

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

**EFEITO AMNÉSICO DA ARCAÍNA DEPENDE DA  
NOVIDADE E DO SISTEMA OPIÓIDE**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Michelle Melgarejo da Rosa**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2012**

# **EFEITO AMNÉSICO DA ARCAÍNA DEPENDE DA NOVIDADE E DO SISTEMA OPIÓIDE**

**por**

**Michelle Melgarejo da Rosa**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da  
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito  
parcial para obtenção do grau de

**Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Maribel Antonello Rubin

Santa Maria, RS, Brasil

2012

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITO AMNÉSICO DA ARCAÍNA DEPENDE DA NOVIDADE E DO  
SISTEMA OPIÓIDE**

elaborada por  
**Michelle Melgarejo da Rosa**

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

Comissão Examinadora

---

Dr<sup>a</sup>. Maribel Antonello Rubin (UFSM)  
(Presidente/Orientadora)

---

Dr<sup>a</sup>. Patrícia Dutra Sauzem (UNICRUZ)

---

Dr. Mauro Schneider Oliveira (UFSM)

Santa Maria, 1 de março de 2012

*Ligia (minha mãe) e*

*Aroldo (meu pai)*

*"Hoje eu queria um abraço daqueles que te sufoca de tão apertado*

*e te protege de tudo"*

*(Caio F. Abreu)*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao apoio incondicional e único de meus pais, que também são meus amigos, seguram minha mão sempre que eu preciso e sempre que eu não preciso. Comemoram comigo minhas vitórias, choram comigo nos meus mais difíceis objetivos. Vocês são minha força e vontade de vencer.

À minha orientadora, professora Dr<sup>a</sup>. Maribel Antonello Rubin, que confiou em mim por todos esses anos na pesquisa. Que me guiou e me aconselhou em todas minhas dúvidas e anseios. Agradeço por ser além de uma orientadora, uma pessoa que podemos conversar e conviver de forma harmoniosa. A você professora, guardarei um carinho imenso e meus profundos eternos agradecimentos.

Ao professor Dr. Carlos Fernando Mello que com suas idéias grandiosas me transmitiu os mais variados conhecimentos e as diferentes visões do mundo da pesquisa que hoje tenho. Admiro seu conhecimento, agradecerei sempre por confiares em mim.

Ao meu namorado Raero Jornada Monteiro que sempre tem palavras certas para me aconselhar, guiar e me ajudar a escolher o melhor caminho. Obrigada por me acalmar, me fortificar, me fazer feliz além de um mundo acadêmico.

Aos meus tios e tias que sempre serão especiais na minha vida, pessoas que tenho imenso orgulho e que de alguma forma quero ter sempre por perto.

Às minhas ajudantes de experimento, Daniela Aymone Ribeiro e Cristiane Signor por estarem sempre dispostas a me ajudar.

Ao grupo da memória que me ajudou a crescer e ampliar meus conhecimentos ao longo desses anos. Em especial ao Gustavo Petri Guerra que não se cansou em sanar minhas dúvidas e me auxiliar em meus questionamentos de vida.

Ao Guilherme Monteiro Gomes que de sua forma nunca hesitou em me ajudar, aconselhar, crescer, mas, principalmente, aprender e me tornar uma melhor cientista com maiores rumos e visões.

Sempre agradecerei a Deus por me apresentar aos meus caminhos na vida.

À CAPES pelo apoio financeiro, permitindo uma melhor execução deste trabalho.

*Das Utopias*

*Se as coisas são inatingíveis... ora!*

*Não é motivo para não querê-las...*

*Que triste os caminhos, se não fora*

*A presença distante das estrelas.*

*(Mario Quintana)*

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica  
Universidade federal de Santa Maria

### **EFEITO AMNÉSICO DA ARCAÍNA DEPENDE DA NOVIDADE E DO SISTEMA OPIÓIDE**

Autora: Michelle Melgarejo da Rosa

Orientadora: Maribel Antonello Rubin

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 01 de março de 2012.

A exposição prévia ao ambiente de treinamento prejudica o efeito amnésico de antagonistas do receptor NMDA, indicando que a presença de novidade é necessária para se observar efeitos amnésicos. Embora haja estudos mostrando que a presença de novidade induz a liberação de opióides endógenos e esses induzem amnésia, nenhum estudo procurou abordar se o efeito amnésico induzido por antagonistas NMDA envolve mecanismos opióides. Neste estudo foi investigado se a manipulação farmacológica do sistema opióide imediatamente após a pré-exposição ao contexto do treino altera o efeito amnésico induzido por arcaína, um antagonista do receptor NMDA. Ratos Wistar machos adultos foram habituados (pré-expostos) ao mesmo contexto de treinamento ou em um contexto diferente ao de treinamento (campo aberto). Imediatamente após a pré-exposição, os animais receberam injeções de salina ou naloxona (0,5 mg/kg, i.p.) ou anticorpo anti-beta endorfina (1:500, i.c.v.). Quarenta e oito horas depois da sessão de pré-exposição, todos os animais foram submetidos ao treino do medo condicionado contextual e imediatamente após o treino foi administrado salina ou arcaína (30 mg/kg, i.p.). A sessão de teste foi realizada vinte e quatro horas após a sessão de treino e a imobilidade do animal foi analisada como um parâmetro de memória de medo dos animais. A pré-exposição ao aparato de treinamento preveniu o déficit de memória induzido pela administração pós-treino de arcaína. A administração de naloxona ou anticorpo anti-beta endorfina imediatamente após a pré-exposição ao aparato de treinamento restabeleceu o efeito amnésico da administração pós-treino de arcaína. Esses resultados sugerem que o efeito amnésico da arcaína depende da novidade e do sistema opióide.

Palavras chave: Pré-exposição. Memória. Medo condicionado. Arcaína. Opióides.



## **ABSTRACT**

Dissertation of Master's degree  
Post Graduation Program in Biology Science: Toxicology Biochemistry  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### **AMNESTIC EFFECT OF ARCAINE DEPENDS ON NOVELTY AND OPIOID SYSTEM**

Author: Michelle Melgarejo da Rosa

Advisor: Maribel Antonello Rubin

Date and place of defense : Santa Maria, March 01<sup>th</sup>, 2012

Previous exposure to the training context disrupts glutamatergic N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAr) antagonist-induced amnesia, indicating that novelty is necessary for such an amnesic effect. While there are reports that novelty-related release of opioids cause amnesia, no study has addressed whether the amnesic effect of NMDAr antagonists involve opioid mechanisms. In this study we investigated whether pharmacological manipulation of the opioid system immediately after context pre-exposure alters the amnesic effect of arcaine, a NMDAr antagonist. Adult male Wistar rats were habituated (pre-exposed) to a fear conditioning training apparatus or to a different context (open field). Immediately after pre-exposure, animals were injected with saline or naloxone (0.5 mg/kg, i.p.) or anti-beta-endorphin antibody (1:500, i.c.v.). Forty eight hours after pre-exposure session, all animals were subjected to fear conditioning acquisition protocol and saline or arcaine (30 mg/kg, i.p.) was administered immediately after training. Testing was carried out 24 h later, and freezing responses due to re-exposure to the training apparatus were recorded. Pre-exposure to the training apparatus prevented the impairment of memory induced by post-training arcaine. Administration of naloxone or anti-beta-endorphin antibody, immediately after pre-exposure to the training apparatus, reinstated the amnesic effect of post-training arcaine. The results suggest that endogenous opioid mechanisms are involved in the pre-exposure-induced loss of the amnesic effect of arcaine.

*Keywords:* Context exposure. Memory. Fear conditioning. Arcaine. Opioids.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
AP5	Ácido D-2-amino-5-fosfonopentanóico
CamKII	Proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina do tipo II
CREB	Proteína ligante do elemento resposnsivo ao AMPc
CS	Estímulo condicionado
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
L-NAME	N <sup>G</sup> -Nitro-L-arginina-metil éster
mRGLU	Receptor Glutamatérgico metabotrópico
MAPK	Proteína ativada por mitógeno
MAT	Metionina adenosiltrasnferase
MK-801	(+)-5-Metil-10,11-diihidro-5H-dibenzo[a,b]-ciclohepteno-5-10-amino
NMDA	N-Metil-D-aspartato
NOS	óxido nítrico sintase
ODC	L-Ornitina descarboxilase
PAF	Fator de agregação plaquetária
PAO	Poliamina oxidase
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
PKG	Proteína quinase dependente de GMPc
PKC	Proteína quinase dependente de cálcio
SAM	S-Adenosil-metionina
SAMDC	S-Adenosil-metionina descarboxilase
SPD	Espermidina
SSAT	Espermidina/espermina N <sup>1</sup> acetil-transferase
US	Estímulo incondicionado

## LISTAS DE FIGURAS

Figura 1- Cascata de eventos que ocorrem na formação da memória.....	25
Figura 2- Representação esquemática do receptor NMDA.....	28
Figura 3- Estrutura química das poliaminas.....	30
Figura 4- Metabolismo das poliaminas.....	31
Figura 5- Estrutura da Arcaína .....	34
Figura 6- Representação esquemática do mecanismo de ação da morfina sobre o receptor $\mu$ -opióide.....	37

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	8
<b>ABSTRACT</b> .....	9
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	10
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	11
<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	13
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	19
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	21
3.1 Memória .....	22
3.2 Mecanismo de formação da memória .....	23
3.3 Medo condicionado .....	25
3.4 Receptor N-Metil-D-Aspartato .....	27
3.5 Poliaminas .....	28
3.6 Metabolismo das poliaminas .....	30
3.7. Poliaminas, receptor NMDA e memória.....	32
3.8 Arcaína.....	33
3.9 Arcaína, receptor NMDA e memória .....	34
3.10 Novidade e receptor NMDA .....	34
3.11 Opióides e memória .....	36
3.12 Opióides e receptor NMDA .....	38
3.13 Opióides e novidade .....	38
<b>4. MANUSCRITO</b> .....	41
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	65
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	67

## **APRESENTAÇÃO**

Na introdução, estão brevemente descritos os temas abordados nesta dissertação. A revisão bibliográfica apresenta diferentes visões acadêmicas para um maior entendimento do tema desta dissertação. Os métodos, resultados e discussão, que fazem parte dessa dissertação, estão apresentados sob forma de manuscrito, aceito para publicação no periódico *Neurobiology of Learning and Memory*. A sessão conclusão apresenta interpretações gerais sobre a mesma. As referências bibliográficas, encontradas ao final desta dissertação, referem-se somente as citações que aparecem na introdução e revisão bibliográfica.

## 1. INTRODUÇÃO

---

## 1. INTRODUÇÃO

O receptor glutamatérgico N-Metil- D-Aspartato (NMDA) desempenha um importante papel em várias funções fisiológicas, tais como plasticidade sináptica, memória e aprendizagem (Schwartz et al., 1996; Whetsell, 1996). A ativação do receptor NMDA tem um importante papel nas fases iniciais da consolidação da memória em testes como esQUIVA INIBITÓRIA (Izquierdo and Medina, 1997; Roesler et al., 2003; Roesler et al., 2005; Cammarota et al., 2008) e medo condicionado (Santini et al., 2001; Burgos-Robles et al., 2007; Camera et al., 2007; Kalisch et al., 2009; Liu et al., 2009; Gomes et al., 2010). Além disso, tem sido demonstrado que a infusão de ácido amino fosfonopentanoico - AP5 -, um antagonista NMDA, imediatamente pós-treino (Izquierdo et al., 1992), assim como, a administração sistêmica do antagonista não competitivo do receptor NMDA, (+)5-Metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,b]-ciclohepteno-5-10-amino (MK-801) imediatamente pós-treino (Ceretta et al., 2008), causam amnésia na tarefa de esQUIVA INIBITÓRIA.

