processo de formação da memória ocorre a ativação de receptores e a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  das reservas intracelulares (IZQUIERDO & MEDINA, 1995; ABEL & LATTAL, 2001). Como consequência disso, são ativadas várias enzimas como a PKA, CaMKII e CREB, que por sua vez ativam mecanismos intracelulares que culminam com a síntese protéica, e no aumento da transmissão de informações entre neurônios (MCGAUGH & IZQUIERDO, 2000; MCGAUGH, 2000; 2002).

As proteínas quinases modulam um amplo espectro de processos importantes incluindo plasticidade sináptica, aprendizado e memória. Múltiplos neurotransmissores, hormônios e outras substâncias sinalizadoras usam 3', 5' - adenosina monofosfato cíclico (AMPC) como segundo mensageiro intracelular. O principal alvo para o AMPC é a PKA, a qual medeia transdução de sinal intracelular.

Em 1965, Earl Sutherland identificou o AMPC como sendo o primeiro segundo mensageiro intracelular (SUTHERLAND & RALL, 1957; SUTHERLAND et al., 1965). Mais tarde Edwin Krebs, Paul Greengard, e colaboradores purificaram a PKA de músculo esquelético de coelhos (WALSH et al., 1968; REIMANN et al., 1971), e mostraram que a atividade desta proteína quinase era estimulada por AMPC (MIYAMOTO et al., 1968, 1969; WALSH et al., 1968; BEAVO et al., 1974). Outros avanços foram possíveis através de manipulações genéticas e técnicas de biologia molecular, caracterizando a funcionalidade da enzima (McKNIGHT et al., 1988; BEEBE, 1994; SKALHEGG & TASKEN, 2000).

A família da PKA possui quatro subunidades regulatórias (R $\alpha$ , R $\beta$ , RII $\alpha$ , RII $\beta$ ) e três subunidades catalíticas (C $\alpha$ , C $\beta$ , C $\gamma$ ). Cada subunidade é codificada por um único gene (McKNIGHT et al., 1988; DOSKELAND et al., 1993) e todos eles são expressos no cérebro de mamíferos (CADD & MCKNIGHT, 1989). Duas isoenzimas da PKA, chamadas tipo I (com dímeros R $\alpha$  e R $\beta$ ) e tipo II (com dímeros RII $\alpha$  e RII $\beta$ ), têm sido caracterizadas e foram inicialmente identificadas (TASKEN et al., 1993; FRANCIS & CORBIN, 1999; SKALHEGG & TASKEN, 2000). Na ausência de AMPc, PKA é uma holoenzima tetramérica inativa, composta por duas subunidades R ligadas a duas subunidades C, cada subunidade R possui dois sítios de ligação para o AMPc, um sítio de alta afinidade e um sítio de baixa afinidade (TAYLOR et al., 1990). A ligação sequencial e cooperativa de AMPc a estes dois sítios de ligação liberam as subunidades C monoméricas. Estas subunidades dissociadas podem então fosforilar resíduos de serina e treonina de inúmeras proteínas (TAYLOR et al., 1990; GIBBS et al., 1992).

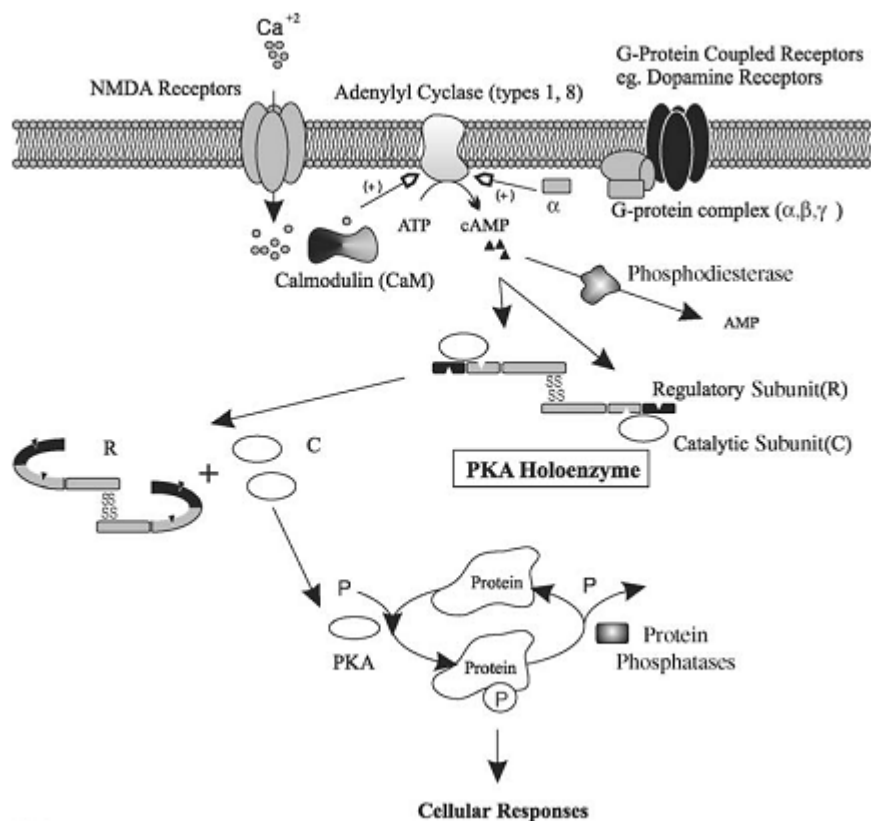


Figura 4. Cascata de sinalização AMPc/PKA (NGUYEN & WOO, 2003).

A cascata de sinalização AMPc/PKA hipocampal é principalmente ativada por dois mecanismos (Figura 4). A primeira envolve  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  (cálcio/calmodulina), o influxo de cálcio estimula a adenilato ciclase I (AC I) sensível a  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ , a qual sintetiza AMPc (ELIOT et al., 1989). Uma via de influxo de cálcio é através do receptor NMDA, a ativação destes receptores pode aumentar níveis de AMPc no hipocampo (CHETKOVICH et al., 1991). Além disso, a adição de calmodulina aumenta a ativação da AC sensível a  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  (CHETKOVICH & SWEATT, 1993); por outro lado, inibidores de calmodulina bloqueiam a produção de AMPc associada a ativação do receptor NMDA (CHETKOVICH & SWEATT, 1993).

O segundo mecanismo de ativação para sinalização de AMPc/PKA é a ligação de neurotransmissores e hormônios a receptores acoplados a proteínas G estimulatória (TANG & GILMAN, 1991). Estas proteínas G interagem com AC na superfície interna da membrana ativando a produção de AMPc. Muitos neurotransmissores podem ativar PKA através do acoplamento a proteínas (MONSMA et al., 1990).

É bem estabelecido que a PKA regula muitos processos através de fosforilação de proteínas. Além disso, fosfatases tais como proteína fosfatase 1 e fosfatase regulada por cálcio podem defosforilar proteínas fosforiladas por PKA, tornando este evento reversível.

A primeira demonstração do papel do AMPc na memória espacial vem de 1995, quando Daniel Storm e colaboradores examinaram os efeitos de mutações no gene que codifica AC I no comportamento (WU et al., 1995). Eles encontraram que camundongos mutantes para AC I tinham reduções na síntese de AMPc estimulado por cálcio e exibiram déficits de memória (WU et al., 1995).

Para definir o papel da PKA no aprendizado e memória em roedores, Abel e colaboradores (1997) criaram camundongos transgênicos R(AB), uma forma dominante negativa da subunidade regulatória da PKA. Poucos estudos têm comprovado os efeitos farmacológicos de inibidores da PKA no aprendizado espacial, talvez porque seja necessário inibir a enzima durante cada sessão de treino. Surpreendentemente uma única infusão de H-89, um inibidor da proteína PKA, na região CA1 do hipocampo prejudicou a memória espacial em ratos (SHARIFZADEH et al., 2005).

Estudos bioquímicos sobre a ativação da PKA revelam que o aprendizado espacial está relacionado com ativação da PKA no hipocampo e que este processo

induz a uma cascata de ativação que leva a consolidação da memória, esta cascata pode envolver a ativação de CREB (VAZQUEZ et al., 2000; MIZUNO et al., 2002).

Nesse contexto, outra quinase relacionada com o aumento das concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e a formação da memória é a CaMKII, (LISMAN et al., 2002; SILVA, 2003). A CaMKII é uma enzima multifuncional que consiste de 6-12 subunidades chamadas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ , é a quinase mais abundante no cérebro, compreendendo 2% das proteínas hipocâmpais (ERONDU & KENNEDY, 1985; BRAUNS & SCHULMAN, 1995), as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  são as formas predominantes em cérebro (LISMAN et al., 2002), além disso é o principal alvo para a sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  e participante chave nos processos de transdução de sinal (GHOSH & GREENBERG, 1995; MALENKA & NICOLL, 1999). A ativação de CaMKII especialmente,  $\alpha$ -CaMKII no hipocampo, tem um papel central na formação da sinapse, modificação estrutural do citoesqueleto, síntese e liberação de neurotransmissores, funcionamento de receptores e canais iônicos, expressão gênica e neuroplasticidade, aprendizado e memória (KANDEL & HAWKINS, 1992; SODERLING, 1993; GIESE et al., 1998).

A CaMKII é uma quinase específica Ser/Thr que consiste de um domínio catalítico N-terminal, um domínio de regulação, e um domínio de associação (Figura 5). Na sua forma inativa, o domínio regulatório da enzima, que possui sítio de ligação para  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ , está ligado ao sítio catalítico da enzima funcionando como pseudosubstrato. Na presença de  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  a subunidade regulatória desliga da subunidade catalítica, caracterizando o estado ativo da enzima. Uma vez ativada, a CaMKII não somente fosforila outras proteínas, mas também desenvolve uma atividade de autofosforilação no resíduo Thr 286. (MILLER & KENNEDY, 1986; MAYFORD et al., 1996; LISMAN et al., 2002).



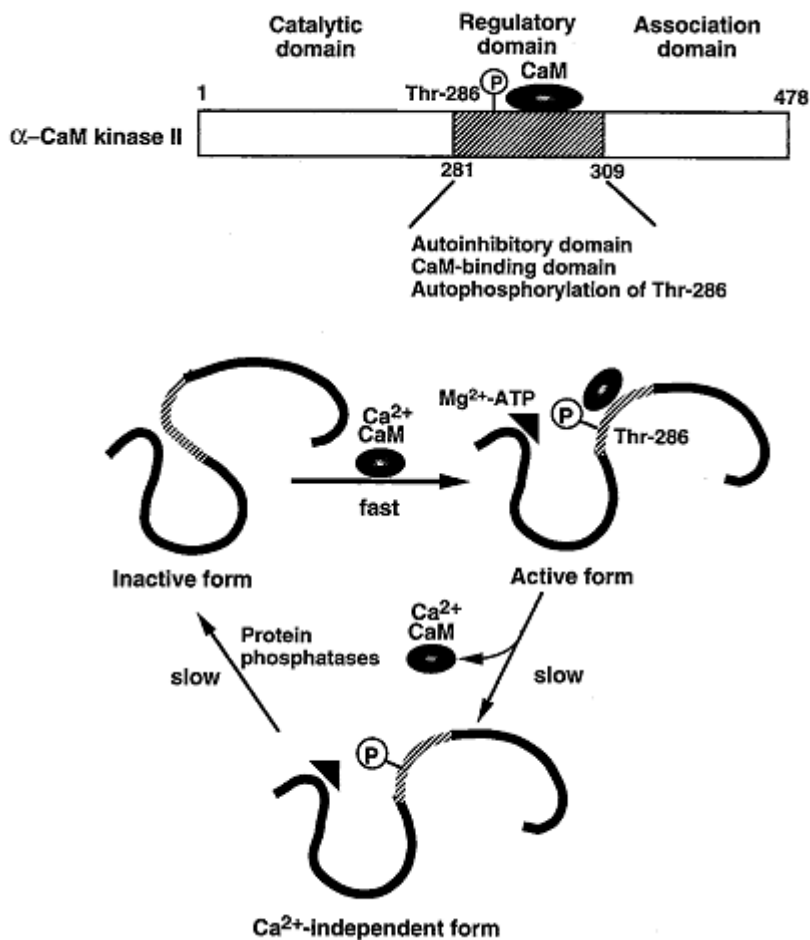


Figura 5. Esquema representativo da ativação da CaMKII (FUKUNAGA & MYAMOTO, 1999).

A ativação da CaMKII apresenta dois efeitos:

1. Um aumento da afinidade para o complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ , prolongando o tempo da quinase ativa. (MAMMEN et al., 1997)
2. Atividade autônômica do complexo cinase fosforilada, mesmo após o complexo  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  ter se dissociado do complexo quinase, o que prolonga o estado ativo (MORRIS et al., 1986; SILVA et al., 1992).

Em camundongos, a expressão de uma forma constitutiva ativa independente prejudica aprendizado em tarefas espaciais e medo condicionado (MAYFORD et al., 1996). Mutações na CaMKII prejudica o aprendizado espacial em camundongos (SILVA et al., 1992) e tem sido evidenciado que embora camundongos heterozigotos, para CaMKII, apresentam retenção normal em testes de medo condicionado e labirinto aquático de Morris 1-3 dias pós-treino, estes animais são amnésicos quando testados 10-50 dias pós-treino (FRANKLAND et al., 2001).

A  $\alpha$ -CaMKII desenvolve importante papel na plasticidade nas sinapses glutamatérgicas no hipocampo e em formação de memória espacial (ELGERSMA et al., 2004). O camundongo mutante para o gene da  $\alpha$ -CaMKII (T286A), o qual tem um ponto alvo de mutação que inativa a autofosforilação da  $\alpha$ -CaMKII, não apresenta LTP dependente de receptor NMDA na região CA1 do hipocampo (GIESE et al., 1998; COOKE et al., 2006) e mostra profundo déficit comportamental em aprendizado espacial (MORRIS et al., 1982; BACH et al., 1995; GIESE et al., 1998; NEED & GIESE, 2003). Interessantemente, a super expressão da  $\alpha$ -CaMKII melhora a performance de ratos no Labirinto Aquático de Morris (POULSEN et al., 2007).

Alguns estudos tem indicado a importância da  $\alpha$ -CaMKII para a funcionalidade das células de localização no hipocampo (CHO et al., 1988; CACUCCI et al., 2007).

CREB é uma proteína nuclear que modula a transcrição de proteínas como o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), a tirosina hidroxilase e neuropeptídeos (MONTMINY, 1997; LONZE & GINTY, 2002; CHANG & HUANG, 2006). As proteínas quinases como a PKA e a CaMKII são conhecidas por fosforilar CREB no resíduo de Ser<sup>133</sup> (LONZE & GINTY, 2002), esta fosforilação pode iniciar a transcrição de genes necessária para a formação de memórias de longa duração (YAMAMOTO et al., 1988; GONZALEZ & MONTMINY, 1989; SHENG et al., 1991). Neste contexto, o papel de CREB no aprendizado dependente do hipocampo foi elucidado por estudos com oligonucleotídeo anti-sentido e camundongos transgênicos, estes estudos mostraram que a supressão da função de CREB em neurônios hipocâmpais prejudica a consolidação do aprendizado espacial de longa duração, mas não afeta aprendizado de curta duração (GUZOWSKI & MCGAUGH 1997; ZHANG et al., 2003; FLORIAN et al., 2006). Além disso, camundongos mutantes para CREB desenvolveram prejuízo no aprendizado espacial (BOURTCHULADZE et al., 1994; HUMMLER et al., 1994).

Diversos estudos têm evidenciado que a formação da memória espacial está associada com aumento de fosforilação de CREB (pCREB) no hipocampo (MIZUNO et al., 2002; COLOMBO et al., 2003; MONCADA & VIOLA 2006; PORTE et al., 2008), e que a falta de aumento na fosforilação de CREB após tarefas de aprendizado caracteriza déficits de memória espacial (BRIGHTWELL et al., 2004; KUDO et al., 2005; PORTE et al., 2008).

Nesse contexto, existem alguns compostos que podem prejudicar ou facilitar a formação da memória (SQUIRE & KANDEL, 2003), por inibir ou aumentar a

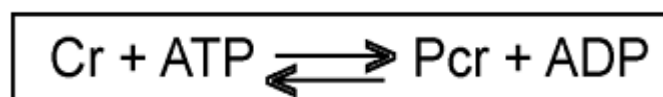
ativação de CREB. Além disso, existem compostos que também podem exercer efeito benéfico sobre a memória, entre eles estão os substratos energéticos, como a creatina.

### 3.2 Creatina

A Cr (N-[aminoiminometil]-N-metilglicina) é um composto guanidínico endógeno que foi primeiramente isolado em 1835 por Chevreul em um extrato de carne. Quase cem anos mais tarde, Fiske e Subbarow (1927) juntamente com Eggleton & Eggleton descobriram a PCr, que devido a sua natureza lábil foi chamada de “fosfosgen”.

Em 1930, Lundsgaard demonstrou que a contração muscular era acompanhada por uma maior quebra de PCr do que de uma produção de lactato, e propôs que a PCr apresentava um envolvimento central no suporte energético para a contração muscular.

Em 1934, Lohmann descobriu a reação da enzima Creatina Kinase (CK), na qual o grupo  $\gamma$ -fosfato do ATP é transferido a Cr para formar ADP e PCr. A identificação das isoenzimas mitocondrial e citosólica da CK nas décadas de 1960 e 1970 levou Saks e colaboradores (1978) e também Bessman & Geiger (1981) a propor a “lançadeira da PCr”. De acordo com essa hipótese, as isoenzimas mitocondrial e citosólica da CK trabalham em direções opostas. Enquanto a isoenzima mitocondrial da CK catalisa a síntese de PCr a partir do ATP produzido pela fosforilação oxidativa na matriz mitocondrial, a isoenzima citosólica catalisa a regeneração do ATP a partir da PCr nos sítios de consumo (Esquema 1). Dessa maneira o sistema CK/PCr/Cr aumenta consideravelmente a capacidade total para o transporte intracelular do fosfato de alta energia.



Esquema 1. Esquema representativo da reação da enzima creatina quinase

A síntese de Cr se dá a partir da glicina, arginina e S-adenosilmetionina nos rins, fígado, pâncreas, testículos (PERSKY & BRAZEAU, 2001) e cérebro (BRAISSANT et al., 2001). O primeiro passo na síntese é nos rins, e envolve a transferência reversível de um grupo amino da arginina formando guanidinoacetato e ornitina na reação catalisada pela enzima L-arginina: glicina amidinotransferase (AGAT). No fígado, ocorre a segunda etapa, onde a transferência irreversível do grupo metil da S-adenosilmetionina é doado para o guanidinoacetato pela S-adenosilmetionina: N-guanidinoacetato metiltransferase (GAMT), formando Cr (PERSKY & BRAZEAU, 2001) (Figura 6).

A Cr é também obtida exogenamente pela dieta no consumo de carnes e peixes (BALSOM et al., 1994). São necessários aproximadamente dois gramas de creatina diariamente, obtidos tanto da dieta quanto da síntese endógena (CASEY & GREENHAFF, 2000).

Uma vez formada, a Cr entra na circulação por difusão e pode ser transportada para o interior dos tecidos contra um gradiente de concentração por um transportador  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  dependente (GUERRERO-ONTIVEROS & WALLIMANN, 1998), podendo ser armazenada tanto na forma livre (Cr), quanto na forma fosforilada (PCr). Cerca de 90% da Cr está armazenada na forma de PCr no músculo e o restante no cérebro e outros órgãos (WALKER, 1979; WYSS & KADDURAH-DAOUK, 2000). Além disso, a Cr pode ser eliminada pela filtração glomerular na forma de creatinina, que é o produto final da degradação da Cr formado por uma reação não-enzimática e irreversível (GREENHAFF, 1997).

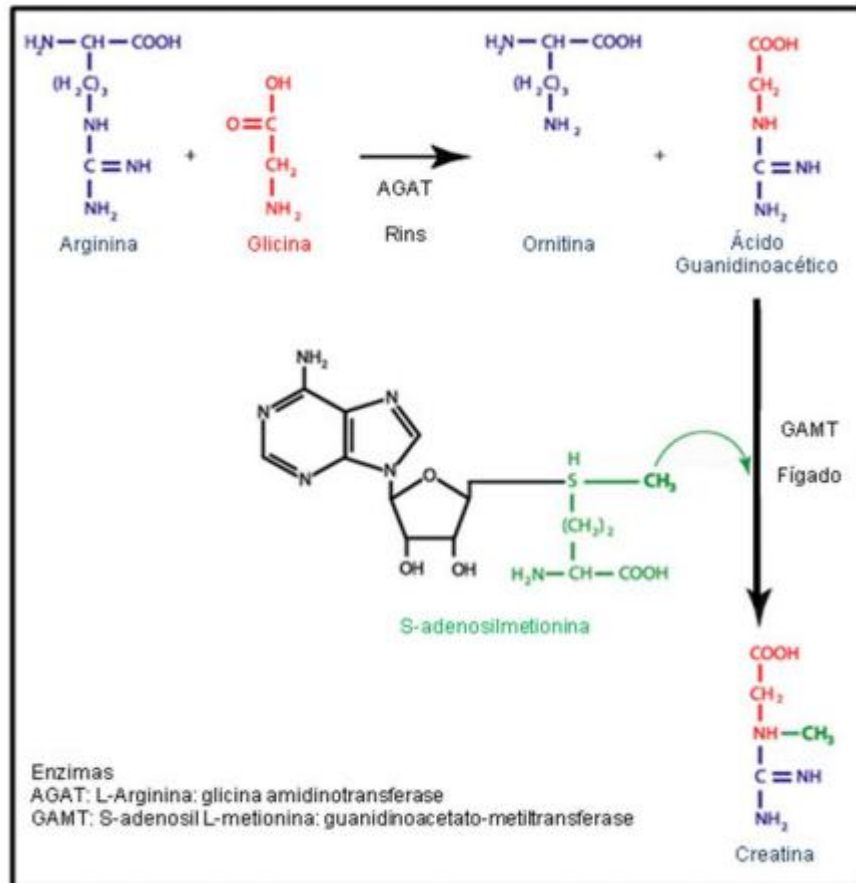


Figura 6. Biossíntese da creatina. (adaptado de WYSS & KADDURAH-DAOUK, 2000).

Devido a sua importância fisiológica como mecanismo de reserva energética (ATP), principalmente no músculo (WYSS & KADDURAH-DAOUK, 2000), como transportador de ATP dos sítios de produção (mitocôndria) para os sítios de consumo (citosol) (WALLIMANN et al., 1998) e como tampão energético (PAN & TAKAHASHI, 2007), a Cr tem sido utilizada por atletas como suplemento alimentar, para melhorar a performance em exercícios de alta intensidade e curta duração (PERSKY & BRAZEAU, 2001), diminuir a fadiga muscular, proporcionar uma rápida recuperação pós exercício (MUJIKÁ & PADILLA, 1997) e aumentar a massa muscular (FELDMAN et al., 1999; POORTMANS & FRANCAUX, 2000).

Os benefícios da Cr vão além destes obtidos pelos atletas, pois ela apresenta propriedades antioxidantes diretas *per se* (LAWLER et al., 2002; SESTILI et al., 2006) e também neuroprotetoras em alguns modelos de doenças neurológicas (ANDRES et al., 2008; YANG et al., 2009).

### 3.2.1 Efeito Neuroprotetor da Creatina

A Cr apresenta efeitos protetores em várias alterações neurológicas que possuem semelhantes mecanismos bioquímicos. A depleção energética, estresse oxidativo por espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio, excitotoxicidade e disfunção mitocondrial tem sido implicado nestas alterações neurológicas (BROWNE & BEAL, 1994; BEAL, 1996). Embora estes processos possam estar diretamente ou indiretamente envolvidos na patogênese destas doenças, eles convergem em uma via comum final que resulta em necrose e apoptose celular (ANDRES et al., 2008).

Dentre as patologias com semelhantes processos bioquímicos, encontram-se as alterações neurológicas agudas (traumatismo crânio-encefálico (TCE), acidente vascular encefálico (AVE); as doenças neurodegenerativas crônicas (doença de Parkinson (DP), Alzheimer) e os erros inatos do metabolismo. (ANDRES et al., 2008).

#### 3.2.1.1 Creatina e Doenças Neurológicas Agudas

O AVE isquêmico pode rapidamente levar a morte celular devido a um comprometimento no metabolismo (LIPTON & WHITTINGHAM, 1982), freqüentemente resultando em seqüelas neurológicas. O efeito neuroprotetor da administração de Cr foi observado em modelos experimentais de isquemia cerebral, onde o tratamento prévio com Cr atenuou a lesão isquêmica e aumentou os níveis de PCr cerebrais (ADCOCK et al., 2002; LENSMAN et al., 2006). Estudos recentes mostraram que camundongos com isquemia cerebral transitória focal tratados com Cr obtiveram uma redução no volume da lesão sem alterações significativas nos níveis de Cr, PCr e ATP no cérebro (PRASS et al., 2007).

O traumatismo crânio-encefálico – lesão cerebral ou concussão (TCE) representa a maior causa mundial de mortalidade em indivíduos com até 45 anos (WERNER & ENGELHARD, 2007). O TCE e a lesão na medula espinhal são

conhecidos por iniciar uma série de eventos excitotóxicos que ocorrem em minutos a dias nas regiões próximas ao dano (PALMER et al., 1993; POTTS, 2006; SAKELLARIS et al., 2006). Este dano secundário é parcialmente devido à isquemia e comprometimento da bioenergética celular. A Cr mediando neuroproteção tem sido demonstrada em modelos experimentais de TCE, onde suplementação de Cr proporciona redução na extensão do dano e manutenção da homeostase mitocondrial após o TCE (SULLIVAN et al., 2000; RABCHEVSKY et al., 2003)

Em investigações clínicas a suplementação de Cr, por um período de 6 meses em crianças e adolescentes que sofreram TCE, resultou em uma melhor recuperação cognitiva, comportamental e social (SAKELLARIS et al., 2006). Nesse contexto, Rebaudo e colaboradores (2000) sugerem que pacientes que sofreram TCE ou dano a medula espinhal podem ter efeito benéfico imediatamente após administração de Cr, pois esta pode ser entregue diretamente aos sítios de injúria por perfusão da região afetada ou administração intracerebroventricular, o qual leva a um rápido aumento nos níveis de Cr no cérebro. A suplementação de Cr também mostrou ser protetora após lesão na medula espinhal de ratos (HAUSMANN et al., 2002; RABCHEVSKY et al., 2003).

### 3.2.1.2 Creatina e Doenças Neurodegenerativas

A Doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa comum que afeta mais que 1% dos indivíduos acima de 50 anos (MARTTILA & RINNE, 1987), cujos sintomas clínicos incluem tremor em repouso, bradicinesia, rigidez e instabilidade postural (LANG & LOZANO, 1998). A DP é caracterizada por uma progressiva deterioração de neurônios dopaminérgicos na substância negra, levando a redução ou perda da função dopaminérgica no estriado. Além disso, ocorre prejuízo da função do sistema de transporte de elétrons mitocondrial, em particular do complexo I (SCHAPIRA et al., 1990; ALAM & SCHMIDT, 2002), sugerindo um envolvimento mitocondrial na patogênese da doença.