Enquanto que antagonistas do receptor NMDA pioram a memória, agonistas desse receptor, como as poliaminas, por exemplo, são capazes de melhorar a memória.

As poliaminas, putrescina, espermidina (SPD) e espermina, são aminas alifáticas presentes em altas concentrações no sistema nervoso central. Apresentam natureza policatiônica podendo interagir com diversos alvos celulares, incluindo enzimas e ácidos nucleicos, além de exercer ações complexas em uma variedade de canais iônicos (Scott et al., 1993). Evidências indicam que muitos dos efeitos biológicos das poliaminas são devido a interação dessas aminas alifáticas com o receptor NMDA (Coughenour and Barr, 2001; Guerra et al., 2006; Wallace, 2009; Gomes et al., 2010; Guerra et al., 2011; Mariani et al., 2011).

Diferentes estudos demonstram que as poliaminas melhoram a memória e atenuam déficits de memória induzidos por diferentes agentes amnésicos (Shimada et al., 1994; Kishi et al., 1998; Meyer et al., 1998; Rubin et al., 2000; Rubin et al., 2001; Mikolajczak et al., 2002; Rubin et al., 2004; Tadano et al., 2004; Berlese et al., 2005; Camera et al., 2007). A administração sistêmica, intra-hipocampal e intra-amígdala de SPD melhora o desempenho dos animais nas tarefas de esQUIVA INIBITÓRIA (Rubin et al., 2000; Rubin et al., 2001), de medo condicionado (Rubin et al.,

2004; Camera et al., 2007), e facilita a extinção da memória (Gomes et al., 2010). O efeito da SPD no teste de esquiva inibitória ocorre somente nas fases de aquisição e início da consolidação da memória, não ocorrendo nas fases de consolidação final e nem na evocação da memória (Berlese et al., 2005). Esse efeito facilitatório da SPD sobre a memória parece depender da ativação do receptor NMDA (Rubin et al., 2001; Camera et al., 2007) e da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (Guerra et al., 2006), uma vez que o inibidor da enzima NOS previne o efeito facilitatório da SPD sobre a memória de ratos.

É também notável, que os efeitos da SPD sobre a memória são revertidos por baixas doses de arcaína, um antagonista competitivo do sítio de ligação das poliaminas na subunidade NR2B do receptor NMDA (Rubin et al., 2000; Rubin et al., 2001; Rubin et al., 2004; Gomes et al., 2010). A administração sistêmica e intra-amígdala, mas não intra-hipocampal de arcaína piora o desempenho de animais no teste de esquiva inibitória (Rubin et al. 2001, Ceretta et al 2008, Mariani et al 2011) e medo condicionado (Rubin et al., 2004). Arcaína, em doses sem efeito *per se*, reverte a melhora da memória induzida por SPD intra-amígdala no teste do medo condicionado contextual (Rubin et al., 2004) e no teste de esquiva inibitória (Rubin et al., 2001) e intra-hipocampal no teste de esquiva inibitória (Rubin et al., 2000). Além disso, arcaína reverte o aumento da fosforilação da proteína quinase A (PKA) e do aumento da proteína ligante do elemento responsivo ao AMPc (CREB) induzido por SPD na tarefa de esquiva inibitória (Guerra et al., 2011). Por diferentes mecanismos, esses resultados asseguram que a arcaína altera os efeitos facilitatórios da SPD sobre a memória.

A importância do envolvimento do receptor NMDA com a melhora da memória é vista por diferentes linhas de raciocínio (Rubin et al., 2000; Rubin et al., 2001; Rubin et al., 2004; Camera et al., 2007). Arcaína, traxoprodil e ifenprodil, antagonistas da subunidade NR2B do receptor NMDA, revertem a facilitação da extinção da memória induzida por SPD, na tarefa de medo condicionado contextual em ratos (Rubin et al., 2000; Rubin et al., 2004; Gomes et al., 2010). Seguindo a mesma linha de raciocínio, o antagonista não-competitivo do receptor NMDA, MK-801, reverte o efeito facilitador da SPD sobre a memória no teste de esquiva inibitória (Camera et al., 2007). Ceretta e colaboradores (2007) sugerem que MK-801 e arcaína induzem dependência de estado cruzada em ratos, provavelmente pela capacidade dessas



drogas de diminuírem a função do receptor NMDA, piorando a memória. Esses estudos mostram a importância do receptor NMDA para a memória assim como, para a função das poliaminas.

Relatos da literatura indicam que a pré-exposição a um ambiente de treinamento previne o déficit de memória induzido por antagonistas do receptor NMDA. Roesler e colaboradores (1998, 2003, 2005) mostraram que a pré-exposição ao ambiente de treinamento protege do déficit de memória induzido pela infusão de AP5 pós-treino intra-hipocampo em ratos. Além disso, a pré-exposição ao ambiente de treinamento previne o déficit de memória induzido pela injeção sistêmica de MK-801 em camundongos (Shapiro and O'Connor, 1992; Castellano et al., 1999).

Alguns autores sugerem que a pré-exposição ao ambiente de treinamento está relacionada com a diminuição da atenção ou da associabilidade aos estímulos contextuais do treino (Cutler et al., 1975; Pearce and Hall, 1980). Esse déficit de atenção induzido pela pré-exposição ao ambiente de treinamento levaria a uma aquisição de memória defeituosa (Hinderliter and Riccio, 1977; Izquierdo and McGaugh, 1987) a qual, mascararia o efeito amnésico de antagonistas NMDA (Roesler et al., 1998; Izquierdo et al., 1999; Roesler et al., 2003).

Do mesmo modo que antagonistas do receptor NMDA perdem seus efeitos amnésicos quando pré-expostos ao mesmo ambiente de treinamento, estudos mostram que agonistas opióides também apresentam seus efeitos amnésicos preservados pela familiarização com o ambiente de treinamento na tarefa de esQUIVA inibitória (Castellano et al., 1984; Pavone and Castellano, 1985) e medo condicionado contextual (Rudy, 1996a; Rudy et al., 1999). Além disso, a administração de naloxona, um antagonista opióide, após a sessão de pré-exposição, reestabelece o efeito amnésico de agonistas opióides (Izquierdo and McGaugh, 1987).

Estudos mais antigos mostram que frente à novidade, ou seja, frente à exposição a um ambiente novo há liberação de opióides endógenos (Izquierdo and McGaugh, 1985; Netto et al., 1985; Xu et al., 1998), sugerindo que o sistema opióide está envolvido com o comportamento adaptativo para a resposta a novidade.

De forma interessante, e por diferentes maneiras tem sido proposta uma interação entre o sistema opióide e o sistema glutamatérgico (Shapiro and O'Connor,

1992; Castellano et al., 1999; Barros et al., 2003). MK-801 potencializa o déficit de memória induzido por opióides (Cestari and Castellano, 1997) e atenua ou inibe o desenvolvimento de tolerância induzida por morfina, um agonista opióide, quando utilizada para induzir analgesia em ratos (Marek et al., 1991; Trujillo and Akil, 1994). Além do mais, tanto MK-801 (Cestari and Castellano, 1997) como arcaína (Mariani et al., 2011) revertem a dependência de estado induzida pela morfina em ratos.

Considerando a existência de uma interação entre o sistema glutamatérgico e sistema opióide, considerando que há liberação de opióides endógenos frente a novidade e que o efeito amnésico de antagonistas NMDA depende da novidade, a liberação de opióides endógenos induzida pela exposição a novidade poderia estar envolvida com o efeito amnésico de antagonistas do receptor NMDA.

Portanto, neste estudo foi investigado se a manipulação farmacológica do sistema opióide imediatamente após a sessão de pré-exposição ao ambiente de treinamento altera o efeito amnésico da arcaína na tarefa de medo condicionado contextual em ratos.

## **2. OBJETIVOS**

---

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

O objetivo geral do presente estudo é investigar se o efeito amnésico da arcaína depende da novidade e se há envolvimento do sistema opióide neste efeito.

### **2.2 Objetivos específicos**

2.2.1 - Avaliar se o efeito amnésico da arcaína depende da novidade.

2.2.2 - Investigar se a manipulação farmacológica do sistema opióide com naloxona altera o efeito amnésico da arcaína.

2.2.3 - Avaliar o envolvimento de opióides endógenos no efeito amnésico da arcaína.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Memória

Memória é o substrato do nosso ser, o portal da nossa existência. Todas as nossas vivências e ações são dependentes de nossos aprendizados, experiências e lembranças. Não podemos executar tarefas que não sabemos como fazer, nem mesmo comunicar fatos que desconhecemos. A memória molda a personalidade do ser humano, desperta interesse e imaginação (Izquierdo, 2002).

A memória pode ser definida como a aprendizagem, a formação, a conservação e a evocação de informações. A aquisição é também chamada de aprendizagem: só se grava aquilo que foi aprendido. A evocação é também chamada de recordação, lembrança ou recuperação (Bliss and Collingridge, 1993).

Segundo Iván Izquierdo (2002) “Somos aquilo que lembramos e também somos o que decidimos esquecer”. De acordo com nossos hábitos e personalidade, podemos escolher não esquecer as ofensas e as agressões, e nesse caso estaremos propensos a amargura, a paranóia ou ao ressentimento. Podemos também, entretanto, escolher reprimi-las ou extingui-las até que passem a ficar fora do acervo das memórias de uso diário e facilmente acessíveis, mas a nossa disposição caso se torne necessárias, por exemplo, quando for oportuno esquivar-nos ou defender-nos de novas ofensas ou agressões.

As memórias podem ser classificadas em memória declarativa e memória de procedimentos. A memória para fatos e eventos é denominada memória declarativa, que se caracteriza não só pela possibilidade de evocar conscientemente fatos e eventos, mas, sugere também que se possa fazê-lo mediante fala, empregando linguagem complexa, com vocabulário e sintaxe. Estas memórias podem ser formadas e esquecidas com facilidades. As memórias declarativas podem ser divididas em episódicas e semânticas. As memória episódicas se referem a eventos que assistimos ou que participamos, como uma viagem, uma defesa de dissertação de mestrado. De outro modo, a memória semântica se refere a conhecimentos gerais, como saber a população de Santa Maria ou a capital do país, por exemplo (Eichenbaum, 2001; Izquierdo, 2002).

Existem memórias de capacidades ou habilidades motoras ou sensoriais, o que usualmente chamamos de hábitos, denominadas de memórias não-declarativas ou memórias de procedimentos, como por exemplo, cantar ou dançar. São memórias difíceis de “declarar” e normalmente não são evocadas de maneira consciente. A formação de memórias não-declarativas necessita de repetição e prática durante certo período, mas essas memórias têm menor probabilidade de serem esquecidas (Izquierdo and McGaugh, 2000; Izquierdo, 2002).

As memórias também podem ser classificadas quanto ao tempo de retenção em memória imediata, de curta duração, longa duração e memória remota. A memória imediata também é chamada de memória de trabalho, mantém as informações por apenas alguns segundos, não deixando traços ou produzindo arquivos, como por exemplo, a memória de um número de telefone que esquecemos logo após tê-lo digitado. As memórias de curta duração duram pouco tempo (minutos ou 3 a 6 horas), enquanto a memória de longa duração dura meses ou anos, sendo então, armazenada, formando arquivos de memória. Entretanto, se estas memórias durarem muitos meses, anos ou a vida toda passam a ser denominadas de memórias remotas (Milner et al., 1998; Lees et al., 2000; McGaugh and Izquierdo, 2000; Izquierdo, 2002; Ramanan et al., 2005).

### **3.2 Mecanismos da formação da memória**

Os mecanismos de formação da memória são diferentes dos mecanismos de evocação da mesma e envolvem uma miríade de eventos moleculares que ocorrem em locais, estruturas e em tempos diferentes no sistema nervoso central (Abel and Lattal, 2001; Izquierdo et al., 2002).

Para que uma memória seja formada, primeiramente ela deve ser adquirida. Aquisição é o período em que ocorre o aprendizado de uma nova informação. Depois que foi adquirida, essa memória precisa ser armazenada. Denomina-se consolidação o conjunto de processos necessários para passar uma informação recém adquirida de um estado lábil a um estado estável, o que pode durar horas. Durante a fase de consolidação as memórias estão suscetíveis a interferência de outras memórias, de drogas ou outros tratamentos (Izquierdo and McGaugh, 2000).

Após adquirir e armazenar uma memória podemos recordar essa informação originalmente adquirida, sendo esse processo chamado de evocação da memória.

Uma sequência de eventos bioquímicos no hipocampo dos ratos é necessária para a formação de memória (Figura 1). Acredita-se que a seqüência inicial envolva um aumento da liberação de neurotransmissores, principalmente o glutamato (Izquierdo and McGaugh, 2000; McGaugh and Izquierdo, 2000). O glutamato liberado se liga a receptores glutamatérgicos na membrana pós-sináptica como, ácido amino-hidroxi-metil-isoxazol-propiónico (AMPA), receptor NMDA e receptor glutamatérgico metabotrópico (mGlu), provocando um aumento da concentração de cálcio intracelular ( $[Ca^{2+}]$ ). Este aumento na  $[Ca^{2+}]$ , somado aos efeitos da ativação de proteínas G pelos receptores glutamatérgicos metabotrópicos, ativa uma série de enzimas, tais como proteínas quinase dependente de cálcio/calmodulina tipo II (CaMKII – atua fosforilando e ativando os receptores AMPA) e proteínas quinase dependentes de monofosfato cíclico de guanosina – GMPc - (PKG). Ativação de PKG irá liberar substâncias como óxido nítrico, monóxido de carbono e fator de agregação plaquetária (PAF) as quais aumentam ainda mais a liberação de glutamato. A proteína quinase dependente de cálcio (PKC), também atua neste processo, fosforilando a proteína do terminal axônico, GAP-43, que leva a liberação de mais glutamato. Passadas 3 a 4 horas, são ativadas as proteínas quinase dependentes de monofosfato cíclico de adenosina – AMPc - (PKA) e as proteínas ativadas por mitógeno (MAPK). Estas, juntamente com a PKC, irão fosforilar fatores de transcrição protéicos no núcleo como a CREB, que ativa vários *loci* gênicos e induz a síntese de diversas proteínas, aumentando assim a efetividade de transmissão de informação entre os neurônios (Bliss and Collingridge, 1993; Izquierdo and Medina, 1995, 1997; Izquierdo and McGaugh, 2000; Izquierdo, 2002; Liu et al., 2011; Xiaoping et al., 2011). Tais alterações entre os neurônios têm sido denominada “plasticidade sináptica” (Izquierdo and McGaugh, 2000; McGaugh and Izquierdo, 2000; Izquierdo et al., 2002).



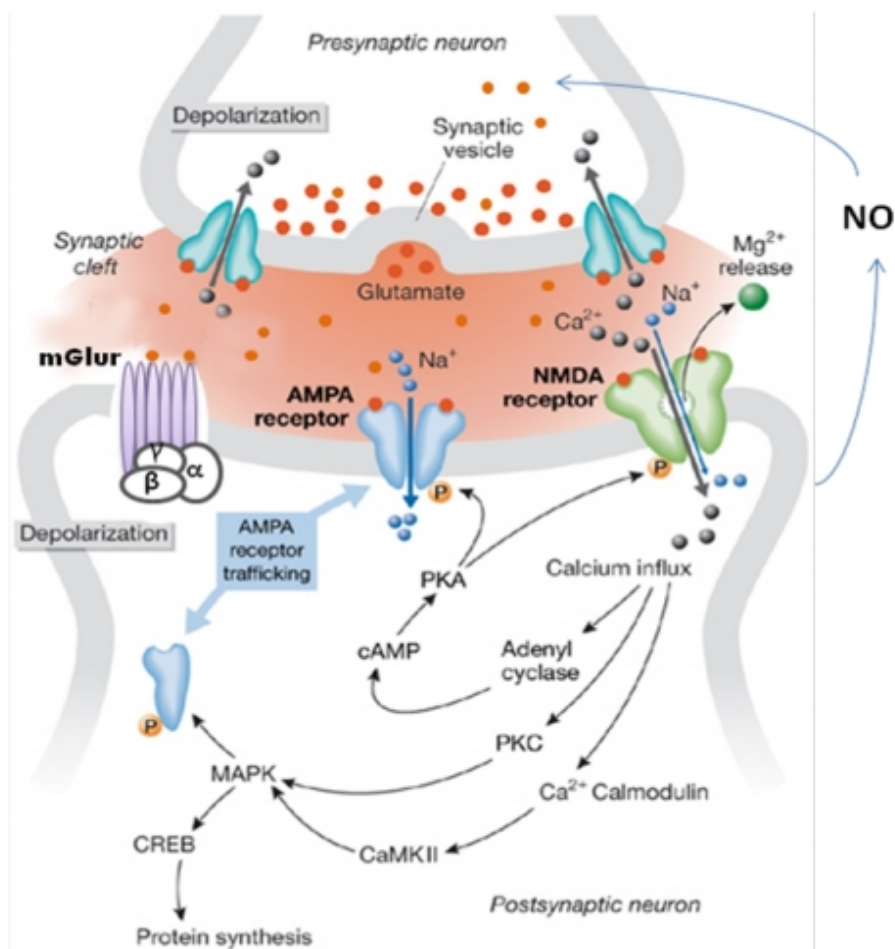


Figura 1- Cascata de eventos envolvidos na formação da memória (Voglis and Tavernarakis, 2006).

### 3.3 Medo condicionado contextual

Pesquisas envolvendo a memória emocional em animais empregam tarefas de aprendizagem com estímulos aversivos como ferramentas experimentais para entender as bases da aquisição e consolidação da memória. Entre as tarefas de aprendizado, medo condicionado e esquiva inibitória (ou esquiva passiva) são os mais empregados (Hartley et al., 2011).

O medo condicionado é um dos paradigmas mais estudados para avaliar a base neural da memória emocional, envolve o condicionamento Pavloviano de um estímulo aversivo (normalmente um choque fraco sendo considerado o estímulo incondicionado – US) com associação a um estímulo neutro (estímulo condicionado – CS). O estímulo neutro deve ser mais discreto como uma luz ou tom ou mesmo o

contexto a que o animal é submetido quando exposto ao US. Quando o CS for o contexto, o condicionamento Pavloviano recebe a denominação de medo condicionado contextual (Hartley et al., 2011). As respostas evocadas frente à associação do CS-US englobam uma série de mudanças comportamentais como: alterações autonômicas, tais como, aumento da frequência cardíaca e pressão arterial (Iwata and LeDoux, 1988), neuroendócrinas, como a liberação dos hormônios adrenocorticotrófico e corticosterona (Guijarro et al., 2007) e comportamentais como vocalizações ultrassônicas (Holmstrom et al., 2007), sobressalto e “freezing” ou congelamento (Davis et al., 1986; Fendt and Fanselow, 1999).

O circuito que envolve a tarefa de medo condicionado envolve ativação do receptor NMDA na amígdala e no caso do medo condicionado contextual, ativação do receptor NMDA no hipocampo (Fanselow et al., 1991; Schenberg et al., 2005; Kim and Jung, 2006; Hartley et al., 2011), essa ativação parece ser essencial para a consolidação da memória na tarefa de medo condicionado contextual (Santini et al., 2001; Burgos-Robles et al., 2007; Camera et al., 2007; Kalisch et al., 2009; Liu et al., 2009; Gomes et al., 2010).

O medo é uma resposta emocional adaptativa que é evocada por um estímulo perigoso. Entre outras funções, o medo serve para organizar respostas semânticas e autonômicas (ex. Imobilidade do animal) e ações motivadas (ex. escape de um estímulo aversivo) no momento em que o animal está sendo ameaçado (Maren et al., 2001). Em vista disso, a ocorrência da consolidação da memória formada a torna mais duradoura (Abel and Lattal, 2001), de forma que memórias de medo podem persistir por meses, anos ou até por toda vida (Maren, 2005).

As respostas emocionais a situações aversivas, constrangedoras ou ameaçadores são bastante comuns em seres humanos e possuem grande importância para os indivíduos. No entanto, em certos momentos elas podem se tornar exageradas ou começarem a ocorrer em situações inapropriadas, caracterizando um distúrbio de ansiedade, tal como o Transtorno de Estresse Pós-Traumático (LeDoux, 1998). Assim, o condicionamento Pavloviano ou medo condicionado pode ser utilizado para investigar, além dos mecanismos de aprendizado e memória, as origens dos distúrbios relacionados ao medo em humanos (Kim and Jung, 2006)

### 3.4. Receptor N-metil-D-Aspartato – NMDA

O receptor NMDA, um subtipo de receptor glutamatérgico, medeia a neurotransmissão excitatória e deste modo, desempenha papel chave para mecanismos de plasticidade sináptica, memória e aprendizado (Monaghan and Cotman, 1985; Bonaccorso et al., 2011; Do et al., 2011; Flores-Soto et al., 2011).

Esse receptor, assim como os outros receptores glutamatérgicos, apresenta diferentes sítios de ligação para compostos endógenos e exógenos que podem ativar ou inibir o receptor NMDA quando ligados a ele (Figura 2). Dentre os principais agonistas do receptor NMDA se destaca: glutamato, glicina (co-agonista) e poliaminas. Como antagonista, AP-5, e MK-801 são farmacologicamente considerados os mais importantes (Monaghan and Cotman, 1985; Ransom and Stec, 1988; Jackson et al., 1992; Cestari and Castellano, 1997; Quevedo et al., 1997; Meyer et al., 1998; Castellano et al., 1999; Castellano et al., 2001a; Mikolajczak et al., 2002; Ceretta et al., 2008; Liu et al., 2009; Bonaccorso et al., 2011; Hedegaard et al., 2011; Raymond et al., 2011).