O efeito benéfico da Cr tem sido demonstrado em modelo animal de DP, onde a suplementação de Cr diminuiu a toxicidade de 1-metil-4-fenil piridina (MPTP)

atenuando a perda de tirosina hidroxilase e dopamina em neurônios (MATTHEWS et al., 1999; YANG et al., 2009). Em estudos clínicos pilotos, a suplementação de Cr resultou em melhora do humor e em pequenas doses aumentou os efeitos da terapia dopaminérgica (BENDER et al., 2006) e reduziu a progressão da doença (NINDS-NET-PD-Investigators 2006).

Na Doença de Alzheimer (DA) ocorrem mutações na proteína precursora amilóide (APP), resultando em clivagem anormal de APP e acúmulo do peptídeo  $\beta$ -amilóide, o principal constituinte da placa amilóide no cérebro (BLENNOW et al., 2006). Além disso, em pacientes com DA tem sido registrado alterações na produção e concentração de ATP (AKSENOV et al., 2000) e redução de 80% na atividade da isoenzima cerebral da CK (AKSENOV et al., 2000). Entretanto, em homogeneizados de cérebros de pacientes com DA, a análise espectrofotométrica não revelou disfunção nos complexos da cadeia respiratória mitocondrial (CASADEMONT et al., 2005).

Alguns estudos têm evidenciado o efeito neuroprotetor da Cr em cultura de neurônios submetidos a insultos por excitotoxicidade de glutamato ou por exposição ao peptídeo  $\beta$ -amilóide (BREWER & WALLIMANN, 2000). Especula-se que a suplementação de Cr no começo da doença possa prevenir ou retardar a neurodegeneração relacionada à doença por aumentar o aporte energético e proporcionar manutenção da homeostase mitocondrial (BURKLEN et al., 2006).

Além desses efeitos neuroprotetores da Cr em modelos de doenças neurodegenerativas, há relatos na literatura sobre a ação desse composto ergogênico na neurotoxicidade induzida por metabólitos que acumulam em alguns erros inatos do metabolismo (KÖLKER et al., 2001; DAS et al., 2003; ROYES et al., 2003; 2006; VASQUES et al., 2006). Entre esses EIM, podemos citar a síndrome da deficiência de creatina (SDCr), uma doença caracterizada clinicamente por um atraso cognitivo importante.

A SDCr se apresenta por um déficit na atividade de uma ou duas enzimas envolvidas na síntese de Cr, a AGAT ou a GAMT (SYKUT-CEGIELSKA et al., 2004), ou ainda no transportador de Cr (CreaT) (deGRAUNW et al., 2002). No cérebro, esta deficiência está envolvida na patogênese de alguns fenótipos neurológicos hereditários graves (LEUZZI et al., 2000; VAN DER KNAAP et al., 2000) e sintomas como: convulsões, autismo e graus variados de retardo mental. Devido aos efeitos neurotóxicos do guanidino acetato (GAA) (ZUGNO et al., 2006), o qual se acumula



na substância cinzenta, pacientes com deficiência na GAMT apresentam movimentos hipercinéticos distônicos (SIJENS et al., 2005). Pacientes com deficiência no CreaT apresentam uma elevada razão Cr:Creatinina na urina. Deficiências nas enzimas GAMT e AGAT podem ser tratadas com suplementação oral de Cr (SCHULZE et al., 2003), enquanto pacientes com deficiência no CreaT não respondem a este tipo de tratamento (STOCKLER et al., 1996; MERCIMEK-MAHMUTOGLU et al., 2006). Mais uma vez estas observações enfatizam a importância do sistema Cr-PCr para o funcionamento normal do cérebro.

### 3.2.2 Efeito Neuromodulador da Creatina

Além de seu efeito neuroprotetor alguns estudos têm sugerido que a Cr pode ser sintetizada nos astrócitos, captada pelos neurônios (BRAISSANT et al., 2001) e liberada após estimulação elétrica (ALMEIDA et al., 2006). Esta liberação excitotóxica pode ser prevenida pela adição de quelante de cálcio ou bloqueador de canais de sódio (ALMEIDA et al., 2006). Estes dados indicam que Cr não é somente sintetizada e captada por neurônios, mas também liberada de uma maneira dependente de potencial de ação, suportando fortes evidências para seu papel como neuromodulador no cérebro (Figura 7).

De acordo com esses dados, Royes e colaboradores (2008), verificaram que Cr aumenta o binding de [<sup>3</sup>H] MK-801 e facilita a transmissão sináptica hipocampal e, este efeito é atenuado pelo antagonista do receptor NMDA (AP5). Além de sua ação neuroprotetora e neuromoduladora, alguns estudos têm sugerido o envolvimento da Cr em processos fisiológicos importantes como aprendizado e memória (WATANABE et al. 2002; RAE et al., 2003; VALENZUELA et al. 2003).

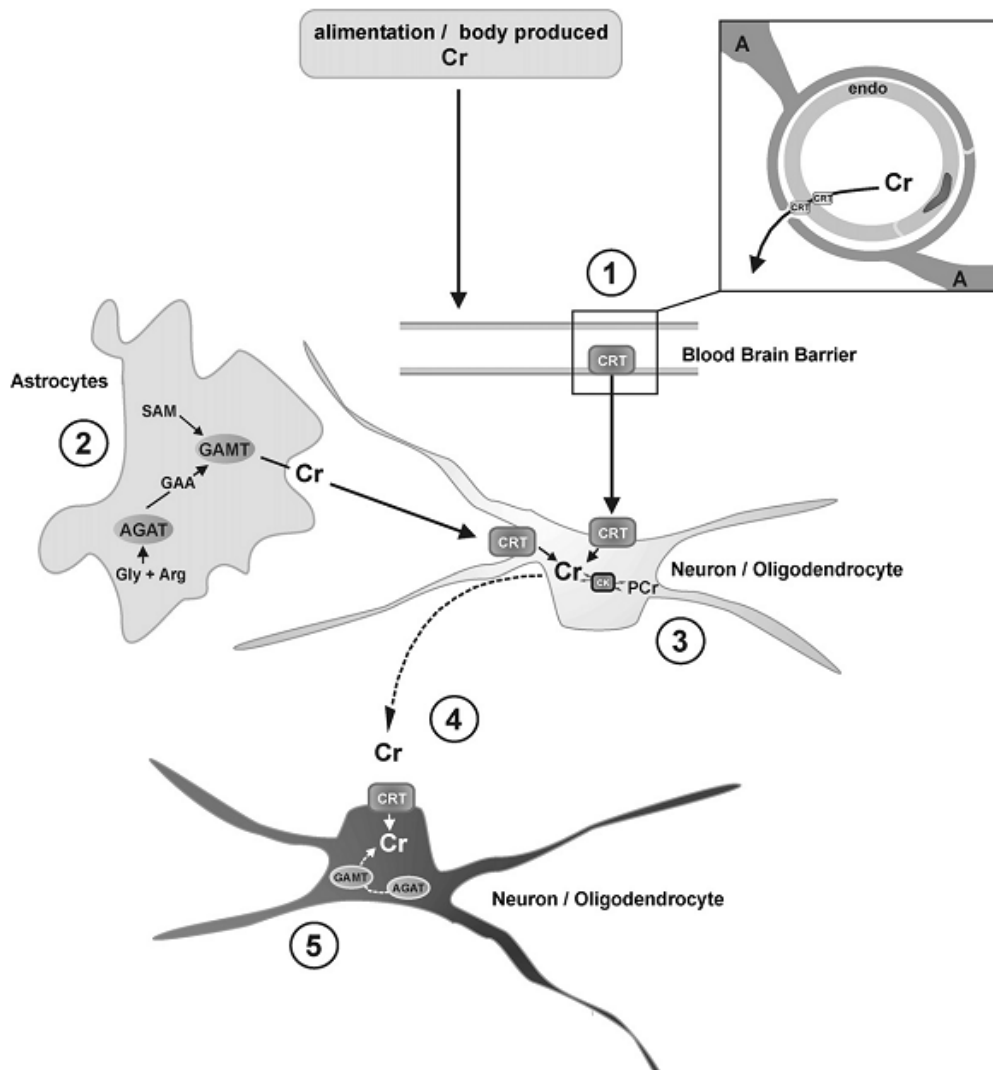


Figura 7. Transporte, síntese e liberação de creatina no sistema nervoso central. CRT: transportador de creatina; AGAT: L-arginina: glicina amidinotransferase; SAM: S-adenosilmetionina guanidinoacetato; GAMT: S-adenosilmetionina: N-guanidinoacetato metiltransferase (ANDRES et al. 2008).

Nesse contexto, Oliveira e colaboradores (2008) verificaram que a administração de Cr no hipocampo melhorou o aprendizado espacial em ratos, devido a modulação do sítio de ligação das poliaminas no receptor NMDA. As poliaminas são um grupo de amins alifáticas que atuam como moduladores endógenos do canal NMDA e exercem um importante papel na modulação da memória (IZQUIERDO & MEDINA 1997; RUBIN et al. 2000, 2004). Embora diversos estudos tenham apontado para o efeito neuroprotetor da Cr e seus efeitos na melhora da cognição, pouco se sabe sobre o mecanismo de ação pelo qual a Cr exerce seu efeito no aprendizado e memória. Dessa forma, é objetivo deste trabalho investigar o envolvimento da

administração intra-hipocampal da Cr na fisiopatologia do processo de formação da memória espacial em ratos.

---

## 4. CAPÍTULOS

## **4. CAPÍTULOS**

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados neste item, o qual apresenta-se dividido sob forma de artigos científicos (capítulos I e II). Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos resultados e Bibliografia, encontram-se nos mesmos.

**4.1 Capítulo I – O envolvimento das proteínas quinase dependente de AMPc (PKA) e proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina (CaMKII) hipocampais, na facilitação do aprendizado espacial induzido por creatina**

Manuscrito submetido para publicação na revista Experimental Brain Reseach

**THE INVOLVEMENT OF HIPPOCAMPAL cAMP-DEPENDENT PROTEIN KINASE A (PKA) AND CALCIUM CALMODULIN-DEPENDENT PROTEIN KINASE II (CAMKII) IN CREATINE-INDUCED SPATIAL LEARNING ENHANCEMENT**

Mauren Assis de Souza, Danieli Valnes Magni, Gustavo Petri Guerra, Mauro Schneider Oliveira, Ana Flávia Furian, Letícia Pereira, Silvia Vacari Marquez, Juliano Ferreira, Luiz Fernando Freire Royes, Michele Rechia Fighera.

## THE INVOLVEMENT OF HIPPOCAMPAL cAMP-DEPENDENT PROTEIN KINASE A (PKA) AND CALCIUM CALMODULIN-DEPENDENT PROTEIN KINASE II (CAMKII) IN CREATINE-INDUCED SPATIAL LEARNING ENHANCEMENT

Mauren Assis Souza<sup>a,b</sup>; Danieli Valnes Magni<sup>d</sup>; Gustavo Petri Guerra<sup>d</sup>; Mauro Schneider Oliveira<sup>a</sup>; Ana Flávia Furian<sup>f</sup>; Letícia Pereira<sup>a</sup>; Silvia Vacari Marquez<sup>a</sup>; Juliano Ferreira<sup>b,d</sup>; Luiz Fernando Freire Royes<sup>a,c</sup>, Michele Rechia Fighera<sup>e\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Ciências da Saúde  
Laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia  
Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Santa Maria,  
97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>b</sup> Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia  
Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Santa Maria,  
97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>c</sup> Centro de Educação Física e Desportos.  
Departamento de Métodos e Técnicas Desportivas, Universidade Federal de Santa Maria,  
97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>d</sup> Centro de Ciências Naturais e Exatas Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:  
Bioquímica Toxicológica  
Departamento de Química,  
Universidade Federal de Santa Maria  
97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>e</sup> Serviço de Neurologia  
Hospital São Lucas  
Porto Alegre, PUC-RS.

<sup>f</sup> Unipampa-campus Itaqui  
Rua Luiz Joaquim de Sá Britto,  
97650-000, Itaqui – RS.

Study supported by CNPq , CAPES and FINEP (Brasil).

\* Corresponding author: Dr<sup>a</sup>. Michele Rechia Fighera  
Serviço de Neurologia  
Hospital São Lucas  
Porto Alegre, PUC-RS.  
e-mail:mrfighera@yahoo.com.br

## Abstract

Although Creatine (Cr) and Phosphocreatine (PCr) system plays a key role in cellular energy and energy transport in cells with fluctuating energy requirements like neurons, its implications for learning and memory are still controversial. Thus, we decide to investigate the involvement of trans-cellular Cr transport and intracellular trafficking in spatial learning improvement elicited by Cr in rats. For this propose, we investigated involvement of Cr transporter (CreaT), cAMP-dependent protein kinase A (PKA) and  $Ca^{2+}$ / calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) signaling pathway in the spatial learning after intrahippocampal injection of Cr. Statistical analysis revealed that intrahippocampal administration of Cr (2.5 nmol/side) post-training decreased the latency for scape and mean number of errors in Barnes-Maze test. Besides, we showed that intrahippocampal administration of 3-guanidinopropionic acid (3-GPA (an inhibitor of Cr transporter); 0.5 to 5 nmol/side) post training had no effect on spatial learning. However, post-training co-administration of 3-GPA (5 nmol/side) attenuated the facilitatory effect of Cr (2.5 nmol/side) characterized by latency for escape and mean number errors increase. The effect of PKA activity inhibitor (H-89) on Cr-induced spatial improvement was also evaluated. Statistical analysis showed that intrahippocampal injection of H-89 (0.25; 2.5 and 25  $\mu$ mol/side) did not alter the latency and number of error in Barnes maze test, however, the post-training co-administration H-89 (25  $\mu$ mol/side) decreased the facilitatory effect of Cr on latency for escape and the mean number errors. In addition, we showed that intrahippocampal injection of STO-609, an inhibitor of CaMKII, (0.5-5nmol/side) did not have effect in this model of spatial learning, however, statistical analysis revealed that post-training co-administration of STO-609 (5nmol/side) decreased the effect of Cr on latency for escape and the mean number errors. These data suggest that spatial learning enhancement elicited by Cr may be mediated by trans-cellular creatine transports and intracellular PKA and CaMKII pathway.

**Key words:** Creatine, spatial memory, Cr transporter (CreaT); protein kinases; hippocampus.



## Introduction

Creatine (*N*-[aminoiminomethyl]-*N*-methyl glycine) is a guanidine compound synthesized from glycine, arginine and *S*-adenosylmethionine in kidneys, liver, pancreas and brain (Wyss and Kaddurah-Daouk 2000). Initially, Cr was confined to athletes involved in sports that required high-intensity intermittent exercise performance by increase intracellular stores of Cr and its phosphorylated form, PCr (Persky and Brazeau 2001). Recently, it has been demonstrated that supplementation of this nutrient may improve the cognitive function by increase the brain Cr (9%) and PCr (4%) levels (Dechent et al. 1999; Mille et al. 2007). Furthermore, Cr enhances intelligent test scores, reduces mental fatigue and protects against decrease in cerebral oxygenated hemoglobin when subjects repeatedly perform a mathematical calculation (Watanabe et al. 2002; Rae et al. 2003; Valenzuela et al. 2003).

Nevertheless, the view that Cr exerts its functions exclusively via effects in intracellular cellular energy metabolism (Wyss and Kaddurah-Daouk 2000) cannot explain a number of recently reported findings that suggest a direct modulatory role in the central transmission processes (Andres et al. 2008). In this context, experimental findings *in vitro* have demonstrated that Cr is release from neocortex, caudate putamen and hippocampus slices, an effect dependent of  $\text{Ca}^{2+}$  influx and of  $\text{Na}^+$  channel stimulation (Almeida et al. 2006). Accordingly, results from our group have demonstrated that intrahippocampal administration of Cr leads to spatial learning improvement by mechanism that depends partially of its interaction with the extracellular polyamine binding site at the *N*-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptor (Oliveira et al. 2008). Nonetheless, the full mechanism by which Cr benefits cognition, as well as the neuronal conditions in which this guanidine compound could be effective in spatial learning, remains to be elucidated.

The memory can be divided into at least two forms according to its temporal and biochemical properties: short term memory (STM), which last no longer than few hours, and long-term memory (LTM), which last from several hours to days or even longer (McGaugh 1966; Matthies 1989; Bozon et al. 2003). Most findings argue that  $\text{Ca}^{2+}$  and cAMP-mediated pathway activation is a necessary step for the establishment of LTM through the coincident activation of several protein kinases including PKA (McGaugh 1966; Izquierdo and Medina 1997; Nguyen and Woo 2003).

Experimental findings in rodents have provided evidence that PKA is activated in the course of spatial learning in the hippocampus (Mizuno et al. 2002). In addition, pharmacological inhibition of both the catalytic and regulatory subunits of PKA blocks LTM when inhibitors were administered immediately after training session in the hippocampus (Vianna et al. 1999; Vianna et al. 2000). Consistent with the view that the activation of the PKA signaling pathway in the hippocampus plays an important role in spatial memory formation, several lines of evidences indicate that  $Ca^{2+}$ /calmodulin-stimulated isoforms of adenylyl cyclase (AC) are involved in long-term potentiation (LTP) and certain forms of learning (Alberini 2009). It is known that entry of  $Ca^{2+}$  through NMDA channel during LTP induction in the CA1 region of the hippocampus stimulates the activation and persistent autophosphorylation of CaMKII, while inhibition of CaMKII abolishes the induction of synaptic potentiation (Malenka et al. 1989; Fukunaga et al. 1993; Otmakhov et al. 1997).

Therefore, considering that Cr may exert its action in Central Nervous System (CNS) through extracellular (such as interacting with NMDA receptor) or intracellular (such as, acting as an energy buffer) the propose of this work was to investigate the role of trans-cellular Cr transport and intracellular trafficking in spatial learning improvement elicited by Cr in rats. For this propose, we investigated involvement of Cr transporter (CreaT), PKA and CaMKII signaling pathway in the spatial learning after intrahippocampal injection of Cr.

## **Materials and Method**

### *Animals*

In the present study adult male Wistar rats (270–300 g) were used, housed five to a cage on controlled light and environment (12-h light/dark cycle,  $24\pm 1$  °C, 55% relative humidity) with free access to food (Guabi, Santa Maria, Brazil) and water. All experimental protocols were designed aiming to keep the number of animals used to a minimum, as well as their suffering. All experimental protocols were conducted in accordance with national and international legislation (guidelines of Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and of U.S. Public Health Service's Policy on Human Care and Use of Laboratory Animals-PHS Policy), and with the approval of the Ethics Committee for animal research of the Federal University of Santa Maria.

### *Surgery*

The rats were bilaterally implanted under Equithesin anesthesia (1% phenobarbital, 2% magnesium sulfate, 4% chloral hydrate, 42% propylene glycol, 11% ethanol; 3 ml/kg, i.p.) with 27-gauge guide cannula, which were aimed 1mm above the CA1 region of the dorsal hippocampus. Stereotaxic coordinates were according to the atlas of Paxinos and Watson (1986): AP 4 mm, ML 3 mm, V 2mm from the dura.

### *Barnes Maze*

One week after surgery, animals were trained to solve the Barnes maze. The Barnes maze is a validated test often used for the assessment of spatial learning and memory in rodents (Barnes 1979). The Barnes maze paradigm exploits the natural inclination of small rodents to seek escape to a darkly lit, sheltered environment when placed in an open arena under bright, aversive illumination. Our maze consists of a 120 cm diameter circular wooden table, 3.5 cm-thick and elevated 90 cm above the floor.

Twenty holes, 6 cm diameter, were equidistantly located around the perimeter and centered 5 cm from it. The apparatus was located in a 4m×4m test room where four visuospatial cues made of rigid black paper (rectangle, circle, cross, triangle) were affixed to the walls but not directly over any one maze hole; this increases the spatial component of the Barnes maze during training (Bach et al. 1995). A black wooden escape tunnel (15cm×10cm×30cm) was placed beneath one hole, selected randomly for each rat but remained constant throughout the training sessions for a given rat. The remaining 19 holes led only to a false escape box (15cm×10cm×10cm) which, from the platform, appeared indistinguishable from an escape box but was too small to be entered; false boxes removed visual cues that might be observed through an open hole. Above the platform (height 45cm) there is an incandescent lamp (200W), which gave bright illumination of the maze as the aversive stimuli.

On the first day of the experiment, the rats were moved to testing room and left undisturbed for 60 min. Following this habituation period, the rats were trained to find the escape hole; they were placed in the escape box for 1 min, then into a cylindrical opaque chamber (start box) in the center of the maze. With light on, the start box was removed and the rat allowed exploring freely and finding the escape box. A maximum latency of 180 s to find it was allowed. Each rat was given three

trials per day, over four consecutive days. In each trial, we scored the time to reach the escape tunnel and the number of wrong holes visited. The arena as well boxes were wiped clean using distilled water both between each training session for a given rat and between each rat.

#### *Drugs and Microinjections*

N-[2-bromocinnamylamino) ethyl]-5-isoquinoline sulfonamide (H-89), a selective inhibitor of PKA; 7H-Benzimidazo[2,1-a]benz[de]isoquinoline-7-one-3-carboxylic acid (STO-609) a selective inhibitor of CaMKII and 3- guanidinopropionic acid (3-GPA) a inhibitor of CreaT transporter were obtained from Sigma Saint Louis, MO. STO—609 was dissolved in vehicle 15% dimethyl sulfoxide (DMSO), creatine monohidratate, H-89 and 3-GPA was dissolved in sterile phosphate-buffered saline, (PBS) pH 7.4.

The effect of the intrahippocampal administration of Cr was investigated by injecting the animals with Cr monohydrate (2.5 nmol/side) or its vehicle, immediately after the end of the first day on Barnes Maze. The involvement of the Cr transporter, PKA and CaMKII pathway in the effect exerted by Cr in this model of spatial learning was tested by injecting the animals with inhibitor of Cr transporting (3-GPA 0.5, 2 and 5 nmol/side); inhibitor of PKA (H-89; 0.25; 2.5 and 25  $\mu$ mol/side) and inhibitor of CaMKII (STO 609; 0.5 and 5nmol/side) immediately at the end of the first day of training. The doses of 3-GPA, H-89; STO-609 were based on pilot studies, creatine was selected based on previous studies (Oliveira et al. 2008). The injections were performed using a 10  $\mu$ l Hamilton syringe and a 30-gauge needle that fitted into the guide cannula, with the tip of the infusion needle protruding 1.0 mm beyond that of the guide cannula and, therefore, aimed at CA1 in the dorsal hippocampus. The infusions (0.5  $\mu$ l/side) were carried out over 60 s and the infusion cannulae were left in place for 60 additional seconds to minimize backflow.

#### *Statistical analysis*

Data were analyzed by one or two-way analysis of variance (ANOVA), depending on the experimental design. Post-hoc analyses were carried out by the *F* test for simple effect or the Student–Newman–Keuls test, when appropriate. All data were expressed as mean $\pm$ S.E.M. Statistical analyses were performed utilizing the SPSS software in a PC-compatible computer. *P* < 0.05 was considered significant.

## Results

The effect of post-training intrahippocampal administration of Cr (2.5 nmol/side) on Barnes maze is shown in Fig. 1. These data agree with previous findings from our group (Oliveira et al. 2008) since intrahippocampal injection of this compound decreased the latency for escape [ $F(3,63)=3.13$ ;  $P<0.05$ ; Fig. 1A] and the mean number of errors [ $F(3,63)=3$ ;  $P<0.05$ ; Fig. 1B]. Considering that Cr presented effect just in the second day of spatial memory test, the next experiments were only for two days. The involvement of CreaT in the effect exerted by Cr in this model of spatial learning is shown in Figure 2. Statistical analysis revealed that intrahippocampal administration of 3-GPA (all doses) had not effect *per se* on the spatial memory test (Figures 2A and B). On the other hand, the post-training co-administration of 3-GPA (5 nmol/side) decreased the facilitatory effect of Cr on latency for escape [ $F(1,34)=4.6$   $P<0.05$ ; Fig. 3A] and the mean number of errors [ $F(1,34)=5.03$ ;  $P<0.05$ ; Fig. 3B] suggesting that spatial learning enhancement elicited by Cr may be mediated by trans-cellular Cr transports.

The effect of PKA inhibitor (H-89) on Cr-induced spatial improvement was also evaluated. Statistical analysis showed that intrahippocampal injection of H-89 (0.25; 2.5 and 25  $\mu$ mol/side) did not alter the latency and number of error in Barnes maze test (Figs. 4A;B), however, the post-training co-administration H-89 (25  $\mu$ mol/side) decreased the facilitatory effect of Cr on latency for escape [ $F(1,43)=1.43$ ;  $P<0.05$ ; Fig. 5A) and the mean number errors [ $F(1,43)=4.16$   $P<0.05$ ; Fig. 5B]. In addition, we showed that intrahippocampal injection of STO-609 (all doses) had not effect in this model of spatial learning (Fig. 6A and B), however, statistical analysis revealed that post-training co-administration of STO-609 (5nmol/side) decreased the effect of Cr on latency for escape [ $F(1,36)=5.40$ ;  $P<0.05$ ; Fig. 7A] and the mean number errors [ $F(1,36)=4.11$ ;  $P<0.05$ ; Fig. 7B]. Locomotor activity was performed after second day of experiments. Statistical analyses showed no difference between groups (data not shown).

## Discussion

In this study, we showed that post-training bilateral microinjection of Cr into hippocampus caused spatial learning improvement and that co-administration of 3-GPA (inhibitor of CreaT transporter), H-89 (PKA inhibitor) and STO-609 (CaMKII inhibitor) attenuated the facilitatory effect of Cr. The spatial learning enhancement induced by Cr, at least in part, is in agreement with recent studies that demonstrated that administration

of Cr leads to an improvement in intelligence test scores (Rae et al. 2003) and reduces mental fatigue when subjects repeatedly perform a simple mathematical calculation (Watanabe et al. 2002). Furthermore, it has been demonstrated that administration of Cr in health subjected submitted to sleep deprivation, a condition that is associated with reduced brain Cr, attenuates the cognition impairment elicited by this stress situation (McMorris et al. 2007) suggesting that high-energy phosphate utilized as energy buffer as well as energy transport molecules elicited by Cr (Wallimann et al. 1992), may explain the reduced mental fatigue.

Since creatine/phosphocreatine/creatine kinase system is connected to different synaptic processes and fundamental for normal energy homeostasis (Wallimann et al. 1992; Schlattner et al. 2006), the results presented in this report suggest that this system modulates the firing speed of action potentials and/or strength of intracellular communication needed for learning and memory formation by acting as energy buffer (Jost et al. 2002). Furthermore, it is plausible to propose that maintenance of energy homeostasis in the brain requires a distinct molecular circuitry which provides tight coupling between energy consumption and production during the performance of sensory, motor and cognitive tasks (Fox et al. 1988; Belliveau et al. 1991; Beal 1992; Erecinska and Silver 1994; Ikonomidou and Turski 1996; Barinaga 1997).