O receptor NMDA é formado por diferentes subunidades: NR1 (A-G), NR2 (A-D) e NR3 (A-B) que agrupadas formam um canal iônico com condutância seletiva de íons cálcio, sódio e potássio através da membrana neuronal (Monyer et al., 1992; Hedegaard et al., 2011; Flores-Soto et al., 2012). Quando o receptor está em repouso, íons de  $Mg^{2+}$  ficam ligados a um sítio dentro do canal iônico impedindo assim o influxo de  $Ca^{2+}$ . O canal só é ativado quando 3 fatores ocorrem simultaneamente: 1) ligação do neurotransmissor glutamato na subunidade NR2B; 2) ligação de glicina (co-agonista obrigatório) na subunidade NR1; e 3) despolarização da membrana pós-sináptica. Estes três fatores provocam uma mudança na conformação alostérica do receptor diminuindo a afinidade pelo  $Mg^{2+}$  que é deslocado, permitindo assim o influxo de íons  $Ca^{2+}$  e  $Na^+$  bem como o efluxo de  $K^+$ . A ativação do receptor NMDA é voltagem dependente e ocorre através de receptores AMPA que estão localizados ao lado de receptores NMDA. Quando ativado, o receptor NMDA age no sentido de aumentar ainda mais a despolarização iniciada pelos receptores AMPA. Esse aumento de íons cálcio no meio intracelular, é extremamente importante para que mensageiros intracelulares possam ativar muitas

enzimas, envolvidas na consolidação da memória (Kerchner and Nicoll, 2008; Newpher and Ehlers, 2009).

De forma notável, a super ativação do receptor NMDA está relacionada com uma variedade de estados patológicos, incluindo doenças neurológicas causadas por excitotoxicidade neuronal como, lesão aguda como isquemia, trauma, epilepsia e estados crônicos degenerativos como a doença de Huntington, Alzheimer, transtornos psiquiátricos e síndrome de dor neuropática devido a excitotoxicidade induzida por esse receptor (Egerton et al., 2011; Hu et al., 2011; Nicholson et al., 2011; Raymond et al., 2011; Salmina et al., 2011; Salter and Pitcher, 2011; Xiaoping et al., 2011).

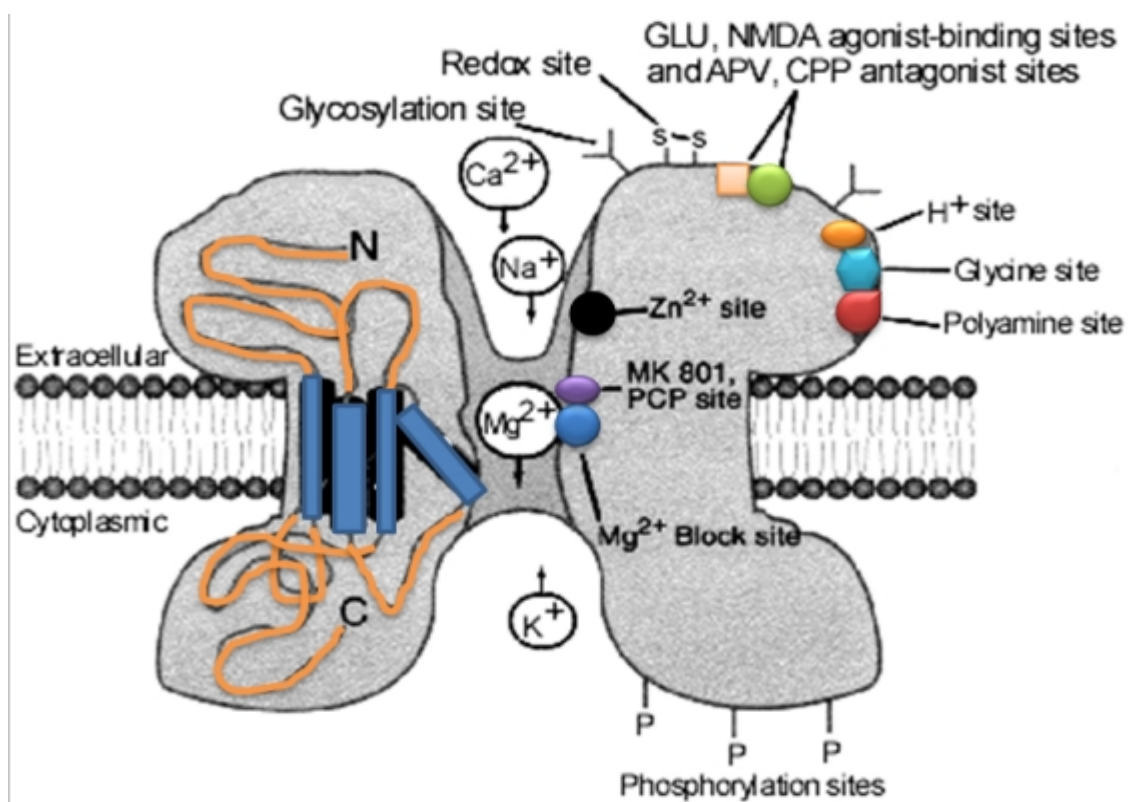


Figura 2- Representação esquemática do receptor NMDA (Zigmond MJ, 1999).

### 3.5. Poliaminas

As poliaminas putrescina, espermidina (SPD) e espermina, são um grupo de aminas alifáticas presentes em quase todas as células incluindo células procarióticas, eucarióticas, plantas e animais (Thomas and Thomas, 2001). Desde o

seu descobrimento, por Antoni van Leeuwenhoek em 1678, até o recente desenvolvimento de camundongos transgênicos expressando enzimas que alteram os níveis de poliaminas de maneira tecido-específica, o estudo de poliaminas aprofundou o conhecimento de diversos processos fisiológicos e patológicos.

Essas aminas alifáticas estão amplamente distribuídas no sistema nervoso central, sendo encontradas principalmente em regiões do encéfalo como: hipotálamo, bulbo, hipocampo e cerebelo. A SPD é a poliamina que aparece em mais alta concentração (hipocampo: putrescina 7,1 nmol/g; espermidina 420 nmol/g; espermina 334 nmol/g) (Seiler and Lamberty, 1975).

Quanto a caracterização estrutural das poliaminas sabe-se que a putrescina é uma di-amina primária (1,4 – diaminobutano), espermidina é uma tri-amina (mono-N-3-aminopropil-1,4-diaminobutano) e a espermina é uma tetra-amina (bis-N-3-aminopropil-1,4-diaminobutano) (Figura 3) (Teti et al., 2002). Estas aminas alifáticas simples são conectadas por átomos de nitrogênio e possuem respectivamente uma, duas ou três cadeias carbonadas flexíveis (Carter, 1994; Williams, 1997a).

Devido à sua carga positiva, estes compostos podem se ligar a várias macromoléculas, como o DNA e RNA, proteínas e lipídios de membrana (HM, 2003; Ruiz-Chica et al., 2003; Ouameur et al., 2004). Em vista disso, as poliaminas estão relacionadas com processos celulares incluindo, a regulação de tradução e expressão de gene, a proliferação celular, morte celular por apoptose, a modulação da sinalização e estabilização da membrana da célula (Tabor and Tabor, 1984; Igarashi and Kashiwagi, 2000; Thomas and Thomas, 2001; HM, 2003; Seiler and Raul, 2005).

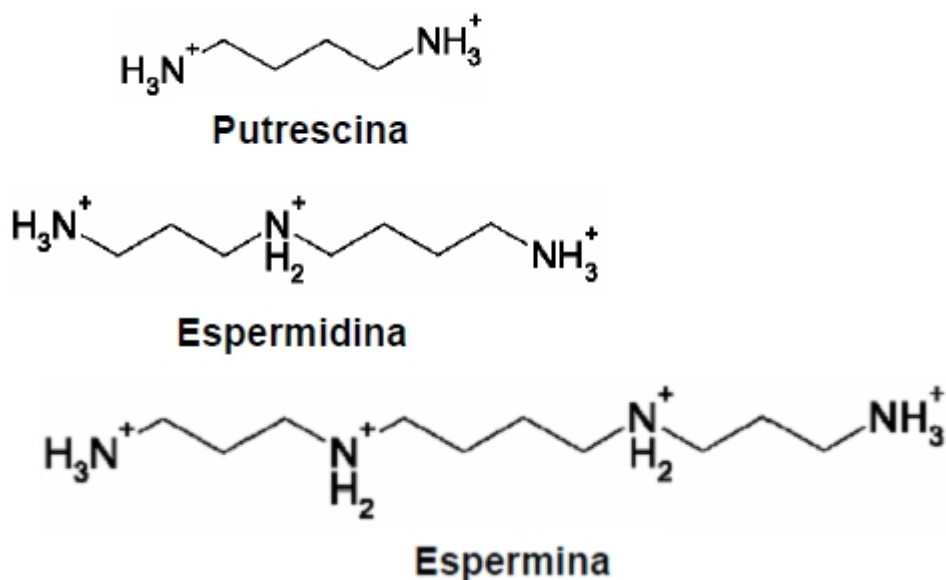


Figura 3- Estrutura química das três poliaminas endógenas (Kalac P, 2005).

### 3.6. Metabolismo das poliaminas

As principais fontes de poliaminas são a síntese no próprio organismo e o metabolismo de aminoácidos provenientes da alimentação por bactérias do trato gastrointestinal (Teti et al., 2002). Uma noção geral do metabolismo das poliaminas pode ser vista na Figura 5. As poliaminas são sintetizadas inicialmente através da conversão de ornitina, originária do ciclo da uréia, em putrescina, sendo essa reação catalizada pela ornitina descarboxilase, uma enzima limitante na síntese de poliaminas (Morgan, 1999). Células que não possuem o ciclo da uréia completo ainda assim, possuem arginase, enzima capaz de clivar o grupo guanidino da arginina, formando putrescina (Pegg and McCann, 1982). SPD é formada a partir de putrescina pela adição de um grupamento aminopropil doado pela S-Adenosilmetionina descarboxilada, em uma reação catalizada pela SPD sintase. A catalização pela espermina sintase de outro grupamento aminopropil a SPD, forma a espermina, e a fonte deste grupamento aminopropil é uma segunda molécula de S-adenosilmetionina descarboxilada (Marton and Pegg, 1995).

A espermina e a SPD podem ser convertidas em SPD e putrescina respectivamente, na rota de interconversão dentro do ciclo das poliaminas. Estas reações dependem da formação de intermediários N-acetilados, N1-acetilespermina

e N1 acetilespermidina, por ação das enzimas SPD/espermina N1 acetiltransferase. A seguir, a enzima poliamina oxidase rompe as ligações C-N entre os resíduos aminopropil e os grupos amino secundário para formar SPD e putrescina respectivamente. (Marton and Pegg, 1995). Estas reações de acetilação são fisiologicamente importantes pois, são uma maneira da célula diminuir a interação das poliaminas com diferentes poliânions. Um aumento ou diminuição na excreção de poliaminas acetiladas é um dos mecanismos de controle das concentrações intracelulares de poliaminas (Morgan, 1999; Moinard et al., 2005).