Besides its action as energy buffer, it has been recently evidenced that Cr accumulates in neocortex slices in a  $\text{Na}^+$ -dependent manner, consistent with the involvement of the  $\text{Na}^+$ -dependent SLC6A8 Cr transporter. In addition, Cr is electrically released from neocortex, caudate putamen and hippocampus slices, an effect dependent of  $\text{Ca}^{2+}$  influx and of  $\text{Na}^+$  channel stimulation suggesting that this compound is not only synthesized and taken up by central neurons, but also released in exocytotic manner (Almeida et al. 2006). Experimental findings from our group have demonstrated that Cr facilitates hippocampal synaptic transmission, an effect which is attenuated by AP5, an NMDA receptor antagonist, and increases the binding of [ $^3\text{H}$ ]MK-801 to membranes, supporting a functional modulatory role for this guanidine compound (Royes et al. 2008). Accordingly, it has been demonstrated that Cr leads to spatial learning improvement by modulate of polyamine binding site at NMDA receptor (Oliveira et al. 2008).

The NMDA receptor plays a pivotal role in the generation of various forms of synaptic plasticity (Izquierdo and Medina 1997; Herin and Aizenman 2004). In this context, it has been demonstrated that selectivity knockout of the gene that encodes for

the NMDA receptor subunit in mouse CA1 lead to disrupt both place cell ensemble activity and spatial memory (Wilson and Tonegawa 1997). However, a number of important questions, concerning details of Cr metabolism, like regulation of trans-cellular Cr transports and intracellular trafficking have still to be clarified in more detail. In this context, several studies have suggested that entry of  $\text{Ca}^{2+}$  through NMDA channel during LTP induction in the CA1 region of the hippocampus stimulates the activation and persistent autophosphorylation of CaMKII and PKA (Nguyen and Woo 2003; Bevilaqua et al. 2005; Sharifzadeh et al. 2005). The CaMKII and PKA enzymes also mediate the phosphorylation of a variety of protein of importance in synaptic plasticity, including the ionotropic glutamate receptors (AMPA and NMDA) and cAMP response element-binding (CREB) (Izquierdo and Medina 1997).

Considering that CaMKII and PKA enzymes modulate NMDA receptor and that Cr leads to spatial learning improvement by modulating of polyamine binding site at NMDA receptor (Oliveira et al. 2008), we decide to investigate if the involvement of CaMKII and PKA pathway activation in spatial learning improvement induced by Cr. The results presented in this report suggest that Cr induces spatial learning improvement and that, at least some of its effects, may be mediated by CaMKII and PKA pathway activation. Furthermore, is plausible to propose that changes in the phosphorylation levels of NMDA mediated by CaMKII and PKA pathway activation (Izquierdo and Medina 1997) after intrahippocampal injection of Cr may play an important role in spatial memory formation. In line of this view, since Cr and PCr system is essential for the buffering of high-energy phosphates and intracellular ATP concentrations are clearly sufficient to support basal autophosphorylation of CaMKII in cells that maintain resting basal concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$  for extended periods of time, we suggest that Cr-modulated ATP metabolism may be a molecular marker of memory processing in the hippocampus for spatial learning. (Colban 1992). However, additional studies are necessary to clarify this point.

In summary, the current study reports for the first time the regulation of trans-cellular Cr transports and intracellular PKA and CaMK II pathway play a key role in the Cr-induced spatial learning enhancement. Although a number of important questions, concerning details of Cr metabolism, like regulation intracellular trafficking have still to be clarified in more detail, the results presented suggest that the enhancements the cellular energy status elicited by Cr enhances intelligent test scores do not necessary imply a cause–effect relationship but mechanism mediated by uptake of Cr into the

neuronal cell and intracellular communication. Besides, this report showed that none of the drugs studied altered the locomotor activity of the animals. These results suggest that the facilitatory effect of creatine-induced on memory are not attributed to possible unspecific motor effect.

### **Acknowledgements**

We confirm that we have read the Journal's position on issues involved in ethical publication and affirm that this report is consistent with those guidelines. In addition, we would like to state that all authors have seen and approved the study and that no part of the work has been published or is under consideration for publication elsewhere. Moreover, the present study was supported by government funding and has no financial or other relationship that might lead to a conflict of interest.

### **References**

- Alberini CM (2009) Transcription factors in long-term memory and synaptic plasticity. *Physiol Rev* 89: 121-145
- Almeida LS, Salomons GS, Hogenboom F, Jakobs C, Schoffemeer AN (2006) Exocytotic release of creatine in rat brain. *Synapse* 60: 118-123
- Andres RH, Ducray AD, Schlattner U, Wallimann T, Widmer HR (2008) Functions and effects of creatine in the central nervous system. *Brain Res Bull* 76: 329-343
- Bach ME, Hawkins RD, Osman M, Kandel ER, Mayford M (1995) Impairment of spatial but not contextual memory in CaMKII mutant mice with a selective loss of hippocampal LTP in the range of the theta frequency. *Cell* 81: 905-915
- Barinaga M (1997) What makes brain neurons run? *Science* 276: 196-198
- Barnes CA (1979) Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 93: 74-104
- Beal MF (1992) Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? *Ann Neurol* 31: 119-130
- Belliveau JW, Kennedy DN, Jr., McKinstry RC, Buchbinder BR, Weisskoff RM, Cohen MS, Vevea JM, Brady TJ, Rosen BR (1991) Functional mapping of the human visual cortex by magnetic resonance imaging. *Science* 254: 716-719



- Bevilaqua LR, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M (2005) Memory consolidation induces N-methyl-D-aspartic acid-receptor- and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II-dependent modifications in alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor properties. *Neuroscience* 136(2):397-403.
- Bozon B, Davis S, Laroche S (2003) A requirement for the immediate early gene zif268 in reconsolidation of recognition memory after retrieval. *Neuron* 40: 695-701
- Colban RJ (1993) Inactivation of Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent Protein Kinase I1 by Basal Autophosphorylation. *J Biol Chem* 268:7163-7170.
- Dechent P, Pouwels PJ, Wilken B, Hanefeld F, Frahm J (1999) Increase of total creatine in human brain after oral supplementation of creatine-monohydrate. *Am J Physiol* 277: R698-704
- Erecinska M, Silver IA (1994) Ions and energy in mammalian brain. *Prog Neurobiol* 43: 37-71
- Fox PT, Raichle ME, Mintun MA, Dence C (1988) Nonoxidative glucose consumption during focal physiologic neural activity. *Science* 241: 462-464
- Fukunaga K, Stoppini L, Miyamoto E, Muller D (1993) Long-term potentiation is associated with an increased activity of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* 268: 7863-7867
- Herin GA, Aizenman E (2004) Amino terminal domain regulation of NMDA receptor function. *Eur J Pharmacol* 500: 101-111
- Ikonomidou C, Turski L (1996) Neurodegenerative disorders: clues from glutamate and energy metabolism. *Crit Rev Neurobiol* 10: 239-263
- Izquierdo I, Medina JH (1997) Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem* 68: 285-316
- Jost CR, Van Der Zee CE, In 't Zandt HJ, Oerlemans F, Verheij M, Streijger F, Franssen J, Heerschap A, Cools AR, Wieringa B (2002) Creatine kinase B-driven energy transfer in the brain is important for habituation and spatial learning behaviour, mossy fibre field size and determination of seizure susceptibility. *Eur J Neurosci* 15: 1692-1706

- Loram ID, Lakie M (2002) Human balancing of an inverted pendulum: position control by small, ballistic-like, throw and catch movements. *J Physiol* 540: 1111-1124
- Malenka RC, Kauer JA, Perkel DJ, Mauk MD, Kelly PT, Nicoll RA, Waxham MN (1989) An essential role for postsynaptic calmodulin and protein kinase activity in long-term potentiation. *Nature* 340:554-557
- Matthies H (1989) Neurobiological aspects of learning and memory. *Annu Rev Psychol* 40: 381-404
- McGaugh JL (1966) Time-dependent processes in memory storage. *Science* 153: 1351-1358
- McMorris T, Harris RC, Howard AN, Langridge G, Hall B, Corbett J, Dicks M, Hodgson C (2007) Creatine supplementation, sleep deprivation, cortisol, melatonin and behavior. *Physiol Behav* 90: 21-28
- Mille ML, Johnson Hilliard M, Martinez KM, Simuni T, Rogers MW (2007) Acute effects of a lateral postural assist on voluntary step initiation in patients with Parkinson's disease. *Mov Disord* 22: 20-27
- Mizuno M, Yamada K, Maekawa N, Saito K, Seishima M, Nabeshima T (2002) CREB phosphorylation as a molecular marker of memory processing in the hippocampus for spatial learning. *Behav Brain Res* 133: 135-141
- Nguyen PV, Woo NH (2003) Regulation of hippocampal synaptic plasticity by cyclic AMP-dependent protein kinases. *Prog Neurobiol* 71: 401-437
- Oliveira MS, Furian AF, Figuera MR, Fiorenza NG, Ferreira J, Rubin MA, Mello CF, Royes LF (2008) The involvement of the polyamines binding sites at the NMDA receptor in creatine-induced spatial learning enhancement. *Behav Brain Res* 187: 200-204
- Otmakhov N, Griffith LC, Lisman JE (1997) Postsynaptic inhibitors of calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II block induction but not maintenance of pairing-induced long-term potentiation. *J Neurosci* 17: 5357-5365
- Paxinos G, Watson C (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press.
- Persky AM, Brazeau GA (2001) Clinical pharmacology of the dietary supplement creatine monohydrate. *Pharmacol Rev* 53: 161-176

- Rae C, Digney AL, McEwan SR, Bates TC (2003) Oral creatine monohydrate supplementation improves brain performance: a double-blind, placebo-controlled, cross-over trial. *Proc Biol Sci* 270: 2147-2150
- Schlattner U, Tokarska-Schlattner M, Wallimann T (2006) Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1762: 164-180
- Sharifzadeh M, Sharifzadeh K, Naghdi N, Ghahremani MH, Roghani A (2005) Posttraining intrahippocampal infusion of a protein kinase A inhibitor impairs spatial memory retention in rats. *J Neurosci Res* 79: 392-400
- Valenzuela MJ, Jones M, Wen W, Rae C, Graham S, Shnier R, Sachdev P (2003) Memory training alters hippocampal neurochemistry in healthy elderly. *Neuroreport* 14: 1333-1337
- Vianna MR, Alonso M, Viola H, Quevedo J, de Paris F, Furman M, de Stein ML, Medina JH, Izquierdo I (2000) Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. *Learn Mem* 7: 333-340
- Vianna MR, Izquierdo LA, Barros DM, Medina JH, Izquierdo I (1999) Intrahippocampal infusion of an inhibitor of protein kinase A separates short- from long-term memory. *Behav Pharmacol* 10: 223-227
- Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HM (1992) Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem J* 281 ( Pt 1): 21-40
- Watanabe A, Kato N, Kato T (2002) Effects of creatine on mental fatigue and cerebral hemoglobin oxygenation. *Neurosci Res* 42: 279-285
- Wilson MA, Tonegawa S (1997) Synaptic plasticity, place cells and spatial memory: study with second generation knockouts. *Trends Neurosci* 20: 102-106
- Wyss M, Kaddurah-Daouk R (2000) Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev* 80: 1107-1213

## Figures and Legends

Figure 1

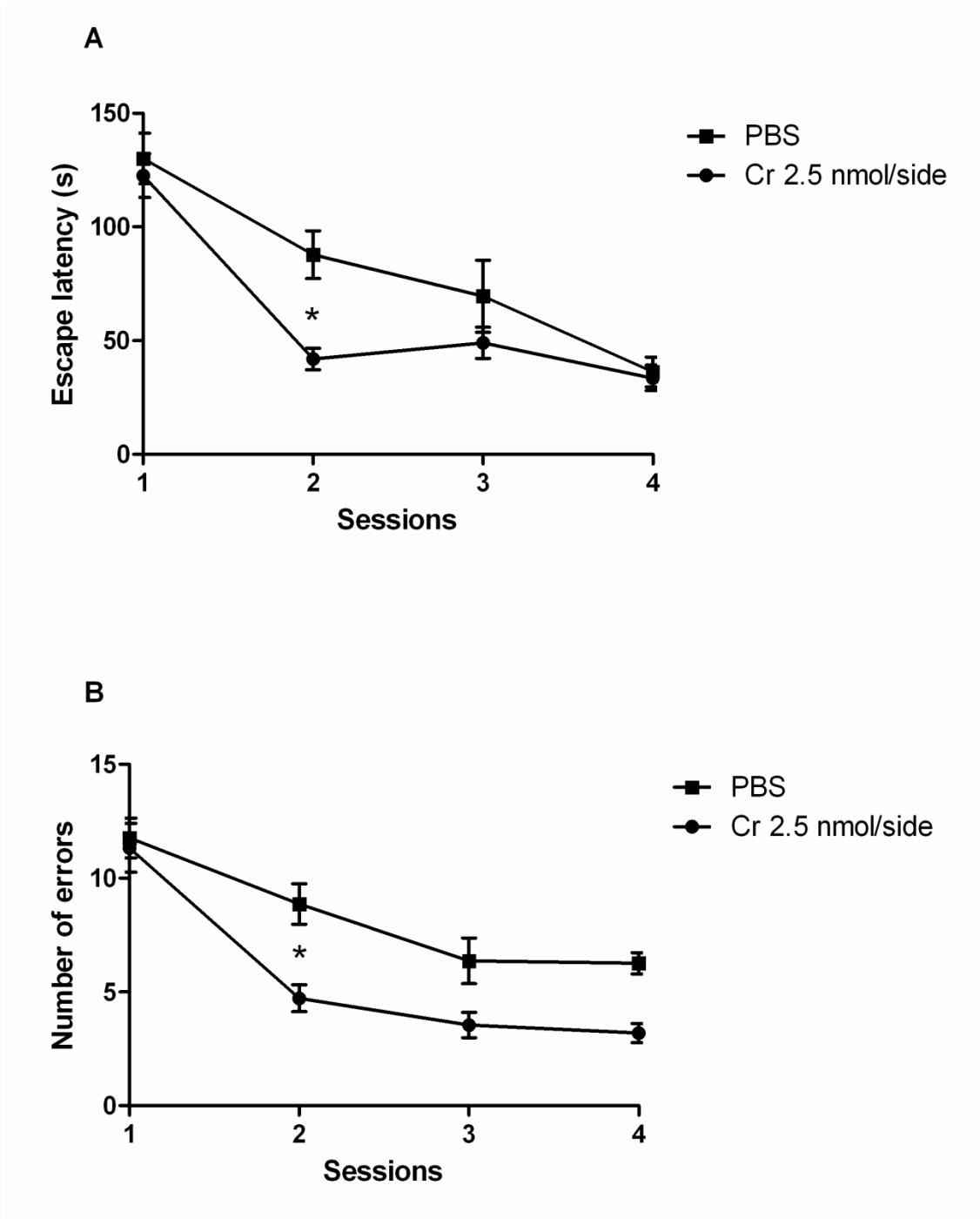


Figure 1. Effect of the intrahippocampal administration of creatine (2.5 nmol/side) immediately after the end of first session on the escape latency (A) and number of errors (B) in the Barnes maze. PBS represent vehicle treatment. \* $P < 0.05$  compared

with PBS treated group by the Student–Newman–Keuls test. Data are the means $\pm$ S.E.M. n = 11–12 animals in each group.

**Figure 2**

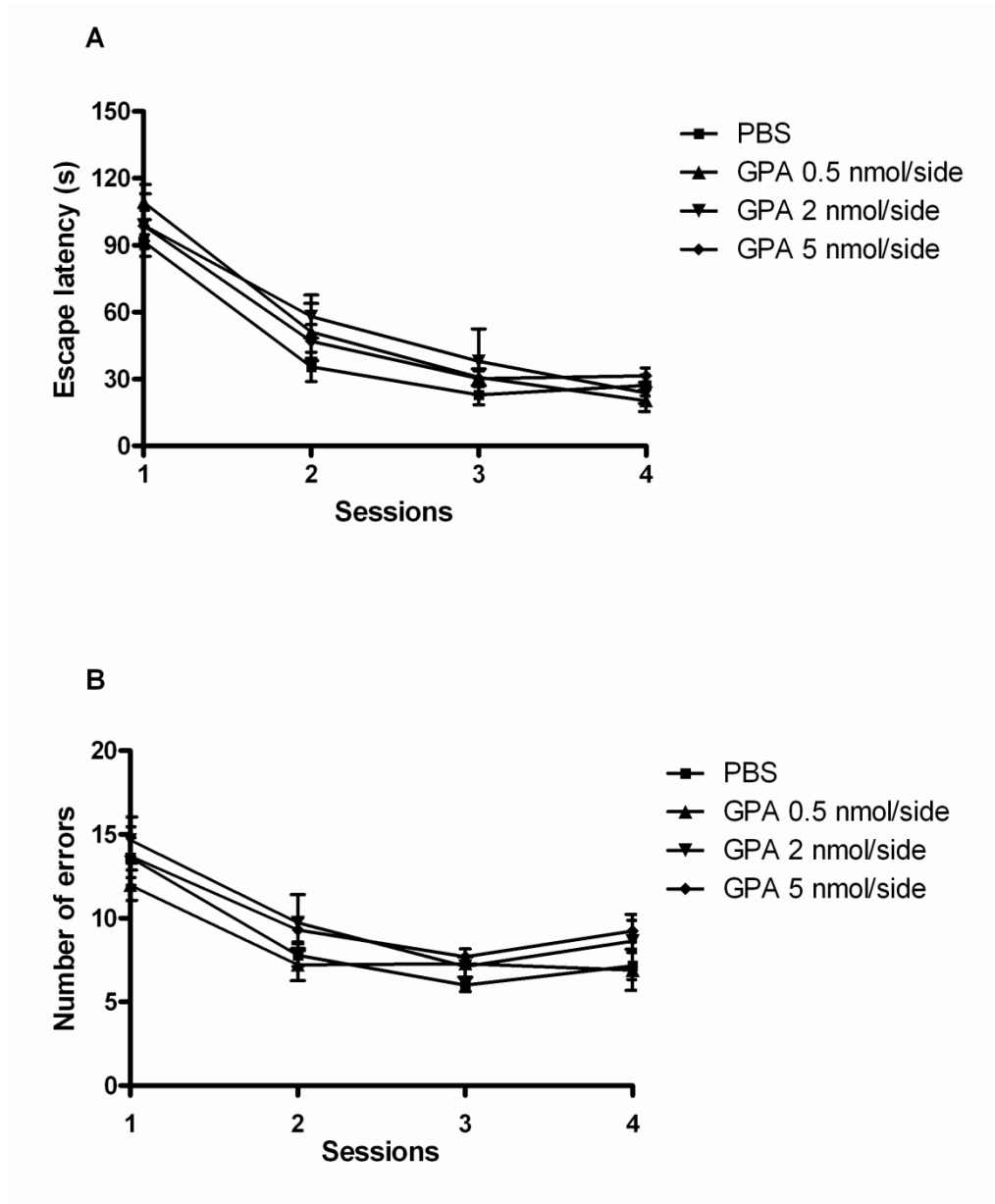


Figure 2. Effect of the intrahippocampal administration of 3-GPA (0.5 - 5nmol/side) immediately after the end of first session on the escape latency (A) and number of errors (B) in the Barnes maze. PBS represent vehicle treatment. Statistical analyses

did not show difference between groups. Data are the means $\pm$ S.E.M. n = 7–9 animals in each group.

Figure 3

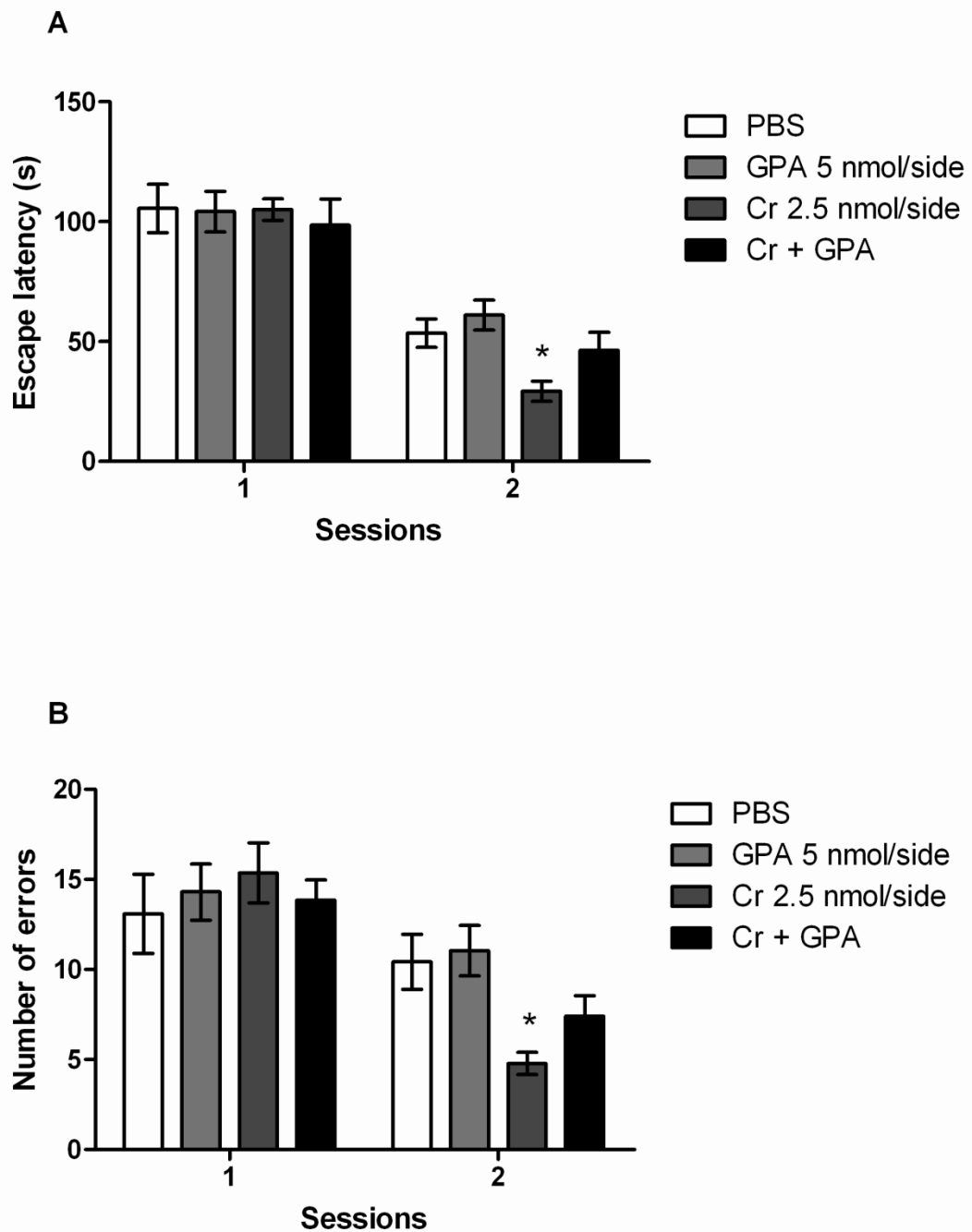


Fig. 3. Effect of the intrahippocampal co-administration of creatine (2.5 nmol/side) and 3-GPA (5 nmol/side) immediately after the end of first session on the escape latency (A) and number of errors (B) in the Barnes maze. PBS represent vehicle treatment. \* $P < 0.05$  compared with vehicle treated group by the Student–Newman–Keuls test. Data are the means  $\pm$  S.E.M.  $n = 8$ –10 animals in each group.

Figure 4

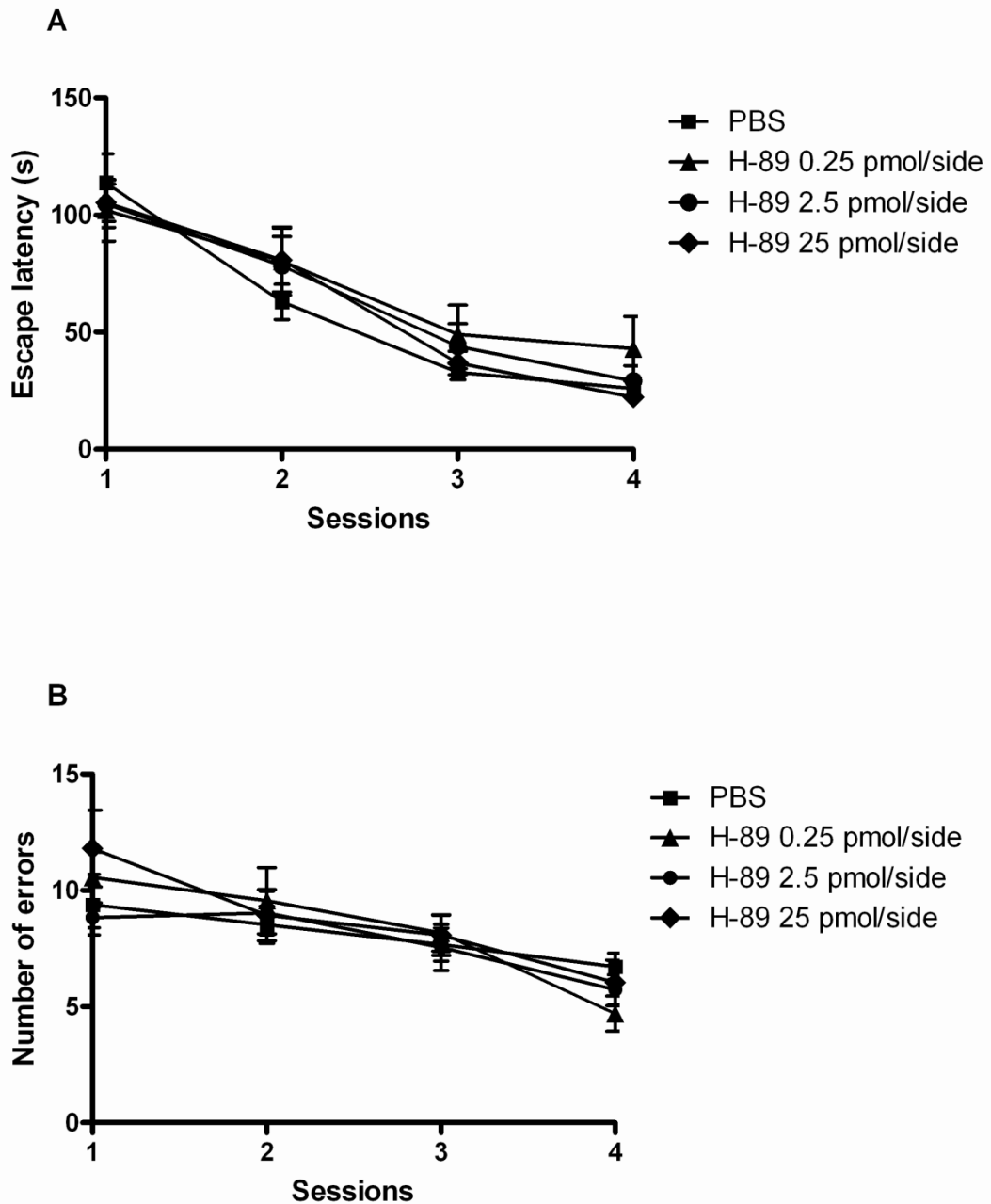


Figure 4. Effect of the intrahippocampal administration of H-89 (0.25 - 25nmol/side) immediately after the end of first session on the escape latency (A) and number of errors (B) in the Barnes maze. PBS represent vehicle treatment. Statistical analyses did not show difference between groups. Data are the means $\pm$ S.E.M. n = 11–14 animals in each group.