As três enzimas que regulam a biosíntese de poliaminas são ornitina descarboxilase, S-adenosilmetionina descarboxilase e espermidina/espermina N-acetiltransferase. A atividade destas enzimas irá regular os três passos do metabolismo das poliaminas: síntese, rota de interconversão e catabolismo (Morgan, 1999; Seiler, 2004; Seiler and Raul, 2005).

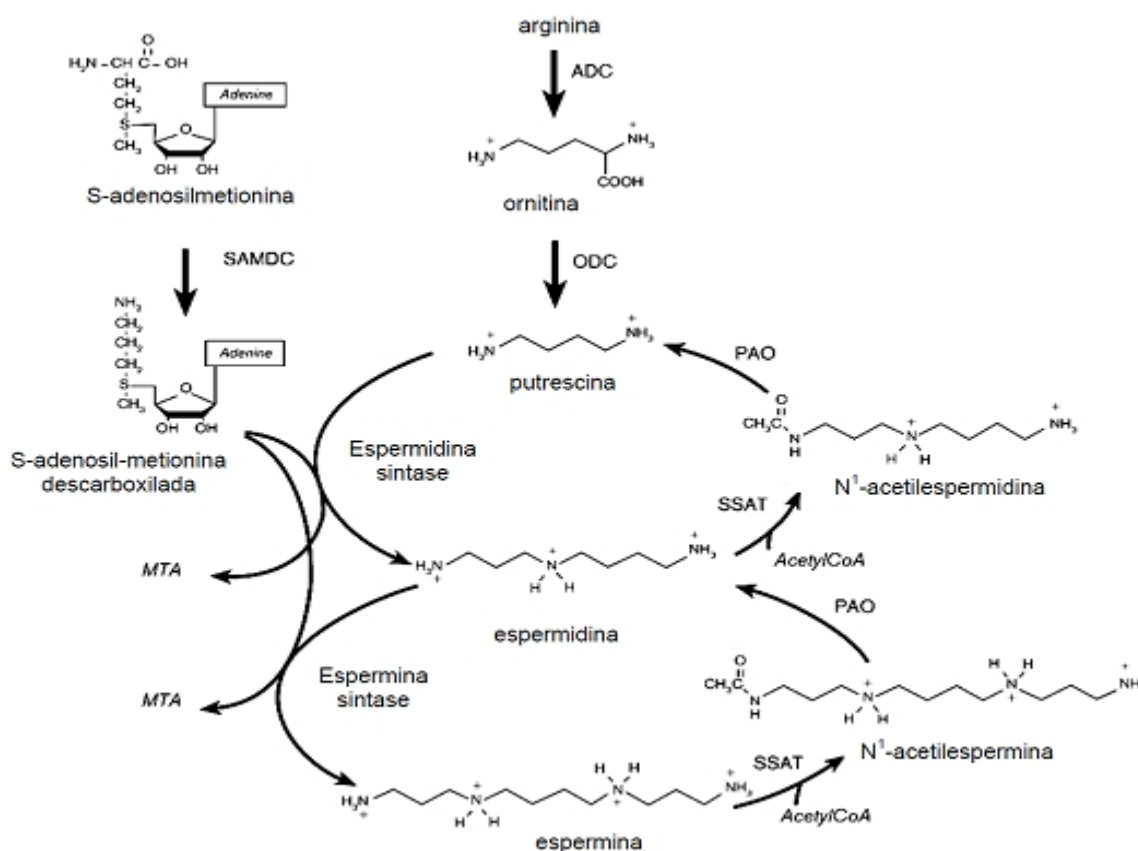


Figura 4 - Metabolismo das poliaminas. Arginina descarboxilase (ADC); ornitina descarboxilase (ODC); S-adenosil-metionina descarboxilase (SAMDC); espermidina/espermina N1acetil-transferase (SSAT); poliamina oxidase (Mony et al.); metiltioadenosina (MTA) (Urdiales JL, 2001).

O catabolismo das poliaminas ocorre através de reações de desaminação oxidativa, pela ação de amino-oxidases dependentes de cobre. Pela desaminação oxidativa do grupamento amino primário, cada intermediário da interconversão pode ser transformado em um aldeído, que é posteriormente oxidado em um aminoácido ou em um grupamento gama-lactâmico. Os produtos finais do catabolismo bem como poliaminas acetiladas são excretadas por via renal (Gugliucci, 2004; Seiler, 2004).

### 3.7. Poliaminas, receptor NMDA e memória

As poliaminas são importantes moduladores de alguns canais iônicos, podendo interagir com subtipos específicos de canais de potássio e receptores glutamatérgicos, entre eles o NMDA (Burban et al., ; Williams, 2009; Gomes et al., 2010; Masuko et al., 2010; Mony et al., 2011).

Ranson e Stec (Ransom and Stec, 1988) mostraram que SPD e espermina aumentam a afinidade do receptor NMDA pelo [<sup>3</sup>H]MK-801, efeito constatado na presença ou ausência de concentrações saturantes de glutamato e glicina, mostrando que o efeito estimulatório das poliaminas deve-se a sua ligação com o receptor NMDA (Ransom and Stec, 1988). Entretanto, sabe-se que apenas baixas concentrações de SPD e espermina são efetivas em aumentar a ligação do MK-801 ao receptor NMDA. Deste modo, a ligação de SPD e espermina no receptor NMDA se caracteriza por uma curva de concentração-resposta bifásica, ou seja, apenas baixas concentrações de SPD ou espermina são capazes de ativar o receptor NMDA (Rock and Macdonald, 1995; Williams, 1997b).

Existem vários estudos mostrando o envolvimento das poliaminas em processos de aprendizado e memória, tanto melhorando a memória de ratos em distintas tarefas, como atenuando o déficit de memória induzido por diferentes agentes amnésicos (Shimada et al., 1994; Kishi et al., 1998; Meyer et al., 1998; Rubin et al., 2000; Rubin et al., 2001; Mikolajczak et al., 2002; Rubin et al., 2004; Tadano et al., 2004; Berlese et al., 2005; Camera et al., 2007; Gomes et al., 2010; Guerra et al., 2011).

Sabe-se que a administração sistêmica, intrahipocampal e intra-amígdala de SPD melhora o desempenho de ratos na tarefa de esQUIVA inibitória (Rubin et al.,



2000; Rubin et al., 2001; Guerra et al., 2006). Além disso, a administração intrahipocampal e intra-amígdala de SPD melhora a memória de animais no teste de medo condicionado (Rubin et al., 2004; Camera et al., 2007) e ainda, a administração intrahipocampal de SPD facilita a extinção do medo condicionado contextual em ratos (Gomes et al., 2010). Essa modulação positiva da SPD sobre a memória no teste de esquiva inibitória parece ocorrer somente nas fases de aquisição e início da consolidação da memória, não ocorrendo na fase final da consolidação e nem na evocação da memória (Berlese et al., 2005).

Guerra et al (2006) mostrou que SPD aumenta os níveis de nitratos e nitritos no hipocampo de ratos, e a co-administração de L-NAME previne este efeito. Deste modo, o efeito facilitatório da espermidina sobre a memória também parece depender da atividade da enzima óxido nítrico sintase hipocampal, uma vez que, a administração intra-hipocampal de NG-Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), um inibidor não específico da enzima óxido nítrico sintase, imediatamente após o treino na tarefa de esquiva inibitória, previne a melhora da memória causada por SPD (Guerra et al., 2006).

### **3.8. Arcaína**

A arcaína é um análogo das poliaminas, possuindo estrutura semelhante a estas, é composta por uma cadeia carbonada, a qual está conectada por átomos de nitrogênio. Ela também apresenta grupamentos amino nas extremidades da cadeia carbonada, além de conter uma molécula de ácido sulfúrico. Sendo assim, a arcaína é um sulfato 1,4-diguanidinobutano como mostrado na figura 4 (Reynolds, 1990).

Estudos mostram que a arcaína provoca o deslocamento da curva da ligação da dizocilpina (MK-801) produzida pela espermidina para a direita o que sugere que a arcaína é um antagonista competitivo das poliaminas no receptor NMDA (Sacaan and Johnson, 1990; Lynch DR, 1995).

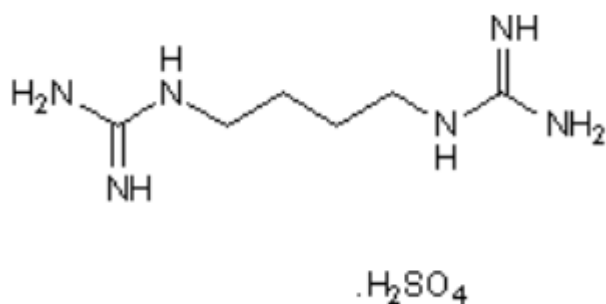


Figura 5 - Estrutura da arcaína (Reynolds, 1990).

### 3.9 Arcaína, receptor NMDA e memória

Estudos mostram o efeito da arcaína sobre a memória. A administração sistêmica e intra-amígdala, mas não intra-hipocampal de arcaína piora o desempenho de animais no teste de esQUIVA inibitória (Camera et al., 2007) e medo condicionado (Rubin et al., 2004) em ratos. Além disso, a administração de doses sem efeito *per se* de arcaína em ratos intra-amígdala no teste de esQUIVA inibitória (Rubin et al., 2000) e medo condicionado contextual (Rubin et al., 2004), reverte a melhora da memória induzida por SPD. Sabe-se ainda que a administração de arcaína intrahipocampal reverte o aumento da fosforilação da PKA (Guerra et al., 2011), PKC (dados não publicados) e CREB induzido por SPD no encéfalo de ratos submetidos a tarefa de esQUIVA inibitória (Guerra et al., 2011).

Sendo a arcaína um antagonista competitivo do sítio das poliaminas do receptor NMDA, ela pode ser utilizada como uma importante ferramenta experimental para avaliar a função do receptor NMDA em testes de memória e aprendizagem.

### 3.10 Novidade e receptor NMDA

Novidade provoca um aprendizado motivacional que promove a codificação da memória e modifica as respostas comportamentais (Sokolov, 1963; Knight, 1996; Mesulam, 1998; Lisman and Grace, 2005; Boehler et al., 2011). A presença da novidade induz uma rápida habituação àquele ambiente ou situação, gerando uma resposta diminuída nas sucessivas exposições frente ao novo ambiente ou a nova situação (Netto et al., 1985; Cahill et al., 1986; Izquierdo and Pereira, 1989).

Estudos relatam que uma simples exposição de um animal a uma nova situação ou ambiente, sem estresse, pode ter profundos efeitos modulatórios sobre a memória (Izquierdo et al., 1999). Quando a exposição à novidade ocorre em uma hora ou menos após o treino, ela é considerada amnésica, entretanto, quando ocorre entre zero e duas horas antes do teste, a exposição à novidade facilita a evocação da memória (Roesler et al., 1998; Izquierdo et al., 1999; Roesler et al., 2003).

Como outras formas de aprendizado, as fases iniciais da formação da memória para um ambiente novo requerem a ativação do receptor NMDA pós-treino (Izquierdo et al., 1992).

Tem sido demonstrado que o envolvimento do receptor NMDA na memória pode depender da familiaridade com contextos envolvendo o ambiente de treinamento em tarefas que avaliam a memória. Assim, a administração intra-cérebro-ventricular (i.c.v.) de AP5, um antagonista do receptor NMDA, prejudica a memória de trabalho no teste do labirinto radial de oito braços em ratos pré-expostos a um contexto diferente do treino (novidade), mas não prejudica a memória em ratos previamente expostos ao mesmo contexto do treino (Caramanos and Shapiro, 1994). Na mesma linha de raciocínio, Roesler e colaboradores (1998 e 2003) também sugerem que a familiarização com o ambiente do treino poderia proteger contra os efeitos amnésicos do antagonista do receptor NMDA, como AP5, por exemplo.

Alguns estudos sugerem que essa prevenção de efeitos amnésicos dos antagonistas do receptor NMDA pela familiarização ao contexto é devido a uma diminuição da associação entre o estímulo condicionado (CS, contexto, por exemplo) e estímulo incondicionado (US, choque, por exemplo) uma vez que, o animal foi pré-exposto ao mesmo ambiente de treinamento, mas com a ausência do US. Logo, o animal poderia não associar ou associar menos o CS ao US (Roesler et al., 1998; Roesler et al., 2003; Roesler et al., 2005). Outros trabalhos mostram que essa alteração da resposta é decorrente de uma interferência na aquisição do CS (Miller et al., 1986; Bouton, 1993), sugerindo que, com a pré-exposição ao mesmo ambiente de treinamento ocorra um déficit na aquisição da memória e assim, esse déficit poderia mascarar o efeito amnésico de antagonistas do receptor NMDA (Izquierdo and McGaugh, 1985, 1987; Roesler et al., 1998; Roesler et al., 2003).

Há uma relação funcional entre novidade e mecanismos de recompensa por influência dopaminérgica do mesencéfalo. Destaca-se assim, uma relevância biológica da novidade como um motivador (Schultz, 1998; Kakade and Dayan, 2002) e/ou um estímulo de reforço em ratos (Reed et al., 1996) e em humanos (Duzel et al., 2010). Quando os animais já estão habituados ao ambiente ou a uma situação, observa-se uma motivação diminuída e isto poderia explicar porque a pré-exposição ao mesmo ambiente de treinamento levaria a um decréscimo na associabilidade ou diminuição na atenção ao estímulo condicionado (Cutler et al., 1975; Pearce and Hall, 1980).

Por mais que se possam encontrar diferentes abordagens, ainda assim, não é possível um completo esclarecimento do por que antagonistas NMDA deixam de ser amnésicos quando os animais são pré-expostos ao mesmo ambiente ou situação de treinamento. Deste modo, diferentes estudos são necessários para um maior esclarecimento desse aspecto.

### **3.11. Opióides e memória**

O sistema opióide tem sido implicado na modulação da memória, em condições estressantes. Em animais, a retenção de uma experiência que envolve um estímulo aversivo (um choque, por exemplo) pode ser prejudicada por agonistas opiáceos e reforçada por antagonistas opiáceos administrados logo após o treino (Izquierdo, 1979; Izquierdo et al., 1989; Netto et al., 1989; Cestari and Castellano, 1997; Zarrindast et al., 2006e). Desta maneira, a ativação farmacológica do sistema opióide é geralmente considerada prejudicial para a memória.

Os receptores opióides pertencem a uma família de receptores acoplados a proteína G. Existem quatro subtipos de receptores opióides: Mu ( $\mu$  ou MOR), Delta ( $\delta$  ou DOR), Kappa ( $\kappa$  ou KOR), e o receptor ORL1 (Bodnar, 2009). A morfina por exemplo, um agonista opióide, se liga a receptores MOR. Este está acoplado a uma proteína G inibitória ( $G_i$ ), quando ativado pela ligação do agonista morfina, diminui a fosforilação induzida pelo AMPc, inibe canais de cálcio enquanto ativa canais de potássio (figura 6), induzindo uma hiperpolarização na célula e, com isso, prejudicando a memória (Ueda, 1989; Feng et al., 2011; Taylor, 2011).

A administração de morfina e outros agonistas opióides prejudicam a memória na tarefa de esquivar inibitória (Izquierdo, 1979; Castellano et al., 1984; Izquierdo and McGaugh, 1985; Castellano et al., 1989; Castellano et al., 1993; Castellano et al., 1999; Mariani et al., 2011), medo condicionado (Rudy et al., 1999) e labirinto aquático de Morris (Hepner et al., 2002). Ainda, Naloxona, um antagonista não seletivo dos receptores opióide, facilita a memória quando administrada pós-treino e reverte o déficit de memória induzido por agonistas opióides (Castellano et al., 1989). De maneira interessante, quando se administra morfina pós-treino e pré-teste, a administração de morfina pré-teste reverte o efeito amnésico causado pela administração de morfina pós-treino, caracterizando dependência de estado da morfina (Hill et al., 1971; Oishi et al., 1988; Siegel, 1988; Shiigi and Kaneto, 1990; Frussa-Filho and Ribeiro Rde, 2002; Zarrindast et al., 2006b; Zarrindast et al., 2006e; Zarrindast et al., 2006a; Zarrindast et al., 2006c; Zarrindast et al., 2006d; Mariani et al., 2011).

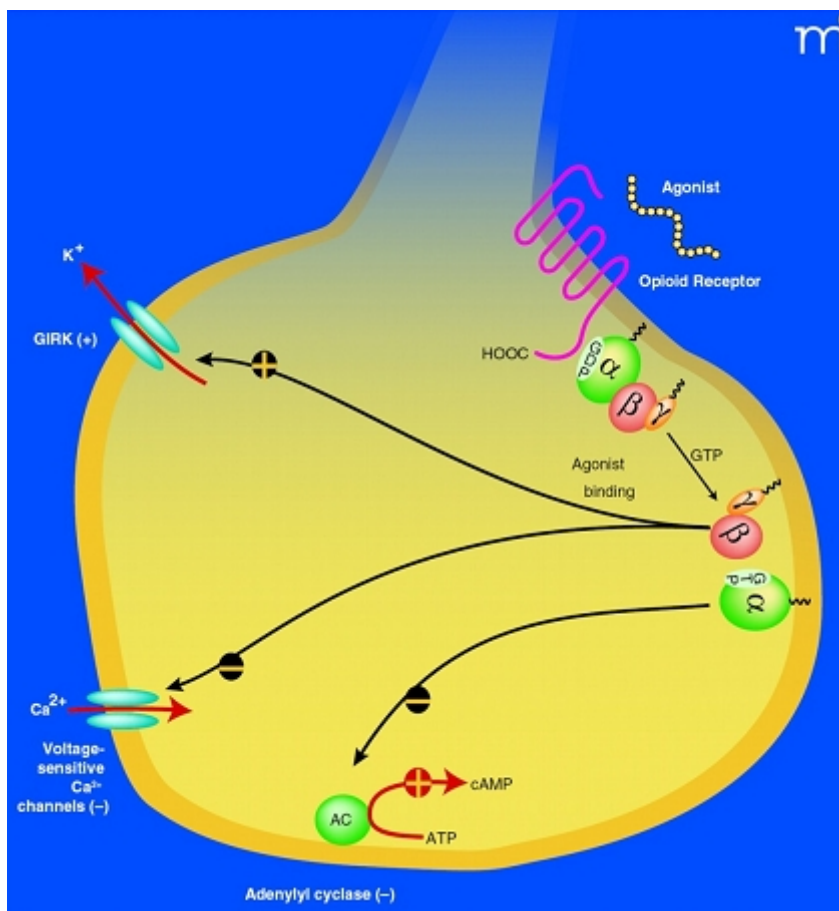


Figura 6 - Representação esquemática do mecanismo de ação da morfina sobre o receptor  $\mu$ -opiáceo (Inibição fosforilação AMPc;  $Ca^{2+}$  - canais de Cálcio;  $K^+$  - Canais de potássio) (Kreek MJ, 2007).

A memória também pode ser modulada por opióides endógenos. Estes peptídeos endógenos são produzidos naturalmente no corpo, incluindo endorfina, encefalina e dinorfina (Okada et al., 2002). A endorfina é expressa em células no núcleo arqueado do hipotálamo e no tronco cerebral, e atua através dos receptores  $\mu$ -opióides (Zadina et al., 1999; Kowarik et al., 2011). A encefalina é amplamente distribuída pelo cérebro e age através dos receptores  $\mu$  e  $\delta$ -opióides. A dinorfina age através de receptores  $\kappa$ -opióide e é encontrada na medula espinhal e em muitas partes do cérebro, incluindo o hipotálamo (Okada et al., 2002). Estes peptídeos têm sido implicados na modulação farmacológica endógena do sistema opioide, alterando sistemas de neurotransmissores, tarefas de memória, e hábitos do cotidiano (Zadina et al., 1999; Okada et al., 2002; Kowarik et al., 2011).

### **3.12 Opióides e receptor NMDA**

Diferentes estudos mostram o envolvimento do receptor opióide com o receptor NMDA. Castellano e colaboradores (1997) mostraram que a administração do antagonista do receptor NMDA, MK-801, potencializa o efeito amnésico induzido pela morfina na tarefa de esquiva inibitória. Na mesma linha de raciocínio, Mariani e colaboradores (2011) provaram que morfina reverte o déficit de memória induzido por arcaína assim como, arcaína reverte o déficit de memória induzida pela morfina em ratos no teste de esquiva inibitória sugerindo a existência de uma dependência de estado cruzada entre o sistema glutamatérgico e opióide. Além disso, Naltrexona, antagonista opióide, reverte o déficit de memória induzido por MK-801 na tarefa de esquiva inibitória (Castellano et al., 1999) e ainda, MK-801 inibe a dependência de estado induzida por diferentes agonistas opióides (Zarrindast et al., 2006c).

A partir dos exemplos acima, verifica-se que a literatura sugere algum envolvimento entre o sistema opióide e o sistema glutamatérgico via receptor NMDA.

### **3.13 Opióides e novidade**

Estudos mostram que os hormônios liberados normalmente frente a novas experiências e em ocasiões estressantes estão entre os agentes químicos que

influenciam a consolidação da memória. Entre eles estão os opióides endógenos como a  $\beta$ -endorfina, por exemplo (Izquierdo and McGaugh, 1987).

De forma interessante, semelhante ao que ocorre com antagonistas do receptor NMDA a literatura indica que a familiarização com o ambiente de treinamento diminui ou anula o efeito amnésico induzido por morfina e por tifuladom, um agonista K-opióide no teste de esquiva inibitória (Castellano et al., 1984) e de morfina no teste de medo condicionado (Rudy, 1996a, b). De fato, Rudy e colaboradores (1999) tentam explicar o porquê desse efeito dos opióides e sugerem que a tarefa de medo condicionado contextual depende de dois processos independentes: a) construção de uma representação única para as características do contexto e b) associa essa representação com o estímulo aversivo, o choque. Deste modo, opióides poderiam modular o processo de consolidação da memória contextual e assim, responder de forma diferente frente a pré-exposição ao contexto de treinamento.