Figure 5

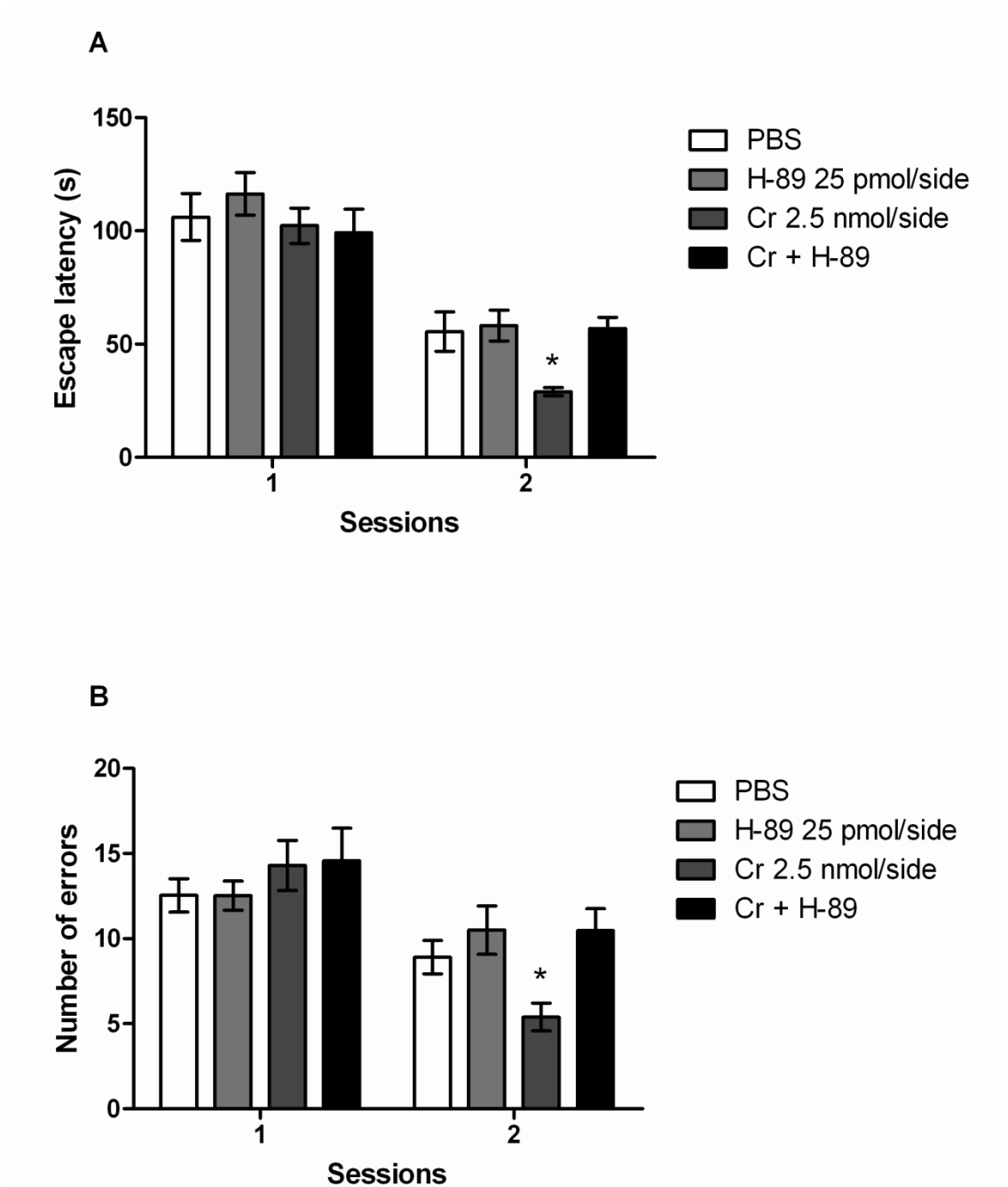


Figure 5. Effect of the intrahippocampal co-administration of creatine (2.5 nmol/side) and H-89 (25 nmol/side) immediately after the end of first session on the escape latency (A) and number of errors (B) in the Barnes maze. PBS represent vehicle treatment. \* $P < 0.05$  compared with vehicle treated group by the Student–Newman–Keuls test. Data are the means $\pm$ S.E.M.  $n = 10$ – $13$  animals in each group.

Figure 6

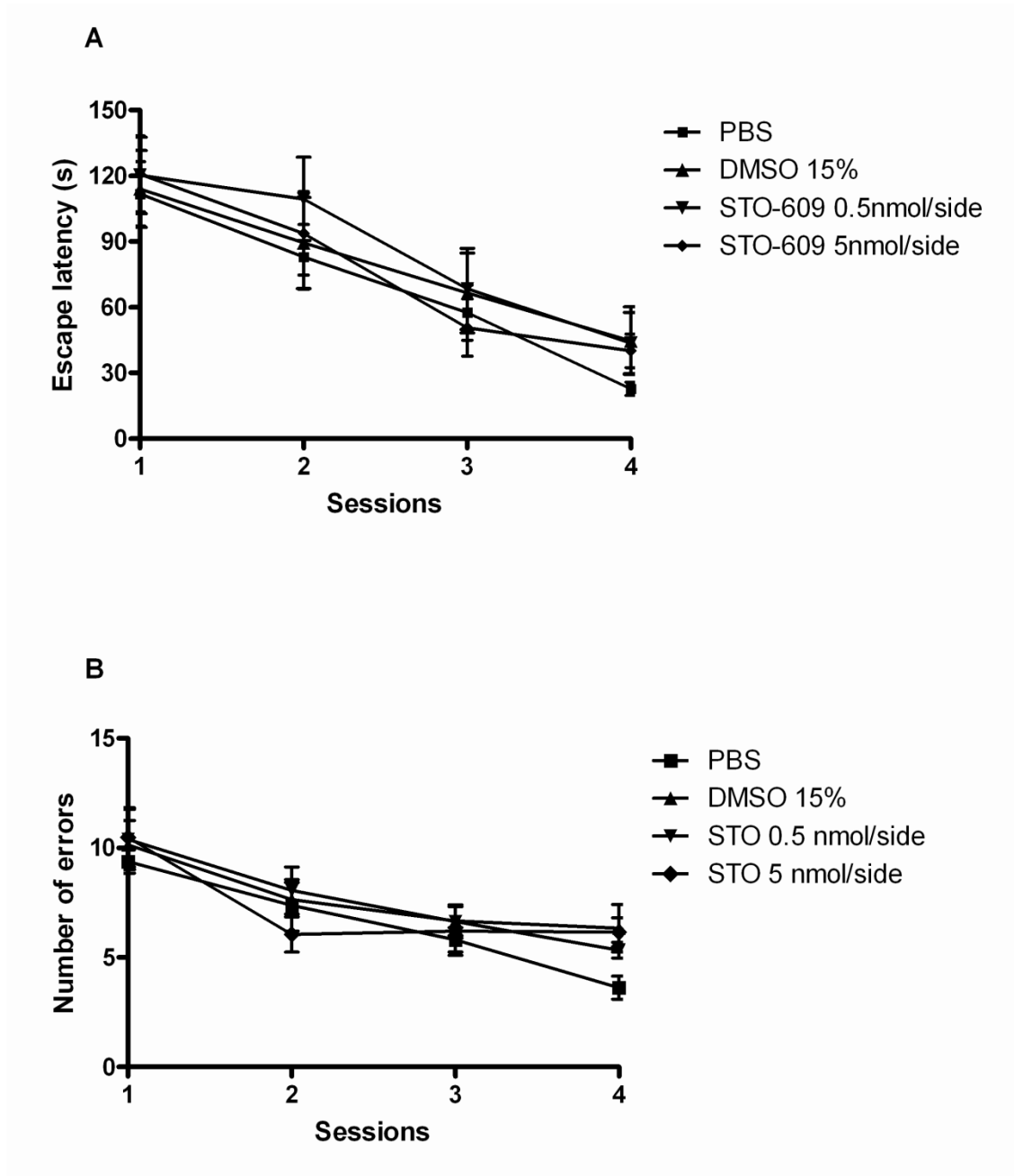


Figure 6. (A) Effect of the intrahippocampal administration of STO-609 (0.5 - 5nmol/side) immediately after the end of first session on the escape latency (A) and number of errors (B) in the Barnes maze. PBS and DMSO represent vehicle treatment. Statistical analyses did not show difference between groups. Data are the means $\pm$ S.E.M. n = 12–13 animals in each group.

Figure 7

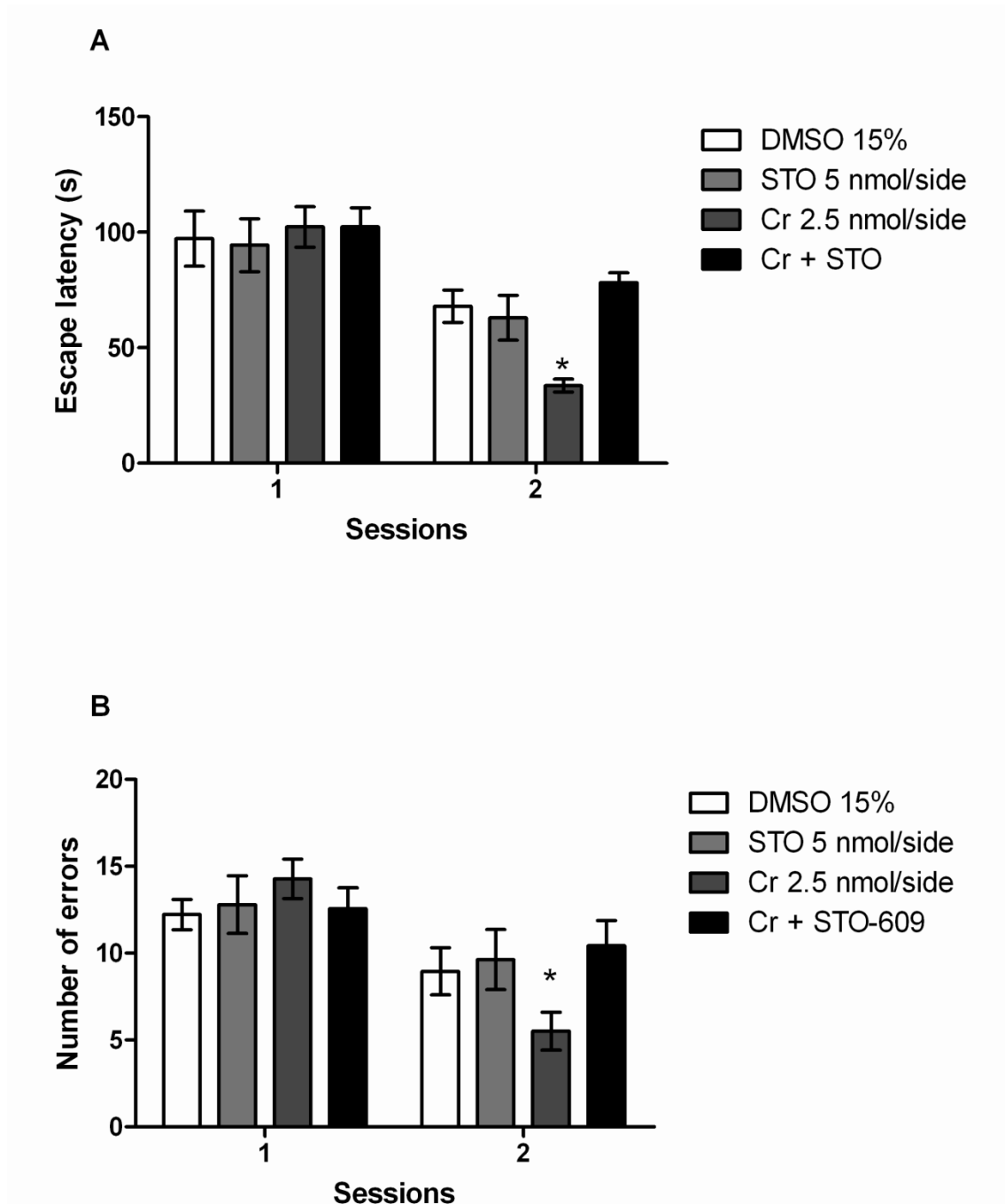


Figure 7. Effect of the intrahippocampal co-administration of creatine (2.5 nmol/side) and STO-609 (5 nmol/side) immediately after the end of first session on the escape latency (A) and number of errors (B) in the Barnes maze. DMSO represent vehicle treatment. \* $P < 0.05$  compared with vehicle treated group by the Student–Newman–Keuls test. Data are the means $\pm$ S.E.M.  $n = 9$ – $11$  animals in each group.

**4.2 Capítulo II – O envolvimento da ativação de CREB na facilitação do aprendizado espacial induzido por creatina.**

Artigo

**THE INVOLVEMENT OF THE CREB ACTIVATION ON CREATINE-  
INDUCED SPATIAL LEARNING ENHANCEMENT**

Mauren Assis de Souza, Danieli Valnes Magni, Gustavo Petri Guerra, Mauro Schneider Oliveira, Ana Flávia Furian, Letícia Pereira, Silvia Vacari Marquez, Juliano Ferreira, Luiz Fernando Freire Royes, Michele Rechia Fighera.

## The involvement of the CREB activation on creatine-induced spatial learning enhancement in rats.

Mauren Assis Souza<sup>a,b</sup>; Danieli Valnes Magni<sup>d</sup>; Gustavo Petri Guerra<sup>d</sup>; Mauro Schneider Oliveira<sup>a</sup>; Ana Flávia Furian<sup>f</sup>; Letícia Pereira<sup>a</sup>; Sílvia Vacari Marquez<sup>a</sup>; Juliano Ferreira<sup>b,d</sup>; Luiz Fernando Freire Royes<sup>a,c</sup>  
Michele Rechia Fighera<sup>a,e\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Ciências da Saúde  
Laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia  
Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Santa Maria,  
97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>b</sup> Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia  
Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Santa Maria,  
97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>c</sup> Centro de Educação Física e Desportos.  
Departamento de Métodos e Técnicas Desportivas, Universidade Federal de Santa Maria,  
97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>d</sup> Centro de Ciências Naturais e Exatas Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:  
Bioquímica Toxicológica  
Departamento de Química,  
Universidade Federal de Santa Maria  
97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>e</sup> Serviço de Neurologia  
Hospital São Lucas  
Porto Alegre, PUC-RS.

<sup>f</sup> Unipampa-campus Itaqui  
Rua Luiz Joaquim de Sá Britto,  
97650-000, Itaqui – RS.

Study supported by CNPq, CAPES and FINEP (Brasil).

\*Corresponding author: Dr<sup>a</sup>. Michele Rechia Fighera

Serviço de Neurologia  
Hospital São Lucas  
Porto Alegre, PUC-RS.  
e-mail: mrfighera@yahoo.com.br  
FAX: +55 51 3320 3302

**Summary:**

Although a considerable body of evidence has demonstrated that cellular energy status increase elicited by creatine (Cr) enhances intelligent test scores, its implications for learning and memory are not clear. In this context, we decide to investigate the involvement intracellular trafficking in spatial learning improvement elicited by Cr in rats. For this propose, we investigated the levels of phosphorylated CREB (pCREB) and activation of cAMP-dependent protein kinase A (PKA) and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) signaling pathway in the spatial learning after intrahippocampal injection of Cr. Statistical analysis revealed that, when administrated post-training, Cr (2.5 nmol/hippocampus) decreased the latency for escape and mean number of errors in Barnes-Maze test. Intrahippocampal injection of Cr also increased the levels of pCREB in hippocampus after 30 minutes but not 3 hours, suggesting that pCREB was expressed in the hippocampus during the process of spatial memory formation. In addition, we demonstrated that post-training administration of Cr was able to increase pCaMKII but not PKA levels suggesting that intracellular CaMKII/CREB pathway play a key role in the Cr-induced spatial learning. Therefore, these data suggest that this guanidino compound may also play a putative role as a neuromodulator in the brain, and that at least some of its effects may be mediated by intracellular CaMKII/CREB pathway.

**Key words:** Creatine, spatial memory, CREB, PKA, CaMKII.

## INTRODUCTION

Creatine (*N*-[aminoiminomethyl]-*N*-methyl glycine) is a guanidino compound endogenously synthesized from glycine, arginine and *S*-adenosylmethionine in the kidneys, liver and pancreas or ingested in small quantities (the amount can vary from 0 to 7 g of more, depending on the diet), especially with fresh fish (up to 10 g/kg) and meat (approximately 5 g/kg) (Wyss and Kaddurah-Daouk, 2000). This high-energy phosphate is utilized as an energy buffer, as well as an energy transport molecule (Wallimann et al., 1992), preventing ATP depletion caused by several conditions and agents, such as 3-hydroxyglutaric (Das et al., 2003) and methylmalonic acid (Royer et al., 2003; 2006) exposure, brain trauma, Parkinson and Huntington diseases, anoxia, hypoxia and ischemia (Ferrante et al., 2000, Sullivan et al., 2000, Balestrino et al., 2002; Bender et al., 2005, Baker-Fulco et al., 2006; Sakellaris et al., 2006, Hass et al., 2007). Furthermore, it has been demonstrated that long-term creatine supplementation leads to an increase in health life span in mice accompanied by favorable effects on neurobehavioral functioning, especially memory skills (Bender et al., 2007). In agreement with this view, recent studies from our group have evidenced that the intrahippocampal administration of creatine leads to spatial memory improvement (Oliveira et al., 2008) and increases of extracellular field potential in the *stratum pyramidale* of the CA1 region of the hippocampus (Royer et al., 2007)

Although it is believed that mechanisms underlying creatine-induced neuronal function improvement and neuroprotection involve enhanced energy storage (Brewer and Wallimann, 2000), a direct neuromodulatory role for creatine has also been proposed (Persky and Brazeau, 2001). In this context, it has been shown that creatine is not only synthesized and taken up by neurons, but also released in an action potential-dependent manner, suggesting a neuromodulatory role for this guanidino compound in the brain (Almeida et al., 2006). Nonetheless, the full mechanism by which Cr benefits cognition, as well as the neuronal conditions in which this guanidine compound could be effective in spatial learning, remains to be elucidated.

The memory can be divided into at least two forms according to its temporal and biochemical properties: short term memory (STM), which last o longer than few hours, and long-term memory (LTM), which last from several hours to days or even longer (McGaugh 1966; Matthies 1989; Bozon et al. 2003). Recent work in both

vertebrates and invertebrates has clearly demonstrated that transcription, mediated by the CREB (cAMP responsive element binding protein) family of proteins, is a crucial step for the establishment of LTM (Bourtchuladze et al., 1994; Bernabeu et al., 1997; Gusowski and McGaugh, 1997).

In this context, several studies have demonstrated that consolidation of many types of LTM in rodents requires phosphorylation/activation of the transcription factor CREB (cAMP response element-binding protein) on Ser<sup>133</sup> by cAMP or Ca<sup>2+</sup> dependent protein kinase (Silva and Giese, 1994; Bernabeu et al., 1997; Silva et al., 1998; Zhang et al., 2003; Trifilieff et al., 2006; Brightwell et al., 2007; Porte et al., 2008). Consistent with the view that the activation of the PKA/CREB signaling pathway in the hippocampus plays an important role in spatial memory formation, oligonucleotide antisense and transgenic mice studies shown that a selective suppression of CREB function in hippocampal neurons disrupts consolidation of spatial LTM in a Morris water maze task (Guzowski and McGaug, 1997; Zhang et al., 2003; Florian et al., 2006). In addition, it was reported that mice knockouts for  $\alpha$ CaMKII could exhibit impaired spatial learning, but non-spatial learning remained unaffected (Silva et al., 1992). Some studies also have showed that the increase in the autophosphorylated (active) form of  $\alpha$ CaMKII is a key molecular event for learning and memory (Tan & Liang, 1996; Rodrigues et al., 2004).

Considering that the activation of the PKA, CaMKII and CREB signaling in the hippocampus is an important pathway for spatial memory formation (Mizuno et al., 2002; Wang et al., 2007) and the effective participation of creatine in cognitive function is insufficiently known, we decided to investigate the involvement of the PKA, CaMKII and CREB activation on the effect exerted by creatine in the model of spatial learning in Barnes-Maze test.

## **MATERIALS AND METHODS**

### *Animals*

In the present study were used adult male Wistar rats (270–300 g), housed five to a cage on controlled light and environment (12-h light/dark cycle, 24±1 °C, 55% relative humidity) with free access to food (Guabi, Santa Maria, Brazil) and



water. All experimental protocols were designed aiming to keep the number of animals used to a minimum, as well as their suffering. All experimental protocols were conducted in accordance with national and international legislation (guidelines of Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and of U.S. Public Health Service's Policy on Human Care and Use of Laboratory Animals-PHS Policy), and with the approval of the Ethics Committee for animal research of the Federal University of Santa Maria.

### *Surgery*

Rats were bilaterally implanted under Equithesin anesthesia (1% phenobarbital, 2% magnesium sulfate, 4% chloral hydrate, 42% propylene glycol, 11% ethanol; 3 ml/kg, i.p.) with 27-gauge guide cannula, which were aimed 1mm above the CA1 region of the dorsal hippocampus. Stereotaxic coordinates were according to the atlas of Paxinos and Watson, 1986: AP 4 mm, ML 3 mm, V 2mm from the dura.

### *Barnes Maze*

One week after surgery, animals were trained to solve the Barnes maze. The Barnes maze is a validated test often used for the assessment of spatial learning and memory in rodents (Barnes, 1979). The Barnes maze paradigm exploits the natural inclination of small rodents to seek escape to a darkly lit, sheltered environment when placed in an open arena under bright, aversive illumination. Our maze consists of a 120cm diameter circular wooden table, 3.5 cm-thick and elevated 90 cm above the floor.

Twenty holes, 6cm diameter, were equidistantly located around the perimeter and centered 5cm from it. The apparatus was located in a 4m×4m test room where four visuospatial cues made of rigid black paper (rectangle, circle, cross, triangle) were affixed to the walls but not directly over any one maze hole; this increases the spatial component of the Barnes maze during training (Bach et al, 1995). A black wooden escape tunnel (15cm×10cm×30cm) was placed beneath one hole, selected randomly for each rat but remained constant throughout the training sessions for a given rat. The remaining 19 holes led only to a false escape box (15cm×10cm×10cm) which, from the platform, appeared indistinguishable from an escape box but was too small to be entered; false boxes removed visual cues that might be observed through an open hole. Above the platform (height 45cm) there is an incandescent lamp (200W), which gave bright illumination of the maze as the aversive stimuli.

On the first day of the experiment, the rats were moved to testing room and left undisturbed for 60 min. Following this habituation period, the rats were trained to find the escape hole; they were placed in the escape box for 1 min, then into a cylindrical opaque chamber (start box) in the center of the maze. With light on, the start box was removed and the rat allowed exploring freely and finding the escape box. A maximum latency of 180 s to find it was allowed. Each rat was given three trials per day, over four consecutive days. In each trial, we scored the time to reach the escape tunnel and the number of wrong holes visited. The arena as well boxes were wiped clean using distilled water both between each training session for a given rat and between each rat.

#### *Drugs and Microinjections*

Creatine monohidatate was obtained from Sigma Saint Louis, MO and dissolved in sterile phosphate-buffered saline, (PBS) pH 7.4.

The animals were not previously adapted to the microinjection procedure. The injections were performed using a 10  $\mu$ l Hamilton syringe and a 30-gauge needle that fitted into the guide cannula, with the tip of the infusion needle protruding 1.0 mm beyond that of the guide cannula and, therefore, aimed at CA1 in the dorsal hippocampus. The infusions (0.5  $\mu$ l/side) were carried out over 60 s and the infusion cannulae were left in place for 60 additional seconds to minimize backflow. Cannulae placement was verified postmortem, as described elsewhere (Rubin et al. 1997). Only data from the animals with correct cannula placement were analyzed.

#### *Preparation of Tissues for Western Blot Studies*

The animals received, immediately after training in the Barnes maze, a single bilateral injection of PBS or creatine. The experimental protocol used was the same described in experiments above, except that, the animals were killed 30 minutes or 180 minutes after the injections (Izquierdo et al. 2006). Rats were decapitated, the hippocampus rapidly removed, dissected and homogenized in an ice-cold buffer A (10 mM HEPES, pH 7.9; 10 mM KCl; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM EDTA; 1 mM NaF; 10  $\mu$ g/ml aprotinin; 1 mM DTT; 10 mM  $\beta$ -glycerolphosphate; 1 mM phenylmethanesulphonyl fluoride and 2 mM of sodium orthovanadate). After 15 min. of incubation on ice, the homogenate was centrifuged at 13 000 rpm for 45 min at 4°C. The supernatant was saved and used as cytosolic fraction and the pellet was re-suspended in the ice-cold

buffer A plus 1% triton X-100 and homogenized. After 15 min. of incubation on ice, samples were centrifuged at 13 000 rpm for 45 min. at 4°C and the resulting pellet was re-suspended again in the ice-cold buffer B (20 mM HEPES, pH 7.9; 50 mM KCl; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 420 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM NaF; 25% glycerol; 10 µg/ml aprotinin; 1 mM DTT; 10 mM β-glycerolphosphate; 1 mM phenylmethanesulphonyl fluoride and 2 mM of sodium orthovanadate). After 15 min. of incubation on ice, the homogenate was centrifuged at 13 000 rpm for 45 min at 4°C. The supernatant was saved and used as nuclear fraction. The protein concentration was determined according method of Bradford with bovine serum albumin as the standard.