Antigos estudos de Izquierdo e McGaugh (1985, 1987), abordam a importância de opióides na memória e a influência de opióides para a novidade. Mostrou-se que durante a presença de novidade, ou seja, quando animais (Izquierdo and McGaugh, 1987; Xu et al., 1998) e seres humanos (Chaves et al., 1988) são expostos a um ambiente novo, ocorre liberação de opióides endógenos (Izquierdo and McGaugh, 1985; Netto et al., 1985; Xu et al., 1998). Este efeito é apenas observado quando animais são submetidos às tarefas pela primeira vez. Como não está relacionado a nenhuma forma específica de aprendizagem, presença de dor durante o treino, ou ao nível de estresse/ excitação associados com cada tarefa, nem com o requerimento de sua resposta, essa liberação de opióides endógenos é considerada como uma resposta à novidade, marcando uma informação como nova (Izquierdo and McGaugh, 1985; Netto et al., 1985). A administração de naloxona ou naltrexona bloqueia o efeito de opióide endógenos liberados frente à presença de novidade, sugerindo então que o sistema opióide estaria envolvido no comportamento adaptativo da novidade (Izquierdo and McGaugh, 1985).

Deste modo, como o sistema opióide está envolvido no comportamento adaptativo à novidade, de alguma forma, esse sistema poderia estar relacionado com a falta de efeitos amnésicos dos antagonistas NMDA quando os animais são previamente expostos a um mesmo ambiente de treinamento. Tendo isto em mente, esse estudo visa avaliar se a manipulação farmacológica do sistema opióide após a

pré-exposição ao ambiente de treinamento está envolvida no efeito amnésico do antagonista do sítio das poliaminas no receptor NMDA, arcaína.



## **4. MANUSCRITO**

---

**Manuscript submetido para publicação na revista Neurobiology of learning and memory**

----- Forwarded message -----

From: **NLM (ELS)** <[nlm@elsevier.com](mailto:nlm@elsevier.com)>

Date: 2012/2/10

Subject: NLM-11-187R1: Final Decision

To: [maribel.rubin@gmail.com](mailto:maribel.rubin@gmail.com)

Ms. No.: NLM-11-187R1

Title: Opioid mechanisms are involved in the disruption of arcaïne-induced amnesia by context pre-exposure.

Corresponding Author: Dr maribel Antonello rubin

Authors: Michelle M Rosa, Master student; Carlos F Mello, Ph.D; Kelli Camera, Master; Ana Paula C Ceretta, Master; Daniela A Ribeiro, Master student; Cristiane Signor, Master student;

Dear Dr rubin,

We are pleased to inform you that your manuscript, referenced above, has been accepted for publication in Neurobiology of Learning and Memory. Proofs will be sent to you in due course.

Your article will appear on Elsevier's on-line journals' database ScienceDirect as an "Article in Press" within approximately 4-6 weeks. Please see <http://www.sciencedirect.com/science/journal/10747427>. An "Article in Press" may already be cited prior its publication in an issue of the journal by means of its unique DOI number which does not change throughout the publication process.

Many thanks for submitting your paper to Neurobiology of Learning and Memory.

With kind regards,

John Guzowski, Editor

Eric Klann, Associate Editor

Jerry Rudy, Associate Editor

Neurobiology of Learning and Memory

Editorial Office Elsevier

Email: [nlm@elsevier.com](mailto:nlm@elsevier.com)

**Opioid mechanisms are involved in the disruption of arcaïne-induced amnesia by context pre-exposure**

Michelle Melgarejo da Rosa<sup>a</sup>, Carlos Fernando Mello<sup>b,1</sup>, Keli Camera<sup>a</sup>, Ana Paula Chiapinotto Ceretta<sup>a</sup>, Daniela Aymone Ribeiro<sup>a</sup>, Cristiane Signor<sup>a</sup>, Maribel Antonello Rubin<sup>a,b,1\*</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, CCNE, Universidade Federal de Santa Maria, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>b</sup>Programa de Pós-graduação em Farmacologia, CCS, Universidade Federal de Santa Maria, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

\*Corresponding author. Fax: + 55 55 3220 8978

E-mail address: maribel.rubin@gmail.com (M.A. Rubin)

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

## ABSTRACT

Previous exposure to the training context disrupts glutamatergic N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAr) antagonist-induced amnesia, indicating that novelty is necessary for such an amnesic effect. While there are reports that novelty-related release of opioids cause amnesia, no study has addressed whether the amnesic effect of NMDAr antagonists involve opioid mechanisms. In this study we investigated whether pharmacological manipulation of the opioid system immediately after context pre-exposure alters the amnesic effect of arcaine, a NMDAr antagonist. Adult male Wistar rats were habituated (pre-exposed) to a fear conditioning training apparatus or to a different context (open field). Immediately after pre-exposure, animals were injected with saline or naloxone (0.5 mg/kg, i.p.) or anti-beta-endorphin antibody (1:500, i.c.v.). Forty eight hours after pre-exposure session, all animals were subjected to fear conditioning acquisition protocol and saline or arcaine (30 mg/kg, i.p.) was administered immediately after training. Testing was carried out 24 h later, and freezing responses due to re-exposure to the training apparatus were recorded. Pre-exposure to the training apparatus prevented the impairment of memory induced by post-training arcaine. Administration of naloxone or anti-beta-endorphin antibody, immediately after pre-exposure to the training apparatus, reinstated the amnesic effect of post-training arcaine. The results suggest that endogenous opioid mechanisms are involved in the pre-exposure-induced loss of the amnesic effect of arcaine.

*Keywords:* Context exposure; Memory; Fear conditioning; Arcaine; Opioids.

## 1. Introduction

Historical and current evidence suggest that memories are initially fragile, but become more stable with time (Medina et al., 2008). Such an observation has led to the concept of memory consolidation, which refers to the stabilization of a new memory over time by neural processes activated by recently learned information (Roesler and McGaugh, 2010).

The process of consolidation takes place immediately after the training experience (Castellano et al., 2001a), and it depends on glutamatergic transmission (Izquierdo and Medina, 1997; Rosat et al., 1992; Castellano et al., 2001a; Camera et al., 2007). However, *it is* regulated by other neurotransmitters and neuromodulators, such as opioids (Izquierdo et al., 1989; Medina and Izquierdo, 1995; Izquierdo and Medina, 1997; Castellano et al., 2001b), acetylcholine (Rosat et al., 1992; Brioni and Arneric, 1993; Van der Zee et al., 1994; Thiel et al., 1998), serotonin (Horisawa et al., 2011; Roberts and Hedlund, 2011), norepinephrine (Ferry et al., 1999), dopamine (Brioni and Arneric, 1993; El-Ghundi et al., 2007; Darvas et al., 2011), oxytocin (Arletti et al., 1995; Pagani et al., 2011), BDNF (Slipczuk et al., 2009), GABA (Rosat et al., 1992; Savic et al., 2009), within other.

The activation of glutamatergic N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAr) in the hippocampus, amygdala and other brain areas (Izquierdo and Medina, 1997; Roesler et al., 2003; Roesler et al., 2005; Cammarota et al., 2008) play an important role in early consolidation of the memory of tasks, such as inhibitory avoidance (Izquierdo and Medina, 1997; Roesler et al., 2003; Roesler et al., 2005; Cammarota et al., 2008) and fear conditioning (Santini et al., 2001; Burgos-Robles et al., 2007; Camera et al., 2007; Kalisch et al., 2009; Liu et al., 2009; Gomes et al., 2010). In fact, it has been demonstrated that immediate post-training, but not delayed (30–180 min) intrahippocampal infusion of the NMDA competitive antagonist aminophosphonopentanoic acid - AP5 - (Izquierdo et al., 1992) or of the glutamate metabotropic receptor antagonist methyl-carboxyphenyl glycine (Bianchin et al., 1994) causes amnesia in the inhibitory avoidance task. Moreover, systemic administration of the noncompetitive NMDAr antagonist MK-801, immediately post-training, disrupts memory of the inhibitory avoidance task (Ceretta et al., 2008). The consolidation of long-term memory of one-trial step-down inhibitory avoidance task is

blocked by the early post-training infusion of NMDAR and  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate receptor (AMPA) antagonists into the CA1 region of the dorsal hippocampus, and is associated with a rapid and reversible increase in the total number of [ $^3$ H]AMPA binding sites (Cammarota et al., 2004).

While NMDAR antagonists disrupt memory in both inhibitory avoidance and fear conditioning tasks, positive modulators of the NMDA receptor, such as polyamines, improve acquisition and/or early consolidation of inhibitory avoidance (Rubin et al., 2000; Rubin et al., 2001) and fear conditioning (Rubin et al., 2004; Gomes et al., 2010) tasks. The immediately post-training intra-hippocampal, intra-amygdala and systemic administration of low doses of spermidine improves the memory of inhibitory avoidance (Rubin et al., 2000; Rubin et al., 2001) and fear conditioning (Rubin et al., 2004; Camera et al., 2007). In line with this view, MK-801, a non-competitive antagonist of NMDAR, reverses the facilitatory effect of spermidine on the memory of fear (Camera et al., 2007). It is also remarkable that the facilitatory effects of spermidine are antagonized by minute amounts of arcaïne, an antagonist of the NMDAR polyamine binding site (Reynolds, 1990; Rubin et al., 2000; Rubin et al., 2001; Rubin et al., 2004; Guerra et al., 2011). The systemic and intra-amygdalar administration of arcaïne, at doses higher than those required to block the facilitatory effects of spermidine, impairs memory of inhibitory avoidance (Rubin et al., 2001; Ceretta et al., 2008) and fear conditioning (Rubin et al., 2004; Camera et al., 2007).

One intriguing finding of the literature is that pre-exposure to the training apparatus prevents the impairment of memory induced by NMDAR antagonists. Consistent with this view, pretraining or pre-exposure to the task apparatus protects from impairment of inhibitory avoidance memory induced by post-training intrahippocampal infusion of the AP5 in rats (Roesler et al., 1998; Roesler et al., 2003; Roesler et al., 2005) and systemic injection of MK-801 in mice (Shapiro and O'Connor, 1992; Castellano et al., 1999).

The effect of pre-exposure on the conditioning stimulus (CS) has been attributed to a retardation of responding to the CS that is observed when the subject has been exposed to that CS alone.

The following putative mechanisms have been implicated in pre-exposure induced learning impairment: a decrease in associability or attention to the CS (Cutler et al., 1975; Pearce and Hall, 1980), a response deficit due to a robust CS–

context association (Miller et al., 1992), or arising from interfering associations to the CS (Miller et al., 1986; Bouton, 1993). Moreover, one should consider that decreased acquisition scores due to pre-exposition (Hinderliter and Riccio, 1977; Izquierdo and McGaugh, 1987) could mask the amnestic effect the NMDA antagonist (Roesler et al., 1998; Izquierdo et al., 1999; Roesler et al., 2003), due to a “ground effect”. In other words, it is difficult to detect an impairment of performance in an already impaired animal.