#### *Western Blot Analysis*

To analyses CREB, PKA and CaMKII activation, western blot analysis was carried out as previously described (Ferreira et al., 2005) with minor modifications. Equivalent amounts of proteins (50 and 20 µg for cytosolic- and nuclear fractions, respectively) were mixed in buffer (200 mM Tris, 10% glycerol, 2% SDS, 2.75 mM β-mercaptoethanol and 0.04% bromophenol blue) and boiled for 5 min. Proteins were resolved in 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel by electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred on to polyvinilidene difluoride membranes, according to the manufacturer's instructions (Millipore). The membranes were saturated by incubation overnight with 7.5% non-fat dry milk solution and then incubated with specific antibodies: for cytosolic fraction , anti-phosphorylated forms of protein kinase A regulatory subunit II (PKA RII) (phospho-PKA RII) antibodies and anti-phosphorylated α-CAMKII antibodies, for nuclear fraction, a monoclonal antibody against pCREB (Santa Cruz Biotechnology, USA). Following washing, the membranes were incubated with alkaline phosphatase secondary antibodies. The immunocomplexes were visualised using the chemiluminescence detection system (Amersham Biosciences, UK). Membranes were then incubated for 10 min in stripping buffer at room temperature and reincubated with anti-actin, which served as a loading control.

#### *Statistical analysis*

Statistical analysis was carried out by one- or two-way analysis of variance (ANOVA) and only *F*- values of *P*<0.05 are presented. Post-hoc analysis was carried out, when appropriate, by the Student-Newman-Keuls test. All data were expressed

as mean±S.E.M. Statistical analyses were performed utilizing the SPSS software in a PC-compatible computer.

## RESULTS

The effect of post-training intrahippocampal administration of creatine (2.5 nmol/side) on Barnes-Maze test is shown in Fig. 1. Statistical analysis revealed that intrahippocampal injection of Cr decreased the latency for escape [ $F(3,75)=4.16$ ;  $P<0.01$ ] and number of errors [ $F(3,75)=3.10$ ;  $P<0.05$ ] indicating that Cr induces spatial learning enhancement.

Since CREB has been shown to possess an essential role in memory formation (Mizuno et al. 2002), we decide to analyze the levels of pCREB in hippocampus at 30 minutes and 180 minutes after Cr administration in first day of experiments (Izquierdo et al., 2006). In this context, statistical analyses showed significant difference on pCREB/CREB at 30minutes [ $F(1,10)=6.89$ ;  $P<0.05$ ; Fig. 2C], but not at 180 minutes [ $F(1,7)=0.50$ ;  $P>0.05$ ; Fig. 2C], suggesting the participation of p-CREB was expressed in the hippocampus during the process of spatial memory formation after intrahippocampal injection of Cr.

In the present study, we also analyzed whether pCREB increase after Barnes maze is associated with an activation of PKA. Statistical analysis revealed no significant difference between PBS and Cr on pPKA [ $F(1,6)=0.105$ ;  $P>0.05$ ; Fig. 3A], on total PKA [ $F(1,6)=0.738$ ;  $P>0.05$ ; Fig. 3B] and pPKA/PKA [ $F(1,6)=0.12$ ;  $P>0.05$ ; Fig.3C] thirty minutes after Cr administration. On the other hand, statistical analysis revealed that intrahippocampal injection of Cr induces a significant difference on pCaMKII/CaMKII [ $F(1,12)= 5.15$ ;  $P<0.05$ ; Fig.4C]. These results suggest that CaMKII /CREB signaling in the hippocampus is an important pathway for spatial memory formation spatial memory formation after intrahippocampal injection of Cr.

## Discussion

In this study, we showed that bilateral microinjection of Cr into hippocampus caused spatial learning improvement and CREB activation thirty minutes after Cr administration. In addition, we demonstrated that post-training administration of Cr induced CaMKII enhancement levels in hippocampus of rats.

The spatial learning enhancement induced by creatine, at least in part, is in agreement with recent studies that demonstrated that Cr supplementation can also have beneficial effect on cognitive performance (Watanabe et al., 2002, Rae et al., 2003) This is probably because creatine/phosphocreatine/creatine kinase system is connected to different synaptic processes and fundamental for normal energy homeostasis (Schlattner et al., 2006 Wallimann,1992). In addition, it has been proposed that this system modulates the firing speed of action potentials and/or strength of intracellular communication needed for learning and memory formation by acting as energy buffer (Jost et al., 2002).

Besides its action as energy buffer, it has been recently suggested that Cr could be a neuromodulator (Almeida et al., 2006). Accordingly, Cr was accumulated in neocortex slices in a  $\text{Na}^+$ -dependent manner, consistent with the involvement of the  $\text{Na}^+$ -dependent SLC6A8 creatine transporter. Moreover, Cr was electrically released from neocortex, caudate putamen and hippocampus slices, an effect dependent of  $\text{Ca}^{2+}$  influx and of  $\text{Na}^+$  channel stimulation. These *in vitro* data indicate that Cr is not only synthesized and taken up by central neurons, but also released in exocytotic manner (Almeida et al., 2006). Cr also facilitates hippocampal synaptic transmission, an effect which is attenuated by AP5, NMDA receptor antagonist, and increases the binding of [ $^3\text{H}$ ]MK-801 to membranes, supporting a functional modulatory role for this guanidine compound (Royes et al. 2008). These two lines give evidence for the involvement of polyamine site at the NMDA receptor to Cr-induced spatial learning enhancement (Oliveira et al., 2008). Thus, the spatial learning enhancement induced by Cr has interesting implications, since it could be a physiologically relevant phenomenon.

In this context, pharmacological and genetics studies have demonstrated that glutamate neurotransmitter and NMDA receptor are responsible by formation of spatial memories (Ahlander et al., 1999; Morris *et al.*, 1986; Shapiro e Eichenbaum, 1999). In line of this view, a considerable body of evidence has suggested that the process of consolidation of LTM requires gene transcription, which is mediated by activation of CREB through of proteins like PKA and CaMKII, by phosphorylating Serine 133 (Silva and Giese, 1994; Silva et al. 1998). In fact, studies in rodents have demonstrated that activation of CREB in the dorsal hippocampus is involved in memory processing of spatial learning (Bourtchuladze et al., 1994; Guzowski and McGaugh, 1997; Mizuno et al., 2002; Colombo et al., 2003; Florian et al., 2006). Furthermore, CREB-knockout mice are selectively impaired in a hippocampus-dependent spatial memory in the Morris water

maze (Bourtchouladze et al., 1994). Recently, Mouravlev et al. (2006) reported that elevation of hippocampal CREB levels achieved by somatic gene transfer can prevent memory loss in aging rats subjected to different Barnes behavioral tasks.

To try elucidating if mechanisms by which Cr improve spatial learning involve downstream cascade of NMDA receptor we decide investigate the increase of pCREB levels at thirty minutes and three hours after intrahippocampal Cr administration. We choose these time points because there several studies suggesting that CREB activation reaches at two maximal pics, first at 0–60min and at 3–5 hours (Bourtchouladze et al., 1994; Bernabeu et al., 1997; Colombo et al., 2003; Izquierdo et al., 2006). The experimental findings revealed an increase of pCREB levels at thirty minutes, but not at 3 hours, after Cr administration. These results can explain why creatine had effect just at second day of test on Barnes Maze and not at all days testing. In agreement of this view, some studies have been suggest that hippocampal-learning specificity of CREB may be reflected best by duration, than amplitude of CREB phosphorylation (Porte et al., 2008; 2009). Furthermore, we showed that intrahippocampal Cr administration did not increase pPKA levels but induced hippocampal pCaMKII increases suggesting that the increase of pCREB levels induced by Cr do not require PKA activation, but CaMKII activation.

Although it is believed that the mechanisms underlying neural function enhancement by Cr include improved energy storage and supply, this compound seems also play a direct modulatory role in the central transmission processes. In addition, it has long been known that NMDA receptor plays a pivotal role in the generation of various forms of synaptic plasticity. However, many questions remain unanswered regarding NMDA composition and molecular mechanisms of gating and modulation. In this context, downstream cascade of NMDA involve  $\text{Ca}^{2+}$  influx and complex calcium/calmodulin ( $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ ) activation (Izquierdo and Medina, 1995; Abel and Lattal, 2001) can active CaMKII, both protein can phosphorilate CREB mediated transcription in neurons (Impey et al., 1996; West et al., 2001; Mons et al., 2003). Given this premise, we hypothesized that Cr could act at this site and thus modulate spatial learning in hippocampus of rats. In agree with this view, recent study from our group demonstrated the participation of NMDA receptor on Cr-induced spatial learning improvement.

In conclusion our data showing that creatine facilitates spatial learning are in agreement with recent studies (Watanabe et al., 2002, Rae et al., 2003, Oliveira et al.,

2008). In addition, CaMKII activation and CREB activation support the neuromodulator role of creatine suggested previously (Almeida et al., 2006; Royes et al., 2008; Oliveira et al., 2008). Therefore, if the effects detected in this study also occur in patients with memory deficit is tempting to propose that the administration of Cr should be considered as an adjuvant therapy for these patients. However, further in-depth studies are necessary to establish a definitive mechanism for Cr action on the spatial learning facilitation.

### Acknowledgements

Work supported by FINEP (grant: 01.06.0842-00) and CNPq (grant: 500120/2003-0). We confirm that we have read the Journal's position on issues involved in ethical publication and affirm that this report is consistent with those guidelines. In addition, we would like to state that all authors have seen and approved the study and that no part of the work has been published or is under consideration for publication elsewhere. Moreover, the present study was supported by government funding and has no financial or other relationship that might lead to a conflict of interest. We also would like to declare that all experiments were carried out according to the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80-23) revised 1996, and that the University Ethics Committee approved the respective protocols.

### References

- ABEL, T.; LATTAL, M. Molecular mechanisms of memory acquisition consolidation and retrieval. **Current Opinion in Neurobiology**. v. 11, n. 2, p. 180–187, 2001.
- AHLANDER, M.; MISANE, I.; SCHÖTT, P.A.; OGREN, S.O. A behavioral analysis of the spatial learning deficit induced by the NMDA receptor antagonist MK-801 (dizocilpine) in the rat. **Neuropsychopharmacology**. Sep; v. 21, p. 414-26, 1999.
- ALMEIDA LS, SALOMONS GS, HOGENBOOM F, JAKOBS C, SCHOFFELMEER AN. Exocytotic release of creatine in rat brain. **Synapse** 60:118–23, 2006.
- BACH ME, HAWKINS RD, OSMAN M, KANDEL ER, MAYFORD M. Impairment of spatial but not contextual memory in CaMKII mutant mice with a selective loss of hippocampal LTP in the range of the theta frequency. **Cell**. 81(6):905-15, 1995.
- BAKER-FULCO, C.J.; FULCO, C.S.; KELLOGG, M.D.; GLICKMAN E.; YOUNG, A.J. Voluntary muscle function after creatine supplementation in acute hypobaric hypoxia, **Med. Sci. Sports Exerc**. v.38, pp. 1418–1424, 2006.

BALESTRINO, M. LENSMAN, M. PARODI, L. PERASSO, R. REBAUDO, R. MELANI, S. POLENOV AND A. CUPELLO. Role of creatine and phosphocreatine in neuronal protection from anoxic and ischemic damage, **Amino Acids** v.22, pp. 221–229, 2002.

BARNES C.A. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 93: 74-104, 1979.

BENDER, A.; AUER, D.P.; MERL, T.; REILMANN, R.; SAEMANN, P.; YASSOURIDIS, A.; BENDER, J.; WEINDL, A.; DODE, M.; GASSER, T.; KLOPSTOCK, T. Creatine supplementation lowers brain glutamate levels in Huntington's disease. **Journal of Neurology** v.252, p.36–41, 2005.

BERNABEU R., BEVILAQUA L., ARDENGHI P., BROMBERG E., SCHMITZ P., BIANCHIN M., IZQUIERDO I., AND MEDINA J. H. Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 94, 7041–7046, 1997.

BOURTCHULADZE, R.; FRENGUELLI, B.; BLENDI, J.; CIOFFI D.; SCHUTZ, G.; SILVA, A.J. Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. **Cell** v.79, p.59–68, 1994.

BOZON B., DAVIS S., LAROCHE S. A requirement for the immediate early gene zif268 in reconsolidation of recognition memory after retrieval. **Neuron**. 40(4):695–701, 2003.

BREWER, G.J.; WALLIMANN, T.W. Protective effect of the energy precursor creatine against toxicity of glutamate and beta-amyloid in rat hippocampal neurons. **Journal of Neurochemistry** v.74, p.1968–1978, 2000.

BRIGHTWELL JJ, SMITH CA, NEVE RL, COLOMBO PJ. Long-term memory for place learning is facilitated by expression of cAMP response element-binding protein in the dorsal hippocampus **Learn Mem**. 14(3):195-9, 2007.

COLOMBO, P.J.; BRIGHTWELL, J.J.; COUNTRYMAN, R.A. Cognitive strategy-specific increases in phosphorylated cAMP response element-binding protein and c-Fos in the hippocampus and dorsal striatum. **Journal of Neuroscience**, v.23, p.3547–3554, 2003.

DAS, A.M.; LÜCKE, T.; ULLRICH, K. GLUTARIC aciduria I: creatine supplementation restores creatinephosphate levels in mixed cortex cells from rat incubated with 3-hydroxyglutarate. **Molecular Genetics and Metabolism**. V. 78, p. 108-111, 2003.

DECHENT P, POUWELS PJ, WILKEN B, HANEFELD F, FRAHM J. Increase of total creatine in human brain after oral supplementation of creatine-monohydrate. **Am J Physiol** v.277:R698–704, 1999.

FERRANTE, R.F.; ANDREASSEN, O.A.; JENKINS, B.G.; DEDEOGLU, A.; KUEMMERLE, S.; KUBILUS, J.K.; KADDURAH-DAOUK, R.; HERSCH S.M.; BEAL,



M.F. Neuroprotective effects of creatine in a transgenic mouse model of Huntington's disease, **J. Neurosci.** v.20 (2000), pp. 4389–4397, 2000.

FERREIRA G.C., VIEGAS C.M, SCHUCK P.F, LATINI A., DUTRA-FILHO C.S., WYSE A.T., WANNMACHER C.M., VARGAS C.R., WAJNER M. **Int. J. Dev. Neurosci.** 23 687–693, 2005.

FLORIAN C, MONS N, ROULLET P. CREB antisense oligodeoxynucleotide administration into the dorsal hippocampal CA3 region impairs long- but not short-term spatial memory in mice. **Learn Mem.** 13(4):465-72, 2006.

GUSOWSKI J. F. AND MCGAUGH J. L. Antisense oligodeoxynucleotide- mediated disruption of hippocampal cAMP response element binding protein levels impairs consolidation of memory for water maze training. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 2693–2698, 1997.

HASS, C.J.; COLLINS, M.A.; JUNCOS, J.L. Resistance training with creatine monohydrate improves upper-body strength in patients with Parkinson disease: a randomized trial, **Neurorehab. Neural Repair** v. (2) (2007), pp. 107–115.

IMPEY, S.; MARK, M.; VILLACRES, E.C.; POSER, S.; CHAVKIN, C.; STORM, D.R. Induction of CRE-mediated gene expression by stimuli that generate long-lasting LTP in area CA1 of the hippocampus. **Neuron** v.16, p.973–98, 1996.

IZQUIERDO, I., BEVILAQUA, L.R., ROSSATO, J.I, BONINI, J.S, MEDINA, J.H., CAMMAROTA, M. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. **Trends Neurosci** 29: 496-505, 2006.

IZQUIERDO, I.; 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.

JOST, C.R.; VAN DER ZEE, C.E.; IN 'T ZANDT, H.J.; OERLEMANS, F.; VERHEIJ, M.; STREIJGER, F.; FRANSEN, J.; HEERSCHAP, A.; COOLS, A.R.; WIERINGA, B. Creatine kinase B-driven energy transfer in the brain is important for habituation and spatial learning behaviour, mossy fibre field size and determination of seizure susceptibility. **European Journal of Neuroscience** v.15, p.1692-1706, 2002.

MATTHIES H. Neurobiological aspects of learning and memory. **Rev. Psychol.** 40:381-404, 1989.

MCGAUGH J.L Time-dependent processes in memory storage, **Science** 153, 1351–1359, 1996.

MIZUNO M, YAMADA K, MAEKAWA N, SAITO K, SEISHIMA M, NABESHIMA T. CREB phosphorylation as a molecular marker of memory processing in the hippocampus for spatial learning. **Behav Brain Res.** 133(2):135-41, 2002.

MONS, N.; GUILLOU, J.L.; DECORTE, L.; JAFFARD, R. Spatial learning induces differential changes in calcium/calmodulin-stimulated (ACI) and calcium-insensitive (ACII) adenylyl cyclases in the mouse hippocampus. **Neurobiology of Learning and Memory** v.79, p.226-23, 2003.

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**, v.9, p. 3040–3057, 1989.

MOURAVLEV, A.; DUNNING, J.; YOUNG D. During, Somatic gene transfer of camp response element-binding protein attenuates memory impairment in aging rats, **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** v.103, pp. 4705–4710, 2006.

OLIVEIRA, M.S.; FURIAN, A.F.; FIGHERA, M.R.; FIORENZA, N.G.; FERREIRA, J.; RUBIN, M.A.; MELLO, C.F.; ROYES, L.F.F. The involvement of the polyamines binding sites at the NMDA receptor in creatine-induced spatial learning enhancement. **Behavioural Brain Research** v. 187 p. 200–204, 2008.

PAXINOS G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates, **Academic Press**, New York (1998).

PERSKY, A.M., BRAZEAU, G.A. Clinical pharmacology of the dietary supplement creatine monohydrate. **Pharmacol Rev** 53:161–76, 2001.

PORTE Y, BUHOT MC, MONS NE. Spatial memory in the Morris water maze and activation of cyclic AMP response element-binding (CREB) protein within the mouse hippocampus. **Learn Mem.** 15(12):885-94, 2008.

RAE C, DIGNEY AL, MCEWAN SR, BATES TC. Oral creatine monohydrate supplementation improves brain performance: a double-blind, placebocontrolled, cross-over trial. *Proc Biol Sci* 270:2147–50,2003.

RODRIGUES, S.M.; FARB, C.R.; BAUER, E.P.; LEDOUX, J.E.; SCHAFE, G.E. Pavlovian fear conditioning regulates Thr286 autophosphorylation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II at lateral amygdala synapses, **J Neurosci** v.24 p. 3281–3288, 2004.

ROYES, L.F.; et al. Creatine protects against the convulsive behavior and lactate production elicited by the intrastriatal injection of methylmalonate. **Neuroscience**, v. 4, n. 118, p. 1079 – 1090, 2003.

ROYES, L.F.; FIGHERA, M.R.; FURIAN, A.F.; OLIVEIRA, M.S.; MYSKIW J de, C.; FIORENZA, N.G.; PETRY, J.C.; COELHO, R.C.; MELLO, C.F. Efectiveness of creatine monohydrate on seizures and oxidative damage induced by methylmalonate. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior.** v. 83, p. 136–144, 2006.

ROYES, L.F.F.; FIGHERA, M.R.; FURIAN, A.F.; OLIVEIRA, M.S.; FIORENZA, N.G.; FERREIRA, J.; SILVA, A.C.; PRIEL, M.R.; UEDA, E.S.; CALIXTO, J.B.; CAVALHEIRO, E.A.; MELLO, C.F. Neuromodulatory effect of creatine on extracellular action potentials in rat hippocampus: Role of NMDA receptors **Neurochemistry International** v.53, p.33-37, 2008.

RUBIN MA, JURACH A, ZANOLLA GR, BOEMO RL, SOUZA DO, DE MELLO CF. Intrahippocampal GMP administration improves inhibitory avoidance performance through GABAergic and glutamatergic mechanisms in rats. **Neuroreport** 8(17):3713-6, 1997.

SAKELLARIS, G.; KOTSIUO, M.; TAMIOLAKI, M.; KALOSTOS, G.; TSAPAKI, E.; SPANAKI, M.; SPILIOTI, M.; CHARISSIS, G.; EVANGELIOU, A. Prevention of complications related to traumatic brain injury in children and adolescents with creatine administration: an open label randomized pilot study. **Journal of Neurotrauma** v.61, p.322–329, 2006.

SCHLATTNER U, TOKARSKA-SCHLATTNER M, WALLIMANN T. Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. **Biochim Biophys Acta** 1762: 164-180, 2006.

SHAPIRO, M.L.; EICHENBAUM, H. Hippocampus as a memory map: synaptic plasticity and memory encoding by hippocampal neurons. **Hippocampus**. v. 9, p. 365-84, 1999.

SILVA AJ, GIESE KP Plastic genes are in! **Curr Opi Neurobiol.**;4:413-420, 1994.

SILVA AJ, KOGAN JH, FRANKLAND PW, KIDA S. CREB and memory. **Ann Rev Neurosci** 21:127-148, 1998.

SILVA, A.J.; PAYLOR, R.; WEHNER, J.M.; TONEGAWA, S. Impaired spatial learning in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. **Science**, v.257, p.206–211, 1992.  
SILVA, G. Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. **Cell** v.79, p.59–68, 1994.

SULLIVAN, P.G.; GEIGER, J.D.; MATTSON, M.P.; SCHEF, S.W. Dietary supplement creatine protects against traumatic brain injury. **Annals of Neurology** v.48, p.723–729, 2000.

TAN, S.E.; LIANG, K.C. Spatial learning alters hippocampal calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity in rats, **Brain Res** v.711, p. 234–240, 1996.

TRIFILIEFF P, HERRY C, VANHOUTTE P, CABOCHE J, DESMEDT A, RIEDEL G, MONS N, MICHEAU J. Foreground contextual fear memory consolidation requires two independent phases of hippocampal ERK/CREB activation. **Learn Mem.** 13(3):349-58, 2006.

VALENZUELA MJ, JONES M, WEN W, RAE C, GRAHAM S, SHNIER R. Memory training alters hippocampal neurochemistry in healthy elderly. **Neuroreport** 14:1333–7, 2003.

VAZQUEZ, S.I.; VAZQUEZ, A.; PENA de ORTIZ, S. Different hippocampal activity profiles for PKA and PKC in spatial discrimination learning. **Behavioral Neuroscience**, v.114, p.1109–1118, 2000.

WALLIMANN T, WYSS M, BRDICZKA D, NICOLAY K, EPPENBERGER HM. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in

tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. **Biochem J** 281 ( Pt 1): 21-40, 1992.

WANG ET, MOYZIS RK. Genetic evidence for ongoing balanced selection at human DNA repair genes ERCC8, FANCC, and RAD51C. **Mutat Res.** 616(1-2):165-74, 2007.

WATANABE A, KATO N, KATO T. Effects of creatine on mental fatigue and cerebral hemoglobin oxygenation. **Neurosci Res** 42:279–85, 2002.

WEST, A.E.; CHEN, W.G.; DALVA, M.B.; DOLMETSCH, R.E.; KORNHAUSER, J.M.; SHAYWITZ, A.J.; TAKASU, M.A.; TAO, X.; GREENBERG, M.E. Calcium regulation of neuronal gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v.98, p.11024–1103, 2001.

WYSS M, KADDURAH-DAOUK R. Creatine and creatinine metabolism. **Physiol Rev** 80(3):1107-213, 2000.

ZHANG W., NARAYANAN M. AND FRIEDLANDER R. M. Additive neuroprotective effects of minocycline with creatine in a mouse model of ALS. **Ann. Neurol.** 53, 267-270, 2003.

## Figures and Legends

Figure 1

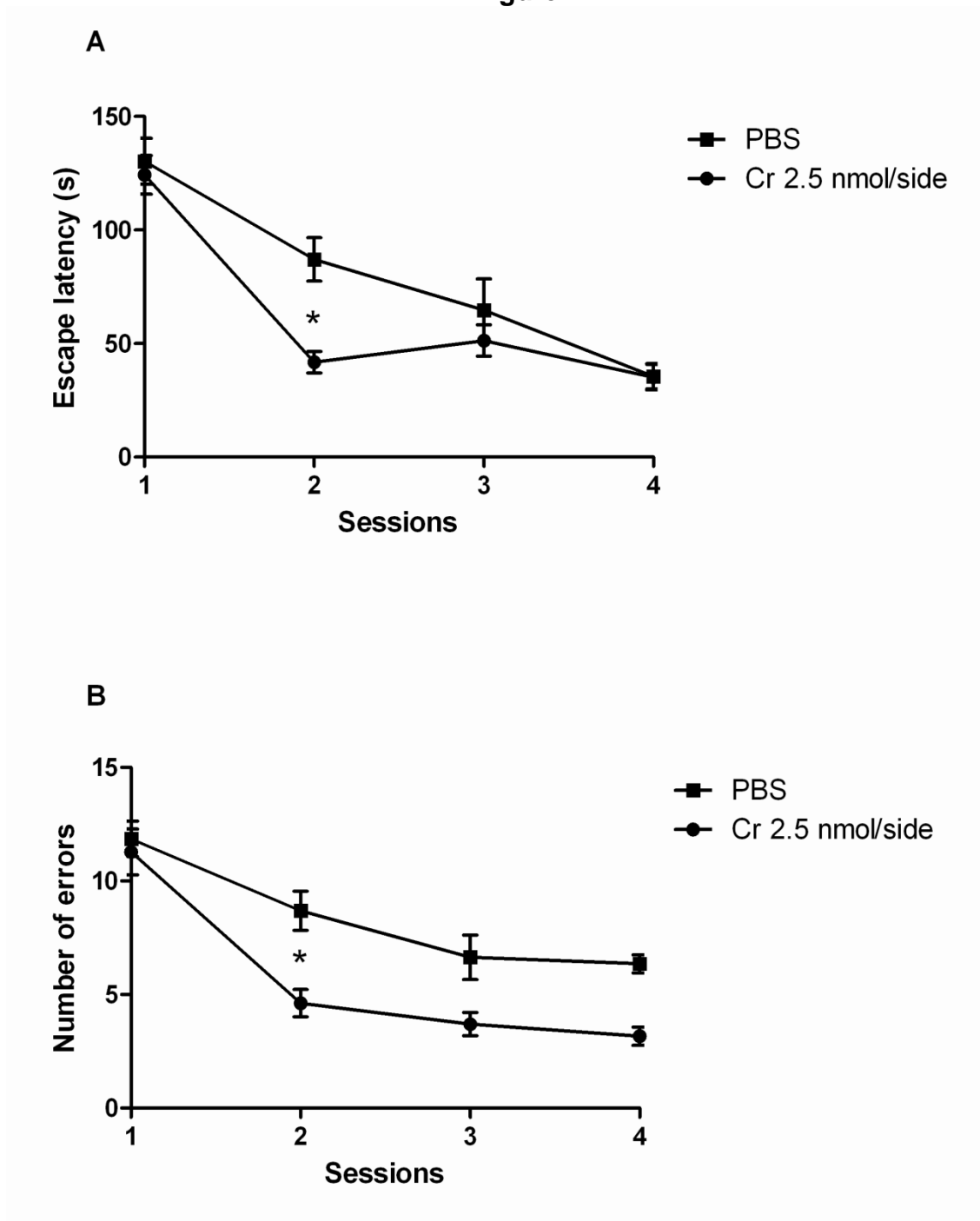


Fig. 1. Effect of the intrahippocampal administration of creatine (2.5 nmol/side) immediately after the end of first training session on the escape latency (A) and number of errors (B) in the Barnes maze. PBS represent vehicle treatment. \*P < 0.05 compared with PBS treated group by the Student–Newman–Keuls test. Data are the means  $\pm$  S.E.M. n = 13–14 animals in each group.

Figure 2

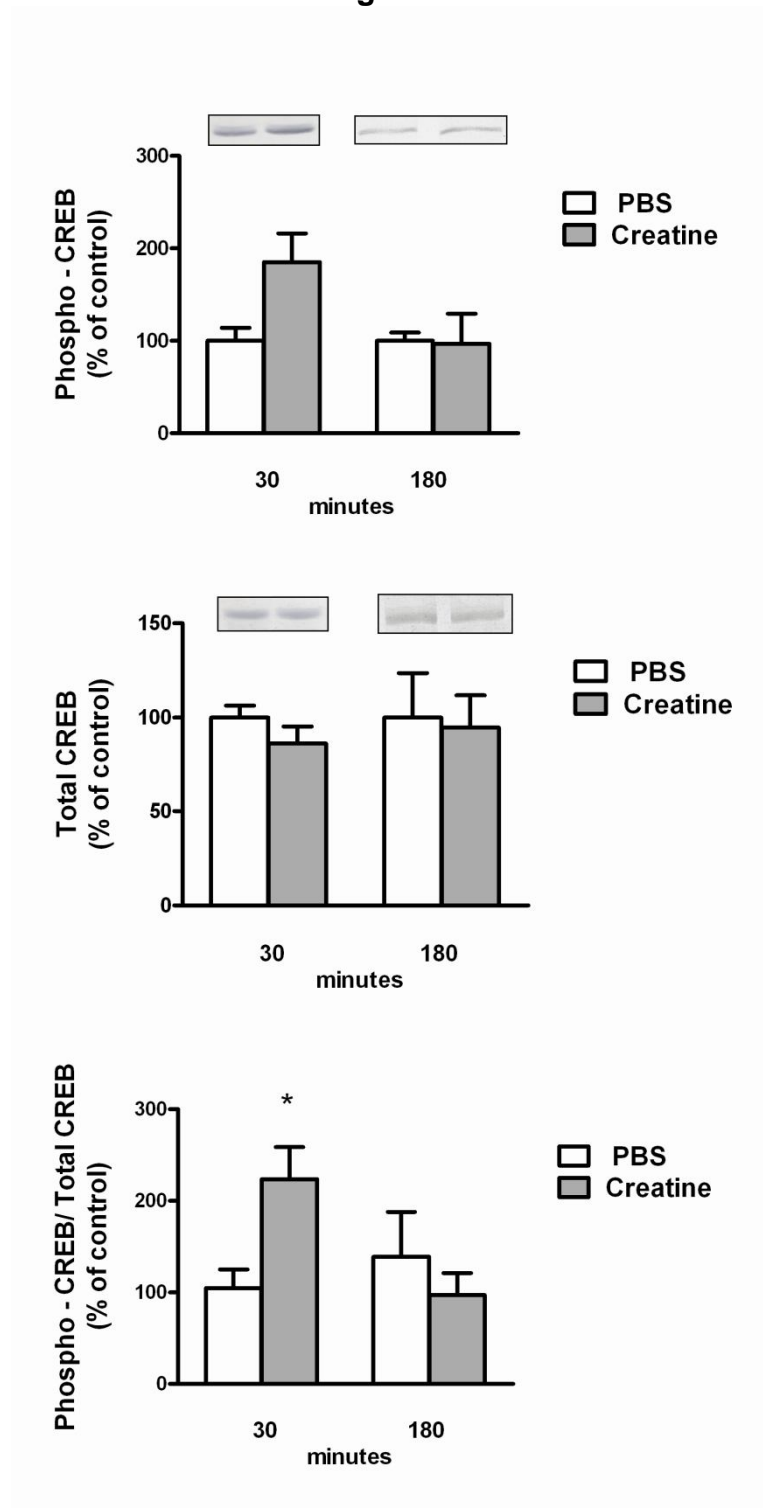


Fig. 2. (A) Effect of the intrahippocampal creatine (2.5 nmol/side) administration after 30 or 180 minutes on pCREB, (B) total CREB, (C) pCREB/CREB. \*P < 0.05 compared with PBS treated group by the Student–Newman–Keuls test. Data are the means  $\pm$  S.E.M. N= 4-7 animals in each group.

Figure 3

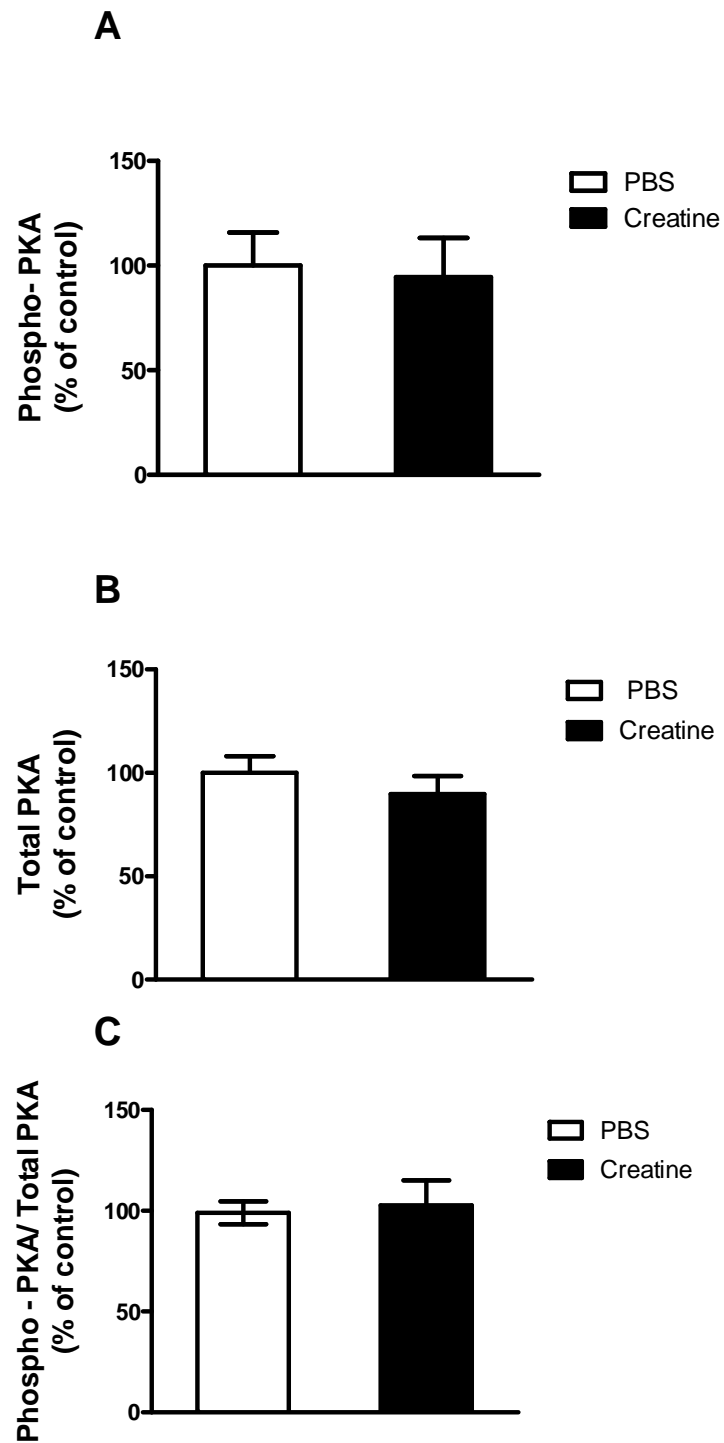


Fig. 3. (A) Effect of the intrahippocampal creatine (2.5 nmol/side) administration after 30 on pPKA, (B) total PKA, (C) pPKA/PKA. PBS represent vehicle treatment. Data are the means  $\pm$  S.E.M. n-4 animals in each group.

Figure 4

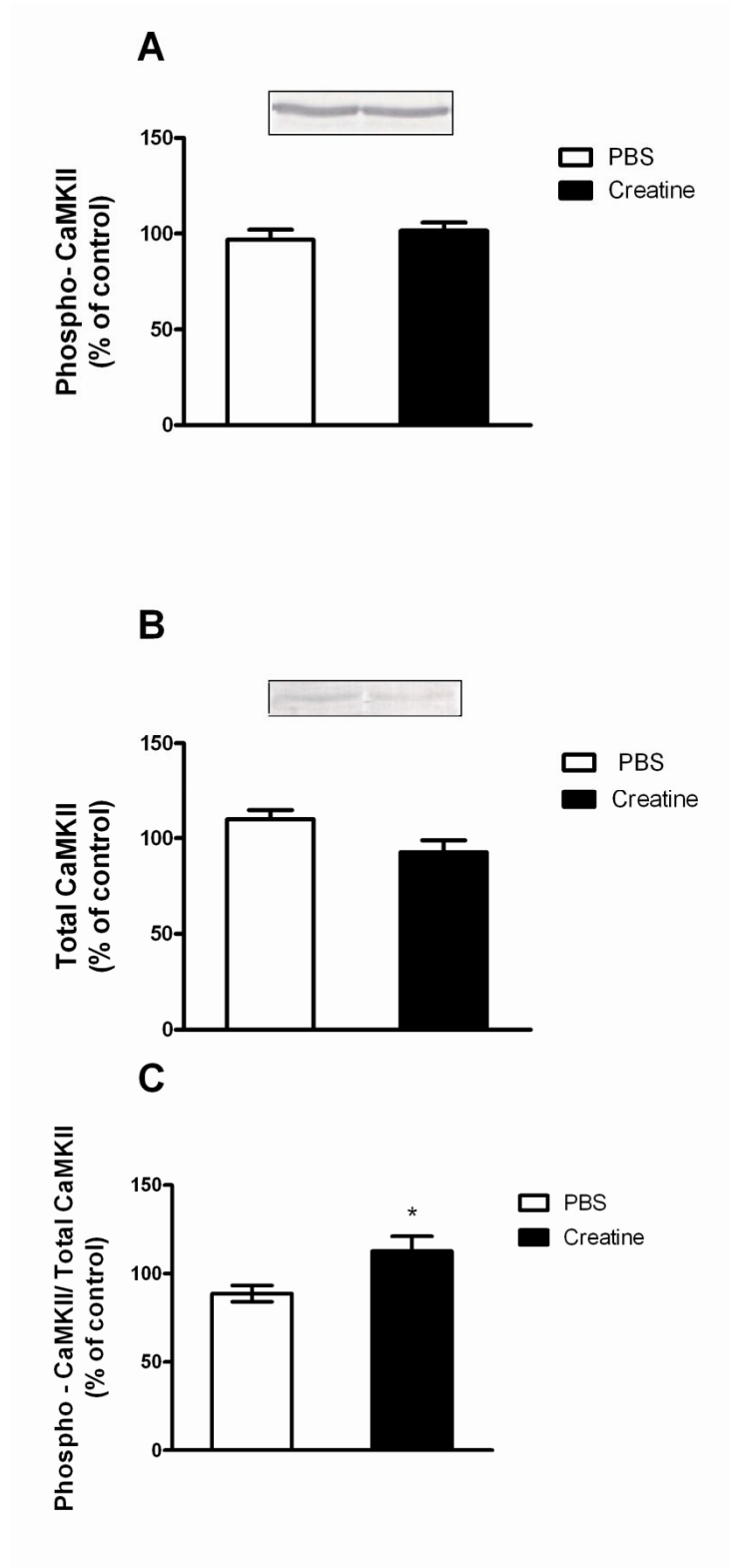


Fig. 4. (A) Effect of the intrahippocampal creatine (2.5 nmol/side) administration after 30 on pCaMKII, (B) total CaMKII, (C) pCaMKII/CaMKII. \* $P < 0.05$  compared with PBS treated group by the Student–Newman–Keuls test. Data are the means  $\pm$  S.E. n= 6-8.



---

## 5. DISCUSSÃO

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Discussão Geral

Uma das principais conseqüências do aumento da expectativa de vida é o declínio cognitivo decorrente dos processos fisiológicos do envelhecimento ou ainda, o declínio cognitivo relacionado às doenças neurodegenerativas (SCAZUFCA et al., 2002; PRINCE et al., 2003). Dada a escassez de medidas terapêuticas efetivas para o déficit de memória apresentado por pacientes, evidencia-se a importância da busca de novos compostos e do estudo do seu mecanismo de ação (BRUNBECH & SABERS, 2002). Uma das principais tendências das investigações é a pesquisa de novas drogas com propriedades neuroprotetoras (ELINOS-CALDERÓN et al., 2009; WILDBURGER et al., 2009).

Nesse contexto, estudos têm evidenciado o efeito neuroprotetor da creatina em uma variedade de modelos de doenças neurológicas tais como, hipóxia cerebral, ELA, AVC isquêmico, doenças neurodegenerativas e acidemia orgânicas (HOLTZMAN et al., 1998; KLIVENYI et al., 1999; WICK et al., 1999; MALCON et al., 2000; ROYES et al., 2003; MAGNI et al., 2007). Além disso, alguns estudos têm sugerido o envolvimento da Cr em processos fisiológicos importantes como o aprendizado e a memória (WATANABE et al. 2002; RAE et al., 2003; VALENZUELA et al. 2003; McMORRIS et al., 2006; 2007). Recentes estudos têm mostrado que a suplementação oral de creatina aumenta os escores em testes de inteligência e reduz a fadiga mental em sujeitos submetidos a sucessivos testes de cálculos (WATANABE et al. 2002; RAE et al. 2003; VALENZUELA et al. 2003). Entretanto, são poucos os estudos que verificaram o mecanismo pelo qual a Cr pode contribuir com a melhora do aprendizado e da memória até o momento.

No presente estudo, nós verificamos que a administração bilateral intra-hipocampal da Cr, imediatamente após o treino no teste do labirinto de Barnes, apresenta efeito facilitatório no aprendizado espacial, e que este efeito foi revertido pela co-administração intra-hipocampal do inibidor competitivo do transportador de Cr (3-GPA) e pelos inibidores da PKA (H-89) e da CaMKII (STO-609).

A administração intra-hipocampal de Cr foi realizada imediatamente pós-treino no Labirinto de Barnes, e seus efeitos foram significativos somente após vinte e quatro horas, sugerindo que a creatina tem uma janela de tempo para agir (entre 0 e 24 horas) e que o processo de degradação da creatina pode diminuir seu tempo de ação (WISS & KADDURAH, 2000).

A melhora do aprendizado espacial induzida pela Cr está, pelo menos em parte, de acordo com estudos que demonstraram que este composto induz uma melhora nos escores de testes de inteligência (RAE et al., 2003) e reduz a fadiga mental em sujeitos submetidos a sucessivos testes matemáticos (WATANABE et al., 2002). Além disso, a suplementação de Cr em pessoas idosas, e em indivíduos submetidos à privação de sono, uma condição associada com níveis reduzidos de Cr cerebrais, atenua o déficit cognitivo dos pacientes induzido por aquela situação de estresse (McMORRIS et al., 2007). Esses resultados sugerem que a Cr pode aumentar os níveis dos fosfatos de alta energia, utilizados como tampão energético e como transporte de moléculas energéticas (WALLIMANN et al. 1998), e que este fato pode explicar a redução da fadiga mental naqueles pacientes.

Nessa linha de pensamento, estudos mostram que o sistema Cr/PCr/CK está conectado a diferentes processos sinápticos e é fundamental para a homeostase energética (WALLIMANN 1998; SCHLATTNER et al., 2006). De acordo, Jost e colaboradores (2002) têm proposto que o sistema Cr/PCr/CK modula a velocidade de disparo do potencial de ação e/ou efetividade da comunicação intracelular necessária para a formação do aprendizado e memória por atuar como tampão energético. Além disso, é plausível propor que a manutenção da homeostase energética no cérebro requer uma distinta circuitária que promova um equilíbrio entre o consumo e a produção energética durante a performance de tarefas motoras e cognitivas (FOX et al., 1988; BELLIVEAU et al., 1991; BEAL 1992; BARINAGA 1997).

Além disso, vários estudos têm apontado algumas questões sobre o metabolismo da Cr, entre elas estão a regulação do transporte e captação desse composto pelo cérebro. Estudos *in vitro* têm indicado que a regulação da atividade do transportador de Cr pode ocorrer principalmente de duas formas: aguda ou a longo prazo (LOIKE et al. 1988; ODOOM et al. 1996). Em relação à regulação aguda da atividade do transportador (minutos a horas), esta pode envolver alterações nas concentrações intracelulares de Na<sup>+</sup> e Cr (LOIKE et al., 1988), e a regulação a longo prazo (dias ou semanas), pode ocorrer devido as alterações do número de

transportadores expressos pela célula e ou pela mudança no número de proteínas no plasma (GUERRERO-ONTIVEROS 1998). Além dessas alterações, pode ser observado que o aumento inicial na atividade do transportador, em resposta a elevados níveis de creatina extracelular, pode inibir, por retroalimentação negativa (“feedback”), a captação de Cr em células musculares (WYSS & KADDURAH-DAOUK 2000).

Neste sentido, nós decidimos verificar se a melhora da memória espacial observada após a administração intra-hipocampal de Cr é devido ao aumento no seu transporte para o meio intracelular. Para isso nós utilizamos 3-GPA, um análogo da Cr, que compete pela ligação no transportador de Cr (LUNARDI et al., 2006).

Os resultados demonstraram que a co-administração intra-hipocampal de 3-GPA e Cr preveniram o efeito facilitatório da Cr no aprendizado espacial no teste do labirinto de Barnes. Sendo o 3-GPA um análogo da Cr, ele pode estar inibindo as ações da creatina tanto a nível intracelular quanto a nível extracelular (SNOW & MURPHY, 2001).

A idéia que a Cr exerce seus efeitos exclusivamente via metabolismo energético intracelular (WYSS & KADDURAH-DAOUK 2000), não explica os achados de alguns estudos recentes que sugerem que esse composto pode estar desenvolvendo um papel modulatório nos processos de transmissão no sistema nervoso central (ANDRES et al., 2008). Nesse contexto, Almeida e colaboradores (2006) sugerem que a creatina pode agir como neuromodulador. Neste estudo, os autores mostram que a Cr acumula em fatias de neocórtex de maneira  $\text{Na}^+$ -dependente, por meio do transportador SLC6A8, além disso, é liberada após estimulação elétrica, sendo este efeito dependente de estimulação de canal de  $\text{Na}^+$  e de influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estes dados indicam que a Cr não é somente sintetizada e captada por neurônios (BRAISSANT et al., 2001), mas também liberada de uma maneira dependente de potencial de ação. Dessa forma, Royes e colaboradores (2008) verificaram que a Cr facilita a transmissão sináptica hipocampal e este efeito é atenuado pelo antagonista do receptor NMDA (AP5), além de, aumentar o binding de [ $^3\text{H}$ ] MK-801 em membranas hipocampais, sugerindo um papel modulatório para este composto guanidínico. (ROYES et al. 2008).

Trabalhos com manipulações genéticas e farmacológicas tem evidenciado a importância do receptor NMDA para a formação de memória espacial (MORRIS et al., 1986; WATSON & STANTON 2009). De acordo, foi mostrado que a arcaína

(antagonista do sítio das poliaminas no receptor NMDA) diminui o efeito facilitatório da Cr no aprendizado espacial, e que a espermidina (agonista do sítio das poliaminas no receptor NMDA) potencializa o efeito da creatina na memória espacial (OLIVEIRA et al., 2008). Estes dados sugerem que a Cr melhora a memória espacial por modular os sítio das poliaminas no receptor NMDA.

Além da ativação do receptor NMDA, foi observado que os processos de consolidação da memória requerem a participação de proteínas quinases como a PKA e a CaMKII (SILVA & GIESE, 1994; SILVA et al. 1998). Nesse sentido, nós decidimos verificar se a melhora da memória espacial, observada após a administração intra-hipocampal de Cr, pode envolver a ativação dessas enzimas. Alguns estudos têm mostrado que a ativação do receptor NMDA envolve o influxo de  $Ca^{2+}$  durante a indução do LTP no hipocampo e conseqüente ativação do complexo  $Ca^{2+}/CaM$  (IZQUIERDO & MEDINA, 1995; ABEL & LATTAL, 2001). Várias evidências suportam que a ativação do complexo  $Ca^{2+}/CaM$  estimula a enzima adenilato ciclase tipo I (AC I), a qual aumenta os níveis intracelulares de AMPc, ativando a PKA (IMPEY et al., 1998; WEST et al., 2001; MONS et al., 2003). Além da PKA, o complexo  $Ca^{2+}/CaM$  estimula a ativação e persistente autofosforilação da CaMKII (GHOSH & GREENBERG, 1995; MALENKA & NICOLL, 1999). Sabe-se que estas quinases fosforilam uma variedade de proteínas que desempenham uma participação importante na plasticidade das sinapses glutamatérgicas no hipocampo e na formação da memória espacial (ELGERSMA et al., 2004; NGUYEN et al., 2008).

Neste estudo nós verificamos que a co-administração dos inibidores da PKA (H-89) e da CaMKII (STO-609) atenuaram o efeito facilitatório da Cr no labirinto de Barnes, sugerindo a participação destas vias de ativação nos efeitos exercidos pela Cr.

Dessa forma, é possível propor que as alterações na fosforilação do receptor NMDA, mediado pela ativação das enzimas CaMKII e PKA (IZQUIERDO & MEDINA 1997) depois da administração intra-hipocampal de Cr, tenha uma função fundamental na formação da memória espacial. Além disso, desde que o sistema Cr/PCr é essencial como tampão energético e as concentrações de ATP intracelulares são suficientes para induzir a autofosforilação da CaMKII nas células que regulam as concentrações celulares de  $Ca^{2+}$  por períodos prolongados (COLBAN 1993), nós sugerimos que o metabolismo dos fosfatos de alta energia, modulados pela Cr, podem ser um marcador

molecular do processo de formação da memória espacial no hipocampo de ratos. Além disso, nossos resultados mostraram que nenhum dos compostos utilizados neste trabalho alteraram a atividade locomotora dos animais. Estes dados sugerem que a melhora da memória espacial induzida pela Cr não é devido a um efeito motor inespecífico, neste modelo experimental.

Dessa forma, os dados desta primeira parte do trabalho sugerem que a Cr pode exercer seus efeitos intracelulares na cascata de eventos de formação da memória espacial em ratos por agir: 1) como tampão energético (JOST et al., 2002); 2) como modulador de receptores glutamatérgicos, ativando a via de sinalização das proteínas quinases com a PKA e a CAMKII. Entretanto, estudos adicionais são necessários para esclarecer estas observações.

Sabendo que os processos de formação de memória requerem a transcrição de genes mediados pela fosforilação de CREB no resíduo de Ser<sup>133</sup> e que este processo requer a participação de proteínas quinases como a PKA e a CaMKII (SILVA & GIESE, 1994; SILVA et al. 1998), o objetivo da segunda parte deste trabalho foi verificar se a administração de Cr aumenta os níveis de pCREB, pPKA e pCaMKII no hipocampo de ratos.

Muitos estudos em roedores têm demonstrado que ativação de CREB no hipocampo está envolvida no processo de aprendizado espacial (BOURTCHULADZE et al., 1994; GUZOWSKI & MCGAUGH, 1997; MIZUNO et al., 2002; COLOMBO et al., 2003; MONCADA & VIOLA, 2006; FLORIAN et al., 2007). Nesse contexto, estudos bioquímicos revelam que o aprendizado espacial está relacionado com a ativação da PKA no hipocampo e que este processo envolve uma cascata de eventos que causam a consolidação da memória, devido à ativação de CREB (VAZQUEZ et al., 2000; MIZUNO et al., 2002).

Nesse contexto, foi analisado os níveis hipocampais de pCREB, em 30 minutos e 180 minutos após a administração de Cr, baseados em estudos prévios (BOURTCHULADZE et al., 1994; BERNABEU et al., 1996; COLOMBO et al., 2003; IZQUIERDO et al., 2006; TRIFILIEFF et al., 2006). A administração intra-hipocampal de Cr aumentou os níveis de pCREB em 30 minutos, mas não em três horas após a administração do composto energético. Além disso, alguns estudos têm sugerido que a ativação de CREB e a melhora da memória estão relacionadas mais com o tempo de ativação do que com a magnitude da fosforilação da enzima (PORTE et al., 2008).

Além disso, a administração de Cr não foi capaz de aumentar os níveis de pPKA no hipocampo de ratos, sugerindo que esta quinase não está envolvida na fosforilação de CREB nos tempos testados (30 minutos e 3 horas). De certa forma, estes achados estão de acordo com estudos que reportam que a ativação da PKA não está envolvida na fosforilação do transportador de Cr e na sua captação intracelular (NASH et al., 1994; DAI et al., 1999). Entretanto, a administração hipocampal do inibidor da PKA (H-89) atenuou o efeito facilitatório da Cr no aprendizado espacial observado no teste do labirinto de Barnes. Uma hipótese para esses resultados é que o H-89, na dose utilizada, pode não ter um efeito específico somente para a atividade da PKA, mas pode estar atuando na atividade de outras proteínas quinases como a CaMKII e a PKC (PIERCE et al., 1998). Além disso, o tempo em 30 minutos pode não ser o ideal para analisar a atividade da PKA neste modelo experimental, pois alguns estudos mostram que a ativação desta enzima pode ocorrer em dois picos diferentes, o primeiro entre 0 e 60 minutos e o segundo entre 3 e 5 horas (COLOMBO et al., 2003; STANCIU et al., 2001; TAUBENFELD et al., 2001; IZQUIERDO et al., 2006; TRIFILIEFF et al., 2006). Dessa forma, estudos adicionais devem ser realizados para complementar esses resultados.

Por outro lado, a administração intra-hipocampal de Cr foi capaz de aumentar os níveis de pCaMKII no hipocampo de ratos. Sabendo que a ativação do receptor NMDA envolve o influxo de  $Ca^{2+}$  e conseqüente ativação do complexo  $Ca^{2+}/CaM$  e CaMKII (IZQUIERDO & MEDINA, 1995; ABEL & LATTAL, 2001), estes resultados sugerem que a Cr parece estar modulando o receptor NMDA e ativando a CaMKII e CREB, proteínas envolvidas no processo de formação da memória. Estes resultados de certa forma complementam os dados anteriores, que verificaram que a adição de Cr, no meio de incubação, facilita a transmissão sináptica hipocampal e que este efeito foi atenuado por antagonista do receptor NMDA (ROYES et al., 2008). Além disso, a administração intra-hipocampal desse composto guanidínico também induz uma melhora no aprendizado espacial por modular o sítio das poliaminas naquele receptor glutamatérgico (OLIVEIRA et al., 2008).

Dessa forma, a partir dos resultados obtidos até o momento, pode-se sugerir que o efeito da Cr, na melhora da memória espacial, pode envolver a ação do transportador de Cr e a ativação da via de sinalização intracelular da CaMKII. O transportador de Cr requer  $1Cl^-$  e  $2Na^+$  para cada molécula de Cr transportada (SNOW & MURPHY, 2001), esse aumento no influxo de  $Na^+$  pode facilitar a

despolarização e aumentar o influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  celular via receptores de membrana. Esse processo pode induzir a ativação da CaMKII e conseqüente a fosforilação de CREB, facilitando o aprendizado espacial no teste do labirinto de Barnes.

Em resumo, este trabalho mostrou, pela primeira vez, a regulação do transporte trans-celular da Cr e o envolvimento da via de sinalização intracelular da CaMKII na melhora da memória espacial causada pela Cr no teste do labirinto de Barnes. Estes achados concordam com estudos que evidenciam que a Cr exerce neuroproteção e melhora da memória por atuar dentro da célula como tampão energético, assim como, concorda com achados que sugerem que a Cr pode exercer efeito neuromodulador.

Embora os pacientes com declínio cognitivo apresentam melhora desta alteração após a suplementação com a Cr, é difícil afirmar que essa melhora tenha relação com os resultados obtidos nesse estudo. Contudo, o papel da Cr no efeito facilitatório do aprendizado espacial evidenciado aqui, pode ser de grande valia para o entendimento da fisiopatologia do processo de formação da memória espacial bem como o estabelecimento de novas condutas para o tratamento do déficit cognitivo.



---

## **6. CONCLUSÕES**

## **6. CONCLUSÕES**

Tendo em vista os objetivos do presente trabalho, pode-se concluir que:

### **6.1 Capítulo I**

1. A melhora da memória espacial induzida pela Cr parece depender de transporte para o meio intracelular.
2. A melhora da memória causada por Cr parece depender das vias de sinalização da PKA e CaMKII.

### **6.2 Capítulo II**

1. A melhora da memória espacial induzida por creatina parece depender da ativação de CaMKII e CREB
2. A melhora da memória induzida por creatina parece não envolver a participação da PKA.

---

## 7. BIBLIOGRAFIA

## 7. BIBLIOGRAFIA

ABEL, T.; NGUYEN, P.V.; BARAD, M.; DEUEL, T.A.S.; KANDEL, E.R.; BOURTCHULADZE, R. Genetic demonstration of a role for pka in the late phase of ltp and in hippocampus-based long-term memory. **Cell**, v.88, p615–626, 1997.

ABEL, T.; NGUYEN, P.V. Regulation of hippocampus-dependent memory by cyclic AMP-dependent protein kinase. **Progress in Brain Research**, v.169, 2008.

ABEL, T.; LATTAL, M. Molecular mechanisms of memory acquisition consolidation and retrieval. **Current Opinion in Neurobiology**. v. 11, n. 2, p. 180–187, 2001.

ABRAHAMMS, S.; PICKERING, A.; POLKEY, C.E.; MORRIS, R.G. Spatial memory deficits in patients with unilateral damage to the right hippocampal formation. **Neuropsychologia**, v.35, p.11-24, 1997.

ADCOCK, K.H.; NEDELCO, J.; LOENNEKER, T.; MARTIN, E.; WALLIMANN, T.; WAGNER, B.P. Neuroprotection of creatine supplementation in neonatal rats with transient cerebral hypoxia-ischemia. **Developmental Neuroscience** v.24, p.382–388, 2002.

AKSENOV, M.; AKSENOVA, M.; BUTTERFIELD D. A.; MARKESBERY, W. R. Oxidative modification of creatine kinase BB in Alzheimer's disease brain. **Journal of Neurochemistry** v.74, p.2520–2527, 2000.

ALAM, M.; SCHMIDT, W.J. Rotenone destroys dopaminergic neurons and induces parkinsonian symptoms in rats. **Behavioral Brain Research** v.136, p.317–324, 2002.

ALBRIGHT, T.D.; KANDEL, E.R.; POSNER, M.I. Cognitive neuroscience. **Current Opinion Neurobiology**, v.10 p. 612-624, 2000.

ALMEIDA, L.S.; SALOMONS, G.S.; HOGENBOOM, F.; JAKOBS, C.; SCHOFFELMEER, A.N. Exocytotic release of creatine in rat brain. **Synapse** v. 60 p. 118–23, 2006.

ANDRES, R.F.; DUCRAYA, A.D.; SCHLATTNERB, U.; WALLIMANN, T.; WIDMER, H.R. Functions and effects of creatine in the central nervous system. **Brain Research Bulletin** v.76, p.329–343, 2008.

ANDRES, R.H.; DUCRAY, A.D.; PEREZ-BOUZA, A.; SCHLATTNER, U.; HUBER, A.W.; KREBS, S.H.; SEILER, R.W.; WALLIMANN, T.; WIDMER, H. R.. Creatine supplementation improves dopaminergic cell survival and protects against MPP+ toxicity in an organotypic tissue culture system. **Cell Transplant**. V.14, p.537–550, 2005.

BACH, M.E.; BARAD, M.; SON, H.; ZHUO, M.; LU, Y.F.; SHIH, R.; MANSUY, I.; HAWKINS, R.D.; KANDEL, E.R. Age-related defects in spatial memory are correlated with defects in the late phase of hippocampal long-term potentiation in vitro and are attenuated by drugs that enhance the cAMP signaling pathway. **Proceedings in the National Academic Sciences USA** v.96, p.5280–5285, 1999.

BACH ME, HAWKINS RD, OSMAN M, KANDEL ER, MAYFORD M.. Impairment of spatial but not contextual memory in CaMKII mutant mice with a selective loss of hippocampal LTP in the range of the theta frequency. **Cell** 81:905–15, 1995

BALSOM, P.; SODERLUND, K.; EKBLUM, B. Creatine in humans with special reference to creatine supplementation. **Sports Medicine**, Auckland, v.18,n.4, p.268-280, 1994.

BARINAGA, M. What makes brain neurons run? **Science** v.276, p.196-198, 1997.

BEAL, M.F. Mitochondria, free radicals, and neurodegeneration. **Current Opinion in Neurobiology** v.6, p.661–666, 1996.

BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. **Neurociência: desvendando o sistema nervoso**. 2a edição, Porto Alegre: Artmed Editora S.A., 2002.

BEAVO, J.A.; BECHTEL, P.J.; KREBS, E.G. Activation of protein kinase by physiological concentrations of cyclic AMP. **Proceedings of the National Academic Sciences U.S.A.** v. 71, p. 3580–3583, 1974.

BEEBE, S.J. The cAMP-dependent protein kinases and cAMP signal transduction. **Seminars in Cancer Biology**, v. 5, p. 285–294, 1994.

BELLIVEAU, J.W.; KENNEDY, D.N.; J.R.; MCKINSTY, R.C.; BUCHBINDER, B.R.; WEISSKOFF, R.M.; COHEN, M.S.; VEVEA, J.M.; BRADY, T.J.; ROSEN, B.R. Functional mapping of the human visual cortex by magnetic resonance imaging. **Science** v.254, p.716-719, 1991.

BENDER, A.; KOCH, W.; ELSTNER, M.; SCHOMBACHER, Y.; BENDER, J.; MOESCHL, M.; GEKELER, F.; MULLER-MYHSOK, B.; GASSER, T.; TATSCH, K.; KLOPSTOCK. Creatine supplementation in Parkinson disease: a placebo-controlled randomized pilot trial. **Neurology** v.67, p.1262–1264, 2006.

BENDER, A.; BECKERS, J.; SCHNEIDER, I.; HOLTER, S.M.; HAACK, T.; RUTHSATZ, T. Creatine improves health and survival of mice. **Neurobiology of Aging** v.29, p.1404-11, 2008.

BERGER M.L.; BITAR A.Y.; WAITNER M.J.; REBERNIK P.; O'SULLIVAN M.C. Polyamines and the NMDA receptor: modifying intrinsic activities with aromatic substituents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** , v.16, p. 2837–2841, 2006.

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. **Neuro Report**, v. 7 p. 585–588, 1996.

BESSMAN, S.P.; GEIGER, P.J. Transport of energy in muscle: the phosphorylcreatine shuttle. **Science** v.211, p.448-452, 1981.

BEST, P.J.; WHITE, A.M.; MINAI, A. Spatial processing in the brain: The Activity of Hippocampal Place Cells. **Annual Review of Neuroscience**, v.24, p.459-486, 2001.

BLENNOW, K.; de LEON, M.J.; ZETTERBERG, H. Alzheimer's disease. **Lancet** v.368, p.387–403, 2006.

BLISS, T.V.P.; COLLINGRIDGE, G.L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, 361:31 39, 1993.

BLISS, T.V., LOMO, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. **The Journal of Physiology**, v. 232, p. 331–56, 1973.

BONUCCELLI, U.; Del DOTTO, P. New pharmacologic horizons in the treatment of Parkinson disease. **Neurology** v.67, p.S30–38, 2006.

BOURTCHULADZE, R.; FRENGUELLI, B.; BLENDI, J.; CIOFFI D.; SCHUTZ, G.; SILVA, A.J. Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. **Cell** v.79, p.59–68, 1994.

BRAISSANT O.; HENRY H.; LOUP M.; EILERS B.; BACHMANN C. Endogenous synthesis and transport of creatine in the rat brain: an in situ hybridization study. **Brain Research. Molecular Brain Research**. 86:193–201, 2001.

BRASTED, P.J.; BUSSEY, T.J.; MURRAY, S.P. Role of the hippocampal system in associative learning beyond the spatial domain. **Brain**, v.126, p.1202-223, 2003.

BRAUNS A.P.; SCHULMAN, H. The multifunctional calcium/calmodulin dependent protein kinase: from form to function. **Annual Reviews of Physiology** v.57, p.417–445, 1995.

BREWER, G.J.; WALLIMANN, T.W. Protective effect of the energy precursor creatine against toxicity of glutamate and beta-amyloid in rat hippocampal neurons. **Journal of Neurochemistry** v.74, p.1968–1978, 2000.

BRIGHTWELL, J.J.; GALLAGHER, M.; COLOMBO, P.J. Hippocampal CREB1 but not CREB2 is decreased in aged rats with spatial memory impairments. **Neurobiology of Learning and Memory** v.81, p.19–26, 2004.

BROADBENT, N.J.; SQUIRE, L.R.; CLARK, R.E. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v.101, n.40, p.14515-14520, 2004.

BROWNE, S.E.; BEAL, M.F. Oxidative damage and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. **Biochem. Soc. Trans.** v.22, p.1002–1006, 1994.

BRUNBECH, L.; SABERS, A. Effect of antiepileptic drugs on cognitive function in individuals with epilepsy: a comparative review of newer versus older agents. **Drugs** v.62, p.593-604, 2002.

BÜRKLEN, T.S.; SCHLATTNER, U.; HOMAYOUNI, R.; GOUGH, K.; RAK, M.; SZEGHALMI, A.; WALLIMANN, T. The Creatine Kinase/Creatine Connection to Alzheimer's Disease: CK-Inactivation, APP-CK Complexes and Focal Creatine Deposits. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. v.2006, p.35936-35939, 2006.

CACUCCI, F.; THOMAS, J.; WILLS, C.; LEVER, K.P.G.; O'KEEFE. Experience-Dependent Increase in CA1 Place Cell Spatial Information, But Not Spatial Reproducibility, Is Dependent on the Autophosphorylation of the  $\alpha$ -Isoform of the Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II. **The Journal of Neuroscience**, v.27, p.7854-7859, 2007.

CADD, G.; McKNIGHT, G.S. Distinct patterns of cAMP-dependent protein kinase gene expression in mouse brain. **Neuron** v. 3, p.71–79, 1989.

CAHILL, L.; McGAUGH, J. L. Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. **Trends in Neurosciences**, v. 21, n. 7, p. 294–299, 1998.

CASADEMONT, J.; RODRIGUEZ-SANTIAGO, B.; MIRÓ, O.; BEATO, A.; LÓPEZ, S.; NUNES, V.; CARDELLACH, F. Mitochondrial respiratory chain in brain homogenates: activities in different brain areas in patients with Alzheimer's disease. **Aging Clinical and Experimental Research**. v.17, p.1-7, 2005.

CASEY, A.; GREENHAFF, P.L. Does dietary creatine supplementation play a role in skeletal muscle metabolism and performance? **The American Journal of Clinical Nutrition**. 72 (2 Suppl.): 607S-617S, 2000.

CHETKOVICH, D.M.; GRAY, R.; JOHNSTON, D.; SWEATT, J.D. N-Methyl-D-aspartate receptor activation increases cAMP levels and voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel activity in area CA1 of hippocampus. **Proceedings in the National Academic Sciences U.S.A.** v.88, p.6467–6471, 1991.

CHETKOVICH, D.M.; SWEATT, J.D. NMDA receptor activation increases cyclic AMP in area CA1 of the hippocampus via calcium/calmodulin stimulation of adenylyl cyclase. **Journal of Neurochemistry** v.61, p.1933–1942, 1993.

CHEVREUL. Sur la composition chimique du bouillon de viandes. **J Pharm Sci Access** v.21, p.231-242, 1835.

CHO, Y.H.; GIESE, K.P.; TANILA, H.; SILVA, A.J.; EICHENBAUM, HEIT, G., SMITH, M.E.; HALGREN, E. Abnormal hippocampal spatial representations in  $\alpha$ CaMKII T286A and CREBaD2 mice. **Science** v.279, p.867–869, 1988.

CHOU, J. C.; LEE, E.C. Differential involvement of hippocampal G-protein subtypes in the memory process of rats. **Neuroscience**, v. 64, p. 5–15, 1995.

COLBAN, R.J. Inactivation of Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent Protein Kinase II by Basal, 1993.

COOKE, S.F.; WU, J.; PLATTNER, F.; ERRINGTON, M.; ROWAN, M.; PETERS, M.; HIRANO, A.; BRADSHAW, K.D.; ANWYL, R.; BLISS, T.V.; GIESE, K.P. Autophosphorylation of  $\alpha$ CaMKII is not a general requirement for NMDA receptor-dependent LTP in the adult mouse. **The journal of Physiology**. v. 574, p. 805-18, 2006.



COLOMBO, P.J.; BRIGHTWELL, J.J.; COUNTRYMAN, R.A. Cognitive strategy-specific increases in phosphorylated cAMP response element-binding protein and c-Fos in the hippocampus and dorsal striatum. **Journal of Neuroscience**, v.23, p.3547–3554, 2003.

CURTIS, C.E.; D'ESPOSITO, M. Persistent activity in the prefrontal cortex during working memory. **Trends in Cognitive Sciences**. v. 7, p. 415–423, 2003.

DAI, W.; VINNAKOTA, S.; QIAN, X.; KUNZE, D.L.; SARKAR, H.K. Molecular characterization of the human CRT-1 creatine transporter expressed in *Xenopus* oocytes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v.361, p.75–84, 1999.

DALMAZ, C.; NETTO, C.A. A memória. **Ciência e Cultura**, v. 56, p. 30–31, 2004.

DeGRAUNW T. J., SALOMONS, G. S., CECIL, K. M., CHUCK, G., NEWMAYER, A., SCHAPIRO, M. B., JAKOBS, C.. Congenital creatine transporter deficiency. **Neuropediatrics** 33, 232–238, 2002.

DITYATEV, A.E.; BOLSHAKOV, V. Amygdala, long-term potentiation, and fear conditioning. **Neuroscientist**, v. 11 p. 75-88, 2005.

DOSKELAND, S.O.; MARONDE, E.; GJERTSEN, B.T. The genetic subtypes of cAMP-dependent protein kinase—functionally different or redundant? **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1178, p. 249–258, 1993.

EGGLETON, P.; EGGLETON, G.P. The inorganic phosphate and a labile form of organic phosphate in the gastrocnemius of the frog. **The Biochemical Journal** v.21, p.190–195, 1927.

EICHENBAUM, H. The hippocampus and mechanisms of declarative memory. **Behavioural Brain Research**, v.103, p.123-133, 1999.

EINCHENBAUM, H. **The Cognitive Neuroscience of Memory**: an Introduction. Oxford University Press, 2002.

ELGERSMA, Y.; SWEATT, J.D.; GIESE, K.P. Mouse genetic approaches to investigating calcium/calmodulin-dependent protein kinase II function in plasticity and cognition. **Journal of Neuroscience** v.24, p.8410-8415, 2004.

ELINOS-CALDERÓN, D.; ROBLEDO-ARRATIA, Y.; PÉREZ-DE LA CRUZ, V.; PEDRAZA-CHAVERRÍ, J.; ALI, S.F.; SANTAMARÍA, A. Early nerve ending rescue from oxidative damage and energy failure by L: -carnitine as post-treatment in two neurotoxic models in rat: recovery of antioxidant and reductive capacities. **Experimental Brain Research** v.197, p.287-96, 2009.

ELIOT, L.S.; DUDAI, Y.; KANDEL, E.R.; ABRAMS, T.W. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin sensitivity may be common to all forms of neural adenylate cyclase. **Proceedings of the National Academic Sciences U.S.A.** v.86, p.9564–9568, 1989.

ERONDU, N.E.; KENNEDY, M.B. Regional distribution of type II Ca<sup>2+</sup> /calmodulin dependent protein kinase in rat brain. **Journal of Neuroscience** v.5, p.3270–3277, 1985.

FELDMAN, E.B. Creatine: a dietary supplement and ergogenic aid. **Nutrition Reviews**, v.57, p.45-50, 1999.

FISKE, C.H.; SUBBAROW, Y. The nature of the “inorganic phosphate” in voluntary muscle. **Science** v.65, p.401-403, 1927.

FLORIAN, C.; MONS, N.; ROULLET, P. CREB antisense oligodeoxynucleotide administration into the dorsal hippocampal CA3 region impairs long- but not short-term spatial memory in mice. **Learning and Memory** v.13, p.465-7, 2007.

FOX, P.T.; RAICHLE, M.E.; MINTUN, M.A.; DENCE, C. Nonoxidative glucose consumption during focal physiologic neural activity. **Science** v.241, p.462-464, 1988.

FRANKLAND, P.W.; O'BRIEN, C.; OHNO, M.; KIRKWOOD, A.; SILVA, A.J. Alpha-CaMKII-dependent plasticity in the cortex is required for permanent memory. **Nature** v.411, p.309–313, 2001.

FRANCIS, S.H.; CORBIN, J.D. Cyclic nucleotide-dependent protein kinases: intracellular receptors for cAMP and cGMP action. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences.** v. 36, p. 275–328, 1999.

GHOSH, A.; GREENBERG, M.E. Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. **Science**, v.268, p.239–247, 1995.

GIBBS, C.S.; KNIGHTON, D.R.; SOWADSKI, J.M.; TAYLOR, S.S.; ZOLLER, M.J. Systematic mutational analysis of cAMP-dependent protein kinase identifies unregulated catalytic subunits and defines regions important for the recognition of the regulatory subunit. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 4806–4814, 1992.

GIBSON, D.A.; HARRIS, B.R.; ROGERS, D.T.; LITTLETON, J.M. Radioligand binding studies reveal agmatine is a more selective antagonist for a polyamine-site on the NMDA receptor than arcaine or ifenprodil, **Brain Research** v.952, p.71–77, 2002.

GIESE, K.P.; FEDOROV, N.B.; FILIPKOWSKI, R.K.; SILVA, A.J. Autophosphorylation at Thr286 of the alpha calcium-calmodulin kinase II in LTP and learning. **Science** v.279, p.870–873, 1998.

GILBERT, M. E.; LASLEY, S. M. Long-term consequences of developmental exposure to lead or polychlorinated biphenyls: Synaptic transmission and plasticity in the rodent CNS. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 12, p. 105–117, 2002.

GOLDMAN-RAKIC P.S. Memory: recording experience in cells and circuits: diversity in memory research. **Proceedings of the National Academic Sciences U S A**. v. 24 p. 13435-7. Review, 1996.

GONZALEZ, G.A.; MONTMINY, M.R. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. **Cell** v.59, p.675–680, 1989.

GREENHAFF, P.L. The nutritional biochemistry of creatine. **Journal of Nutrition Biochemistry** v.8, p.610–618, 1997.

GUERRERO-ONTIVEROS, M.L.; WALLIMANN, T. Creatine supplementation in health and disease. Effects of chronic creatine ingestion in vivo: down-regulation of the expression of creatine transporter isoforms in skeletal muscle. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.184, p.427-437, 1998.

GUZOWSKI, J.F.; McGAUGH, J.L. Anti-sense oligodeoxynucleotide-mediated disruption of hippocampal CREB protein levels impairs memory of a spatial task. **Proceedings in National Academic Sciences USA**, v.94, p.2693/8, 1997.

HAUSMANN, O.N.; FOUAD, K.; WALLIMANN, T.; SCHWAB, M.E. Protective effects of oral creatine supplementation on spinal cord injury in rats. **Spinal Cord** v.40, p.449–456, 2002.

HOLTZMAN, D.; TOGLIATTI, A.; KHAIT, I.; JENSEN, F. Creatine increases survival and suppresses seizures in the hypoxic immature rat. **Pediatric Research** v.44, p.410-414, 1998.

HUMMLER, E. et al. Targeted mutation of the CREB gene: compensation within the CREB/ATF family of transcription factors. **Proceedings in the National Academic Sciences USA** v.91, p.5647–5651, 1994.

IZQUIERDO, I. Long-term potentiation and mechanisms of memory. **Drug development research**, v. 30, p. 1–17, 1993.

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

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. **Behavioral Neural Biology**. v. 58, p. 16–26, 1992.

IZQUIERDO I.; McGAUGH JL Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. **Behavioural Pharmacology**. 11(7-8):517-34. Review, 2000.

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**, v.68, p. 285–316, 1997.

IZQUIERDO et al. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. **Trends in Neuroscience**, v.29, p.496-505, 2006.

JOST, C.R.; VAN DER ZEE, C.E.; IN 'T ZANDT, H.J.; OERLEMANS, F.; VERHEIJ, M.; STREIJGER, F.; FRANSEN, J.; HEERSCHAP, A.; COOLS, A.R.; WIERINGA, B. Creatine kinase B-driven energy transfer in the brain is important for habituation and spatial learning behaviour, mossy fibre field size and determination of seizure susceptibility. **European Journal of Neuroscience** v.15, p.1692-1706, 2002.

KANDEL, E.R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. **Science**, v.294, p.1030-1038, 2001.

KANDEL, E.R.; HAWKINS, R.D. The biological basis of learning and individuality. **Scientific American** v.267, p.78–86, 1992.

KESSELS, R.P.C.; HAAN, E.H.F.; KAPPELLE, L.J.; POSTMA, A. Varieties of human spatial memory: a meta-analysis on the effects of hippocampal lesions. **Brain Research Review**, v.35, p.295- 303, 2001.

KLIVENYI, P.; KIAEI, M.; GARDIAN, G.; CALINGASAN, N.Y.; BEAL, M.F. Additive neuroprotective effects of creatine and cyclooxygenase 2 inhibitors in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. **Journal of Neurochemistry**, v. 88, p. 576–582, 2004.

KUDO, K.; WATI, H.; QIAO, C.; ARITA, J.; KANBA S. Age-related disturbance of memory and CREB phosphorylation in CA1 area of hippocampus of rats. **Brain Research** v.1054, p.30–37, 2005.

LANG, A.E.; LOZANO, A.M. Parkinson's disease. First of two parts. **The New England Journal of Medicine**. v.339, p.1044–1053, 1998.

LAWLER, J.M.; BARNES, W.S.; WU, G.; SONG, W.; DEMAREE, S. Direct antioxidant properties of creatine. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 290, p. 47–52, 2002.

LEES, G.V.; JONES, E.G. Expressive genes Record memories. **Neurobiology of Disease**, v. 7, n. 5, p. 533–536, 2000.

LENSMAN, M.; KORZHEVSKII, D.E.; MOUROVETS, V.O.; KOSTKIN, V.B.; IZVARINA, N.; PERASSO, L.; GANDOLFO, C.; ORELLIN, V.A.; POLENOV, S. A.; BALESTRINO, M. Intracerebroventricular administration of creatine protects against damage by global cerebral ischemia in rat. **Brain Research** v.1114, p.187–194, 2006.

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

LEUTGEB, J.K.; LEUTGEB J.K.; BARNES C.A.; MOSER E.I.; McNAUGHTON B.L. Progressive transformation of hippocampal neuronal representations in “morphed” environments. **Neuron** v. 48, p. 345-358, 2005.

LEUZZI, V.; BIANCHI, M.C.; TOSETTI, M.; CARDUCCI, C.; CERQUIGLINI, C. A.; CIONI, G.; ANTONOZZI, I. Brain creatine depletion: guanidinoacetate methyltransferase deficiency (improving with creatine supplementation). **Neurology** 55, 1407–1409, 2000.

LI Q.; ZHAO H.F.; ZHANG, Z.F.; LIU, Z.G.; PEI, X.R.; WANG, J.B.; AI, M.Y.; LI, Y. Long-term administration of green tea catechins prevents age-related spatial learning and memory decline in C57BL/6 J mice by regulating hippocampal cyclic AMP-response element binding protein signaling cascade. **Neuroscience** v.159, p.1208–1215, 2009.

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

LISMAN, J.; SCHULMAN, H.; CLINE, H. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. **Nature Reviews. Neuroscience**, v.3, p.175–190, 2002.

LOHMANN, K. Über die enzymatische Aufspaltung der Kreatinphosphorsäure; zugleich ein Beitrag zum Chemismus der Muskelkontraktion. **Biochemical** v.271, p.264-277, 1934.

LOIKE, J.D.; ZALUTSKY, D.L.; KABACK, E.; MIRANDA, A.F.; SILVERSTEIN, S.C. Extracellular creatine regulates creatine transport in rat and human muscle cells. **Proceedings in the National Academic of Sciences, USA** v.85, p.807-811, 1988.

LONZE, B.E.; GINTY, D.D. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. **Neuron**; v.35, p.605–623, 2002.

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**, v. 46 p.113–174, 1934.

LUNARDI, G.; PARODI, A.; PERASSO, L.; POHVOZCHEVA, A.; SCARRONE, S.; ADRIANO, E.; FLORIO, GANDOLF, C.; CUPELLO, A.; BUROV, S.; BALESTRIN, M. The creatin transporter mediates the uptake of creatine by brain tissue, but not the uptake of two creatine-derived compounds. **Neuroscience**. v.4, p.991-7, 2006.

LUNDGAARD, E. Weitere Untersuchungen über Muskelkontraktionen ohne Milchsäurebildung. **Biochemical** v.227, p.51-83, 1930.

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

MALENKA, R.C.; NICOLL, R.A. Long-term potentiation-a decade of progress? **Science** v.285, p.1870-1874, 1999.

MAMMEN, A.L.; KAMEYAMA, K.; ROCHE, K.W.; HUGANIR, R.L. Phosphorylation of the alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor GluR1 subunit by calcium/calmodulin-dependent kinase II. **The Journal of Biological Chemistry** v.272, p.32528-32533, 1997.

MARTTILA, R.J.; RINNE, U.K. Clues from epidemiology of Parkinson's disease. **Advances in Neurology** v.45, p.285-288, 1987.

MATTHEWS, R.T.; FERRANTE, R.J.; KLIVENYI, P.; YANG, L.; KLEIN, A.M.; MUELLER, G.; KADDURAH-DAOUK, R.; BEAL, M.F. Creatine and cyclocreatine attenuate MPTP neurotoxicity. **Experimental Neurology** v.157, p.142-149, 1999.

MAYFORD, M.; BACH, M.E.; HUANG, Y.Y.; WANG, L.; HAWKINS, R.D.; KANDEL ER. Control of memory formation through regulated expression of aCaMKII transgene. **Science** v. 274, p.1678-1683, 1996.

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

McGAUGH, J.L. Memory- A century of consolidation. **Science**, 287: 248-251, 2000.

McGAUGH, J. Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective. **Trends in neurosciences**, v. 25, n. 9, p. 456-461, 2002.

McKNIGHT, G.S.; CLEGG, C.H.; UHLER, M.D.; CHRIVIA, J.C.; CADD, G.G.; CORRELL, L.A.; OTTEN, A.D. Analysis of the cAMP-dependent protein kinase system using molecular genetic approaches. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 44, p.307-335, 1988.

McMORRIS, T.; HARRIS, R.C.; HOWARD, A.N.; LANGRIDGE, G.; HALL, B.; CORBETT, J. Creatine supplementation, sleep deprivation, cortisol, melatonin and behavior. **Physiol Behav** v.8, p.90-21, 2007

McMORRIS, T.; MIELCARZ, G., HARRIS, R.C.; SWAIN, J.P.; HOWARD, A. Creatine supplementation and cognitive performance in elderly individuals. **Neuropsychol Dev Cogn** v.28, p.14:517–28,2007.

MERCIMEK-MAHMUTOGLU, S.; STOECKLER-IPSIRPGLU, S.; ADAMI, A.; APPLETON, R.; ARAUJO, H.C.; DURAN, M.; ENSENAUER, R.; FERNANDEZ-ALVAREZ, E.; GARCIA, P.; GROLIK, C.; ITEM, C.B.; LEUZZI, V.; MARQUARDT, I.; MUHL, A.; SAELEKE-KELLERMANN, R. A.; SALOMONES, G. S.; SCHULZE, A.; SURTEES, R.; VAN DER KNAAP, M.S.; VASCONCELOS, R.; VERHOEVEN, N.M.; VILARINHO, L.; WILICHOWSKI, E.; JAKOBS, C. GAMT deficiency: features, treatment, and outcome in an inborn error of creatine synthesis. **Neurology** v.67, p.480–484, 2006.

MEYER, L. E.; MACHADO, L.B.; SANTIAGO, A.P.; da-SILVA, W.S.; De FELICE, F.G.; HOLUB, O.; OLIVEIRA, M.F.; GALINA, A. Mitochondrial creatine kinase activity prevents reactive oxygen species generation: Antioxidant role of mitochondrial kinases-dependent ADP re-cycling activity. **The Journal of Biological Chemistry** v.281, p.37361–37371, 2006.

MILLER S.G.; KENNEDY, M.B. Regulation of brain type II Ca<sup>2+</sup>/cal-modulin-dependent protein kinase by autophosphorylation: a Ca<sup>2+</sup>-triggered molecular switch. **Cell** v.44, p.861–870, 1986.

MIYAMOTO, E.; KUO, J.F.; GREENGARD, P. Adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase from brain. **Science** v. 165, p. 63–65, 1968.

MIYAMOTO, E.; KUO, J.F.; GREENGARD, P. Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. Purification and properties of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase from bovine brain. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 244, p. 6395–6402, 1969.

MIZUNO M.; YAMADA K.; MAEKAWA N.; SAITO K.; SEISHIMA M.; NABESHIMA T. CREB phosphorylation as a molecular marker of memory processing in the hippocampus for spatial learning. **Behavioral Brain Research** v.133, p.135–141, 2002.

MONCADA, D.; VIOLA, H. Phosphorylation state of CREB in the rat hippocampus: a molecular switch between spatial novelty and spatial familiarity? **Neurobiology of Learning and Memory**, 2006.



MONS, N.; GUILLOU, J.L.; DECORTE, L.; JAFFARD, R. Spatial learning induces differential changes in calcium/calmodulin-stimulated (ACI) and calcium-insensitive (ACII) adenylyl cyclases in the mouse hippocampus. **Neurobiology of Learning and Memory** v.79, p.226-23, 2003.

MONSMA Jr., F.J.; MAHAN, L.C.; McVITIE, L.D.; GERFEN, C.R.; SIBLEY, D.R. Molecular cloning and expression of a D1 dopamine receptor linked to adenylyl cyclase activation. **Proceedings in the National Academic Sciences U.S.A.** v.87, p.6723–6727, 1990.

MONTMINY M. Transcriptional regulation by cyclic AMP. **Annual Reviews in Biochemistry** v.66, p.807–822, 1997.

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**, v.9, p. 3040–3057, 1989.

MUJIKI, I.; PADILLA, S. Creatine supplementation as an ergogenic aid for sports performance in highly trained athletes: a critical review. *International Journal of Sports and Medicine* v.18, p.491–496, 1997.

NASH, S.R.; GIROS, B.; KINGSMORE, S.F.; ROCHELLE, J.M.; SUTER, S.T.; GREGOR, P.; SELDIN, M.F.; CARON, M.G. Cloning, pharmacological characterization, and genomic localization of the human creatine transporter. **Receptors and Channels**. v.2, p.165–174, 1994.

NEED, A.C.; GIESE, K.P. Handling and environmental enrichment do not rescue learning and memory impairments in alphaCaMKII (T286A) mutant mice. **Genes Brain and Behavior** v.2, p.132–139, 2003.

NGUYEN, P.V.; WOO, N.H. Regulation of hippocampal synaptic plasticity by cyclic AMP-dependent protein kinases. **Progress in Neurobiology**, v. 71, p. 401–437, 2003.

NINDS-NET-PD-Investigators. A randomized, double-blind, futilityclinical trial of creatine and minocycline in early Parkinson disease. **Neurology** v.66, p.664–671, 2006.

ODOOM, J.E.; KEMP, G.J.; KADDA, G.K. The regulation of total creatine content in a myoblast cell line. **Molecular and cellular biochemistry** p.158: 179-188, 1996.

O'KEEFE, J.; DOSTROVSKY, J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. **Brain Research**, v.34, p.171–175, 1971.

O'KEEFE, J.; NADEL, L. The hippocampus as a cognitive map. **Oxford: Oxford University Press**, 1978.

OLIVEIRA, M.S.; FURIAN, A.F.; FIGHERA, M.R.; FIORENZA, N.G.; FERREIRA, J.; RUBIN, M.A.; MELLO, C.F.; ROYES, L.F.F. The involvement of the polyamines binding sites at the NMDA receptor in creatine-induced spatial learning enhancement. **Behavioural Brain Research** v. 187 p. 200–204, 2008.

OLTON, D.S.; BECKER, J.T.; HANDELMANN, G.E. Hippocampus, space, and memory. **The behavioural and Brain Sciences**, v.2, p.313-365, 1979.

PALMER, A.M.; et al. Traumatic brain injury-induced excitotoxicity assessed in a controlled cortical impact model. **Journal of Neurochemistry**, v. 6, n. 61, p. 2015 - 2024, 1993.

PAN, J.; W.; TAKAHASHI, K. Cerebral energetic effects of creatine supplementation in humans. **American Journal of Physiology. Regulatory Integrative Compomparative** v. 292 p. 1745-1750, 2007.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates** (2nd ed.). San Diego: Academic Press, 1986.

PERSKY, A.M.; BRAZEAU, G.A. Clinical pharmacology of the dietary supplement creatine monohydrate. **Pharmacological Reviews**, v. 53 p. 161–76, 2001.

PIERCE, R. C.; QUICK, E. A.; REEDER, D.C.; MORGAN, Z. R.; KALIVAS, P.W. Calcium-Mediated Second Messengers Modulate the Expression of Behavioral Sensitization to Cocaine. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.286, 1998.

POORTMANS, J.R.; FRANCAUX, W. Adverse effects of creatine supplementation: fact or fiction? **Sports Medicine**, v.30, p.155-70, 2003.

PORTE Y.; BUHOT M.C.; MONS N. Alteration of CREB phosphorylation and spatial memory deficits in aged 129T2/Sv mice. **Neurobiology of Aging** v.29, p.1533–1546, 2008.

POTÌ, P. Aspects of spatial cognition in capuchins (*Cebus apella*): frames of reference and scale of space. **Animal Cognition**, v.3, p.69-77, 2000.

POTÌ, P.; BARTOLOMMEI, P.; SAPORITI, M. Landmark use by *Cebus apella*. **International Journal of Primatology**, v.26, n.4, p. 921-948, 2005.

POTTS, M.B.; et al. Traumatic injury to the immature brain: inflammation, oxidative injury, and iron-mediated damage as potential therapeutic targets. **NeuroRx**, n. 3, p. 143 – 153, 2006.

POULSEN, D.J.; STANDING, K.; BULLSHIELDS, K.; SPENCER, P.E.; MICEVYCH, BABCOCK. Overexpression of Hippocampal Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Improves Spatial Memory **Journal of Neuroscience Research** v.85, p.735–739, 2007.

POTHUIZEN, H.H.; JONGEN-RELO, A.L.; FELDON, J.; YEE, B.K. Double dissociation of the effects of selective nucleus accumbens core and shell lesions on impulsive-choice behaviour and salience learning in rats. **European Journal of Neuroscience**, v.22, p.2605–2616, 2005.

PRASS, K.; ROYL, G.; LINDAUES, U.; FREYER, D.; MEGOW, D.; DIRNAGL, U.; STOKLER-IPSIROGLU, G.; WALLIMANN, T.; PRILLER, J. Improved reperfusion and neuroprotection by creatine in a mouse model of stroke. **Journal of Cerebral and Blood Flow Metabolism**, 2007.

PRINCE, M.; ACOSTA, D.; CHIU, H.; SCAZUFCA, M.; VARGUESE, M. Dementia diagnosis in developing countries: a cross-cultural validation study. **The Lancet** v.361, p.909-917, 2003

RABCHEVSKY, A.G.; SULLIVAN, P.G.; FUGACCIA, I.; SCHEF, S.W. Creatine diet supplement for spinal cord injury: influences on functional recovery and tissue sparing in rats. **Journal of Neurotrauma** v.20, p.659–669, 2003.

RAE, C.; DIGNEY, A.L.; McEWAN, S.R.; BATES, T.C. Oral creatine monohydrate supplementation improves brain performance: a double-blind, placebo-controlled, cross-over trial. **Proceeding Biological Sciences**. v. 270, p.2147–2150, 2003.

RANGANATH, C.; BLUMENFELD, R.S. Doubts about double dissociations between short- and long-term memory. **Trends in Cognitive Sciences**. v. 9, p.374-390, 2005.

REBAUDO, R., MELANI, R., CARITA, F., ROSI, L., PICCHIO, V., RUGGERI, P., IZVARINA, N., BALESTRINO, M.. Increase of cerebral phosphocreatine in normal rats after intracerebroventricular administration of creatine. **Neurochemistry Research** v.25, p.1493–1495, 2000.

REIMANN, E.M.; WALSH, D.A.; KREBS, E.G. Purification and properties of rabbit skeletal muscle adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 246, p. 1986–1995, 1971.

RIEDEL, G.; PLATT, B.; MICHEAU, J. Glutamate receptor function in learning and memory. **Behavioural Brain Research**, v.18, p.1- 47, 2003.

ROESLER, R.; SCHRODER, N.; VIANNA, M. R; QUEVEDO, J.; BROMBERG, E.; KAPCZINSKI, F.; FERREIRA, M. B; Differential involvement of hippocampal and amygdalar NMDA receptors in contextual and aversive aspects of inhibitory avoidance memory in rats. **Brain Research**. v.975, p. 207-213, 2003.

ROSSATO, J.I.; BONINI, J.S.; COITINHO, A.S.; VIANNA, M.R.; MEDINA, J.H.; CAMMAROTA, M.; IZQUIERDO, I. Retrograde amnesia induced by drugs acting on different molecular systems. **Behavioral Neuroscience** v.118, p.563-8, 2004.

ROYES, L.F.; FIGHERA, M.R.; FURIAN, A.F.; OLIVEIRA, M.S.; DA SILVA, L.G.; MALFATTI, C.R.; SCHNEIDER, P.H.; BRAGA, A.L.; WAJNER, M.; MELLO, C.F. Creatine protects against the convulsive behavior and lactate production elicited by the intrastriatal injection of methylmalonate. **Neuroscience** v.118, p.1079-1090, 2003.

ROYES, L.F.; FIGHERA, M.R.; FURIAN, A.F.; OLIVEIRA, M.S.; MYSKIW J de, C.; FIORENZA, N.G.; PETRY, J.C.; COELHO, R.C.; MELLO, C.F. Effectiveness of creatine monohydrate on seizures and oxidative damage induced by methylmalonate. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. v. 83, p. 136–144, 2006.

ROYES, L.F.F.; FIGHERA, M.R.; FURIAN, A.F.; OLIVEIRA, M.S.; FIORENZA, N.G.; FERREIRA, J.; SILVA, A.C.; PRIEL, M.R.; UEDA, E.S.; CALIXTO, J.B.; CAVALHEIRO, E.A.; MELLO, C.F. Neuromodulatory effect of creatine on extracellular action potentials in rat hippocampus: Role of NMDA receptors **Neurochemistry International** v.53, p.33-37, 2008.

RUBIN, M.A.; BOEMO, R.L.; JURACH, A.; ROJAS, D.B.; ZANOLLA, G.R.; OBREGON, A.D.C.; SOUZA, D.O.; MELLO, C.F. Intra-hippocampal spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. **Behavioural Pharmacology**, v. 11, p.57–62, 2000.

RUBIN, M.A.; BERLESE, D.B.; STIEGEMEIER, J.A.; VOLKWEIS, M.A.; OLIVEIRA, D.M.; DOS SANTOS, T.L.; FENILI, A.C.; MELLO, C.F. Intra-amygdala administration of polyamines modulates fear conditioning in rats. **The Journal of Neuroscience**. v. 24, p. 2328-34, 2004.

SAKELLARIS, G.; KOTSIU, M.; TAMIOLAKI, M.; KALOSTOS, G.; TSAPAKI, E.; SPANAKI, M.; SPILIOTI, M.; CHARISSIS, G.; EVANGELIOU, A. Prevention of complications related to traumatic brain injury in children and adolescents with creatine administration: an open label randomized pilot study. **Journal of Neurotrauma** v.61, p.322–329, 2006.

SAKS, V.A.; ROSENSHTRAUKH, L.V.; SMIRNOV, V.N.; CHAZOV, E.I. Role of creatine phosphokinase in cellular function and metabolism. **Journal of Physiology and Pharmacology** v.56, p.691-706, 1978.

SCAZUFCA, M.C. et al. - Epidemiological research on dementia in developing countries. **Revista de Saúde Pública** v.36, p.773-778, 2002.

SCHAPIRA, A.H.; COOPER, J.M.; DEXTER, D.; CLARK, J.B.; JENNER, P.; MARSDEN, C.D. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry** v.54, n.823–827, 1990.

SCHEF, S. W., DHILLON, H. S.. Creatine-enhanced diet alters levels of lactate and free fatty acids after experimental brain injury. **Neurochem.Res.** 29, 469–479, 2004.

SCHLATTNER, U., TOKARSKA-SCHLATTNER, M., WALLIMANN, T., Molecular structure and function of mitochondrial creatine kinases, in *Creatine kinase biochemistry, physiology, structure and function* (Vial, C., Uversky, V. N., Eds.) pp 123–170, **Nova Science Publishers**, New York, USA, 2006.

SCHULZE, A. Creatine deficiency syndromes. **Molecular and Cellular Biochemistry** v.244, p.143–150, 2003.

SESTILI, P.; MARTINELLI, C.; BRAVI, G.; PICCOLI, G.; CURCI, R.; BATTISTELLI, M.; FALCIERI, E.; AGOSTINI, D.; GIOACCHINI, A.M.; STOCCHI, V. Creatine supplementation affords cytoprotection in oxidatively injured cultured mammalian cells via direct antioxidant activity. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 40 p. 837-849, 2006.

SHAPIRO, M.L.; EICHENBAUM, H. Hippocampus as a memory map: synaptic plasticity and memory encoding by hippocampal neurons. **Hippocampus**, v.9: p.365-84, 1999.

SHARIFZADEH, M.; SHARIFZADEH, K.; NAGHDI, N.; GHARREMANI, M.H.; ROGHANI, A. Posttraining intrahippocampal infusion of a protein kinase A inhibitor impairs spatial memory retention in rats. **Journal of Neuroscience Research**, v.79, p.392–400, 2005.

SHENG, M.; THOMPSON, M.A.; GREENBERG, M.E. CREB: a Ca<sup>2+</sup>-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. **Science**, v.252, p.427-30, 1991.

SIJENS, P. E.; VERBRUGGEN, K.T.; MEINERS, L.C.; SOORANI-LINSING, R. J.; RAKE, J.P.; OUDKERK, M. 1H chemical shift imaging of the brain in guanidine methyltransferase deficiency, a creatine deficiency syndrome; guanidinoacetate accumulation in the gray matter. **European Radiology**. v.15, p.1923–1926, 2005.

SILVA, A. J. Molecular and cellular cognitive studies of the role of synaptic plasticity in memory. **Journal of Neurobiology**, v.54, p.224 – 237, 2003.

SILVA, A.J.; PAYLOR, R.; WEHNER, J.M.; TONEGAWA, S. Impaired spatial learning in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. **Science**, v.257, p.206–211, 1992.

SILVA, A.J.; GIESE, K.P. Plastic genes are in! **Current Opinion in Neurobiology**.v.4, p.413-420, 1994.

SILVA, A.J.; KOGAN, J.H.; FRANKLAND, P.W.; KIDA, S. CREB and memory. **Ann Review Neurosci** v.21, p.127-148, 1998.

SKALHEGG, B.S.; TASKEN, K. Specificity in the cAMP/PKA signalling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. **Frontiers in Bioscience**. v. 5, p. D678–D693, 2000.

SNOW, R.J.; MURPHY, R.M. Creatine and the creatine transporter: a review. **Molecular and Cellular Biochemistry** v.224, p.69-81, 2001.

SODERLING, T.R..Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II: role in learning and memory. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.127/128, p. 93–101, 1993.

SQUIRE, L. R.; KANDEL, E. R. **Memória: da mente às moléculas**, Porto Alegre, Artmed Editora S.A, 2003.

SQUIRE, L.R.; STARK, C.E.L.; CLARK, R.E. The Medial Temporal Lobe. **Annual Review of Neuroscience**, v.27, p.279-306, 2004.

SQUIRE, L.R.; ZOLA, S.M. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 93, 13515-13522, 1996.

STOCKLER, S., HANEFELD, F., FRAHM, J.. Creatine replacement therapy in guanidinoacetate methyltransferase deficiency, a novel inborn error of metabolism. **Lancet** v.348, p.789–790, 1996.

SULLIVAN, P.G.; GEIGER, J.D.; MATTSON, M.P.; SCHEF, S.W. Dietary supplement creatine protects against traumatic brain injury. **Annals of Neurology** v.48, p.723–729, 2000.

SUTHERLAND, E.W., OYE, I., BUTCHER, R.W.. The action of epinephrine and the role of the adenyl cyclase system in hormone action. **Recent Progress in Hormone Research**, v.21, p. 623–646, 1965.

SUTHERLAND, E.W.; RALL, T.W. The properties of an adenine ribonucleotide produced with cellular particles, ATP, Mg, and epinephrine or glucagons. **Journal of the American Chemistry Society**, v.79, p.3608, 1957.

SYKUT-CEGIELSKA, J.; GRADOWSKA, W.; MERCIMEK-MAHMUTOGLU, S.; STOCCKLER-IPSIROGLU, S. Biochemical and clinical characteristics of creatine deficiency syndromes. **Acta Biochimica Polonica**. v.51, p.875–882, 2004.

TANG.J.; GILMAN, A.G. Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G protein beta gamma subunits. **Science** v.254, p.1500–1503, 1991.

TASKEN, K.; SKALHEGG, B.S.; SOLBERG, R.; ANDERSSON, K.B.; TAYLOR, S.S.; LEA, T.; BLOMHOFF, H.K.; JAHNSEN, T.; HANSSON, V. Novel isozymes of cAMP-dependent protein kinase exist in human cells due to formation of RI alpha-RI beta heterodimeric complexes. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 268, p. 21276–21283, 1993.

TAYLOR, S.S.; BUECHLER, J.A.; YONEMOTO, W. cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 59, p. 971–1005, 1990.

TRIFILIEFF, P.; HERRY, C.; VANHOUTTE, P.; CABOCHE, J.; DESMEDT, A.; RIEDEL, G.; MONS, N.; MICHEAU, J. Foreground contextual fear memory consolidation requires two independent phases of hippocampal ERK/CREB activation. **Learning and Memory**. V.13, p.349-58, 2006.

VALENZUELA, M.J.; JONES, M.; WEN, W.; RAE, C.; GRAHAM, S. SHNIER, R. Memory training alters hippocampal neurochemistry in healthy elderly. **Neuroreport** v.14 p. 1333–7, 2003.

VAN DER KNAAP, M.S.; VERHOEVEN, N.M.; MAASWINKEL-MOOIJ, P.; POWELS, P.J.; ONKENHOUT, W.; PEETERS, E.A.; STOCKLER-IPSIROGLU, S.; JAKOBS, C. Mental retardation and behavioral problems as presenting signs of a creatine synthesis defect. **Annals of Neurology**. v.47, p.540–543, 2000.

VASQUES, V.; BRINCO, F.; VIEGAS, C.M.; WAJNER, M. Creatine prevents behavioral alterations caused by methylmalonic acid administration into the hippocampus of rats in the open field task. *Journal of the Neurological Science*. V. 244, p.23-9, 2006.

VAZQUEZ, S.I.; VAZQUEZ, A.; PENA de ORTIZ, S. Different hippocampal activity profiles for PKA and PKC in spatial discrimination learning. **Behavioral Neuroscience**, v.114, p.1109–1118, 2000.

VERBESSEM, P.; LEMIERE, J.; EIJNDE, B.O.; SWINNEN, S.; VANHEES, L.; VAN LEEMPUTTE, M.; HESPEL, P.; DOM, R. Creatine supplementation in Huntington's disease: a placebo-controlled pilot trial. **Neurology**. v.61, p.925-30, 2003.

WALKER, J.B.. Creatine: biosynthesis, regulation, and function. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 50: 177-242, 1979.

WALLIMANN, T.; DOLDER, M.; SCHLATTNER, U.; EDER, M.; HORNEMANN, T.; O'GORMAN, E.; RUCK, A.; BRDICZKA, D. Some new aspects of creatine kinase (CK): compartmentation, structure, function and regulation for cellular and mitochondrial bioenergetics and physiology. **Biofactors** v. 8 p. 229-234, 1998.



WALSH, D.A.; PERKINS, J.P.; KREBS, E.G. An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. The **Journal of Biological Chemistry**, v. 243, p. 3763–3765, 1968.

WATANABE, A.; KATO, N.; KATO T. Effects of creatine on mental fatigue and cerebral hemoglobin oxygenation. **Neuroscience Research**. v. 42 p. 279–85, 2002.

WATSON, D.J.; STANTON, M.E. Spatial discrimination reversal learning in weanling rats is impaired by striatal administration of an NMDA-receptor antagonist. **Learning and Memory** v.16, p.564-72, 2009.

WENDT, S.; DEDEOGLU, A.; SPEER, O.; WALLIMANN, T.; BEAL, M.F.; ANDREASSEN, O.A. Reduced creatine kinase activity in transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice. **Free Radical Biology Medicine**. v.32, p.920–926, 2002.

WERNER, C.; ENGELHARD, K. Pathophysiology of traumatic brain injury. **British Journal of Anaesthesia**, v. 1, n. 99, p. 4 – 9, 2007.

WICK, M.; FUJIMORI, H.; MICHAELIS, T.; FRAHM, J. Brain water diffusion in normal and creatine-supplemented rats during transient global ischemia. **Magnetic Resonance in Medicine** v.42, p.798-802, 1999.

WILSON, M.A.; McNAUGHTON B.L. Dynamics of the hippocampal ensemble code for space. **Science** 261, 1055–1058, 1993.

WILSON, M.A.; McNAUGHTON, B.L. Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep. **Science** 265, 676–679, 1994.

WYSE A.T.S.; BAVARESCO C.S.; REIS E.A.; ZUGNO A.I.; TAGLIARI B.; CALCAGNOTO T. Training in inhibitory avoidance causes a reduction of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in rat hippocampus, **Physiology & Behavior**. 80, p. 475–479, 2004.

WYSS M.; KADDURAH-DAOUK R. Creatine and creatinine metabolism. **Physiological Reviews**, v. 80 p. 1107–213, 2000.

WU, Z.L.; THOMAS, S.A.; VILLACRES, E.C.; XIA, Z.; SIMMONS, M.L.; CHAVKIN, C.; PALMITER, R.D.; STORM, D.R. Altered behaviour and long-term potentiation in type I adenylyl cyclase mutant mice. **Proceedings in the National Academic Sciences U.S.A.** v.92, p.220–224, 1995.

YAMAMOTO, K.K.; GONZALEZ, G.A.; BIGGS, W.H.III; MONTMINY, M.R. Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. **Nature** v.334, p.494–498, 1988.

YANG, L.; WILLE, E.J.; CORNIER, K.; SMITH, K.; FERRANTE, R.J.; BEAL, M.F. Combination therapy with coenzyme Q10 and creatine produces additive neuroprotective effects in models of Parkinson's and Huntington's disease **J Neurochemistry** v.109, p.1427-39, 2009.

CHANG, Y.C.; HUANG, C.C. Perinatal brain injury and regulation of transcription **Current Opinion in Neurology** v.19, p.141–147, 2006.

ZHANG, W.; NARAYANAN, M.; FRIEDLANDER, R.M. Additive neuroprotective effects of minocycline with creatine in a mouse model of ALS. **Annals of Neurology**, v.53, p.267–270, 2003.

ZOLA-MORGAN, S.; SQUIRE, L.R. Neuroanatomy of memory. **Annual Review of Neuroscience**, v.16, p.547-563, 1993.

ZUGNO, A.I.; SCHERER, E.B.; SCHUCK, P.F.; OLIVEIRA, D.L.; WOFCHUCK, S.; WANNMACHER, C.M.; WAJNER, M.; WYSE, A.T. Intrastratial administration of guanidinoacetate inhibits Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and creatine kinase activities in rat striatum. **Metabolic Brain Disease** v.21, p.41–50, 2006.