It is particularly interesting that familiarization with the testing apparatus also decreases the impairing effects of morphine and of the opiate k-receptor agonist tifluadom on memory consolidation of inhibitory avoidance task (Castellano et al., 1984; Pavone and Castellano, 1985) and of morphine on contextual fear conditioning (Rudy and Pugh, 1996; Rudy et al., 1999). In fact, Rudy and Pugh (1999) have suggested that contextual fear conditioning depends on two independent processes: (a) constructing of a unitary representation of the features of the context, and (b) associating this representation with the aversive shock, and that opioids could modulate the processes that consolidate a memory representation of the context.

Seminal studies by Izquierdo and McGaugh (1985; 1987) on the role of opioids in memory and novelty have shown that endogenous opioids are released when an animal is exposed to novelty (Izquierdo and McGaugh, 1985; Netto et al., 1985; Xu et al., 1998) and have suggested that the opioid system is involved in the adaptive behavior to novelty. Interestingly, an interaction between glutamatergic and opioid systems has also been proposed (Shapiro and O'Connor, 1992; Castellano et al., 1999; Barros et al., 2003), since MK-801 potentiates the memory impairment induced by opioids (Cestari and Castellano, 1997) and attenuates, or inhibits, the development of tolerance to morphine-induced analgesia in the rat (Marek et al., 1991; Trujillo and Akil, 1994). Such an interaction, to some degree, has been confirmed by the findings that the NMDA antagonists MK-801 (Cestari and Castellano, 1997) and arcaïne (Mariani et al., 2011) abolish morphine-induced state dependency. Considering that endogenous opioids may be neurochemical markers of novelty (Izquierdo and McGaugh, 1985) and that several lines of evidence indicate that the amnestic of NMDA antagonists depends on novelty, one could propose that novelty-induced release of endogenous opioids are involved in the amnestic effect of NMDA antagonists.



Therefore, in this study we investigated whether the pharmacological manipulation of the opioid system, immediately after pre-exposure to the conditioning apparatus, alters pre-exposure-induced impairment of the amnestic effect of arcaine on the contextual fear conditioning of rats.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Animals

Male Wistar rats (220–260 g) were housed five to cage on a 12-h light/dark cycle (lights on at 7:00 a.m.) at a temperature of 21°C with water *ad libitum* and standard laboratory chow (Guabi, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil). All experimental procedures were conducted between 9:00 and 16:00h. All experimental procedures were in accordance with the Policies on the Use of Animals and Humans in Neuroscience research, revised and approved by the Society for Neuroscience Research in January 1995 and with the Institutional and National regulations for animal research (process 068/2011).

### 2.2. Drugs

The animals were injected intraperitoneally (i.p.) with saline (0.9% NaCl), 1,4-diguanidinobutane sulfate (arcaine; Pfaltz & Bauer, Waterbury, CT, USA); naloxone (Cristália, São Paulo, Brazil), or anti-beta-endorphin antibody (Immunoistar, Wisconsin, USA). All drugs solutions were prepared daily in saline (0.9% NaCl). Injections were performed immediately after pre-exposure and/or immediately after training, in a 1 ml/kg injection volume (i.p.) or 0.3 µL to the left lateral ventricle (i.c.v.).

### 2.3. Surgery

Five days before the behavioral procedures, rats used in experiment 3 were implanted, under Equithesin (1% phenobarbital, 2% magnesium sulfate, 4% chloral hydrate, 42% propyleneglycol, 11% ethanol; 3 ml/kg, i.p.) anesthesia with one guide

cannula (27 gauge) stereotaxically aimed at the left lateral ventricle (A 0 mm; L1.5 mm; V 2.5 mm), according to Paxinos and Watson (1986).

#### *2.4. Apparatus*

Contextual fear conditioning training and testing took place in a fear conditioning chamber (30 X 25 X 25 cm), located in a well-lit room. The front wall and ceiling of the chamber were made of clear acrylic plastic, whereas the lateral and rear walls were made of opaque plastic. The floor of the chamber consisted of 32 stainless steel rods (3 mm diameter), spaced 1 cm apart and wired to a shock generator. The chamber was cleaned with 30% ethylic alcohol before and after each rat occupied it.

#### *2.5. Behavioral Procedures*

##### *2.5.1. Pre-exposure*

Pre-exposure took place in the fear conditioning chamber or in an open field (a 56 cm-diameter round open field, which floor was covered with linoleum), 48h before fear-conditioning training. During the pre-exposure session, the animals were allowed to freely explore the apparatuses for 3 min.

##### *2.5.2. Contextual fear conditioning*

Each animal were subjected to a single fear-conditioning training session as described by Rubin et al (2004) with some modifications. In brief, the rat was placed in the conditioning chamber (conditioned stimulus, CS) and habituated to the apparatus (CS) for 3 min. Immediately after, three 1 s-0.6 mA footshocks (unconditioned stimulus, US) were delivered. The shocks were 40 sec apart. After the last CS/US pairing, rats were allowed to stay in the chamber for another 60 sec before returning to their home cages.

Twenty four hours after training each rat was placed back in the conditioning chamber, and a 6 min testing session was performed. During this time, no shock was

given, and every 4 s an instantaneous observation of the rat was made to assess whether it was in freezing, or not. Behavior was judged as freezing if there was an absence of any visible movement, except for that necessitated by respiration. Freezing, defined as a stereotypic crouching position with complete immobility (except for respiratory movements), was used as a fear-indicating behavior. The data were converted to the percentage of samples scored as freezing.

### *2.5.3. Experiment 1 - Effect of pre-exposure on arcaine-induced amnesia*

This experiment was designed to investigate whether arcaine-induced amnesia depends on the context of pre-exposure. Animals were pre-exposed to the training apparatus or to the open field during 3 min or remained in the home cage (control). Immediately after the pre-exposure session the animals were returned to their home cage and, 48h later, trained in the fear conditioning apparatus as described above. Immediately after training the animals were injected with saline (0.9% NaCl, 1 ml/kg, i.p.) or arcaine (30 mg/kg, i.p.) and, 24h later, tested in the fear conditioning apparatus where their freezing responses were scored, as described above (2.5.2.).

### *2.5.4. Experiment 2 - Effect of naloxone immediately after pre-exposure on pre-exposure-induced abolishment of the amnestic effect of arcaine*

This experiment was designed to investigate the involvement of the opioid system in the pre-exposure-induced loss of sensitivity to arcaine. Animals were pre-exposed to the training apparatus or to the open field during 3 min. Immediately after pre-exposure session, the animals were injected with saline or naloxone (0.5 mg/kg i.p.). After injections, rats were returned to their home cages and 48 h later they were trained in the contextual fear conditioning apparatus as described above. Immediately after training, animals were injected with saline or arcaine (30 mg/kg, i.p.). 24h later the animals were tested in the fear conditioning apparatus and freezing responses were scored as described above (2.5.2.).

### *2.5.5. Experiment 3 - Effect of beta-endorphin antibody after pre-exposure on pre-exposure-induced abolishment of the amnestic effect of arcaine*

This experiment was designed to investigate the role of endogenous beta-endorphin in the pre-exposure-induced loss of sensitivity to arcaine. Animals were pre-exposed to the training apparatus or to the open field during 3 min. Immediately after pre-exposure session the animals received unilateral to the left lateral ventricle (0.3  $\mu$ L, i.c.v.) injection of saline, anti-beta-endorphin antibody (1:500) or boiled anti-beta-endorphin antibody (1:500) as an additional control. After injections, rats were returned to their home cages and, 48h later, they were trained in the conditioning chamber. Immediately after training the animals were injected with saline or arcaine (30 mg/kg, i.p.). 24h later the animals were tested in fear conditioning apparatus and freezing responses were scored as described above (2.5.2.).

## 2.6. Statistical analysis

Statistical analyses were carried out by two- or three-way analysis of variance (ANOVA) with the “sessions” factor treated as within-subject factor. Two-way ANOVA was followed by post hoc analyses (Bonferroni’s test). A  $p < 0.05$  was considered significant. In order to meet ANOVA assumptions, data were subjected to arc sin transformation before statistical analysis.

## 3. Results

### 3.1. Experiment 1

Fig. 1 shows the effect of post-training administration of arcaine on freezing to context in rats subjected to different pre-exposure conditions: no pre-exposure, pre-exposed to the open field; pre-exposed to the training apparatus. Statistical analysis of fear conditioning scores (two-way ANOVA) revealed a significant interaction between drug by pre-exposure condition [ $F_{2,70} = 8.35$   $p < 0.001$ ]. Post hoc analysis (Bonferroni’s test) revealed that arcaine decreased freezing scores (caused amnesia) only in those animals pre-exposed to the open field or not subjected to pre-exposure session (naive). Those animals pre-exposed to the training apparatus did not present the typical amnesic effect of arcaine.

### 3.2. Experiment 2

Fig. 2 shows the effect of naloxone, given immediately after pre-exposure to the training apparatus, on the amnesic effect of arcaine administered after training on freezing to context. Statistical analysis of fear conditioning scores (three-way ANOVA) revealed a significant drug (Sal or Arc) by antagonist (Sal or Nal) by pre-exposure condition (open field or training apparatus) interaction: [ $F_{1,50} = 17.59$ ;  $p < 0.001$ ]. These results indicate that naloxone reinstated the amnesic effect of post-training arcaine in those animals pre-exposed to the training apparatus.

### 3.3. Experiment 3

Fig. 3 shows the effect of i.c.v injection of anti-beta-endorphin antibody ( $A\beta$ ) or boiled anti-beta-endorphin antibody ( $BA\beta$ ) immediately after pre-exposure to the open field or to the training apparatus and effect of i.p. injection of arcaine after training on freezing to context. Statistical analysis of fear conditioning scores (three-way ANOVA) revealed a significant drug (Sal or Arc) by antagonist (Sal or  $BA\beta$  or  $A\beta$ ) by pre-exposure condition (open field or training apparatus) interaction: [ $F_{1,45} = 23.67$ ;  $p < 0.001$ ]. Anti beta-endorphin antibody did not prevent the amnesic effect of arcaine in animals pre-exposed to the open field apparatus and allowed the amnesic effect of arcaine in animals pre-exposed to the training apparatus.

## 4. Discussion

In the current study we showed that pre-exposure to the training apparatus prevented the impairment of memory induced by post-training arcaine, and that the administration of naloxone or anti-beta-endorphin antibody, immediately after pre-exposure to the training apparatus, reinstated the amnesic effect of arcaine.

The finding that post-training administration of arcaine impairs contextual fear conditioning (Fig. 1) confirms previous reports that antagonists of the polyamine binding site at the NMDA receptor disrupt the memory of inhibitory avoidance (Rubin et al., 2001) and fear conditioning (Rubin et al., 2004; Camera et al., 2007), and further support a role for NMDAr in memory formation. In addition, it also replicates

results from different laboratories that have shown that pre-exposure to the training apparatus significantly attenuates or abolishes the amnestic effect of NMDA receptor antagonists in different behavioral paradigms (Caramanos and Shapiro, 1994; Roesler et al., 1998; Roesler et al., 2003). Based on these findings, one might also propose that the amnestic effect of arcaïne is novelty-dependent. The same interpretation could apply for those studies that have shown that context pre-exposure abolishes the amnestic effect of other NMDA antagonists.

Novelty is a motivationally salient learning signal that attracts attention, promotes memory encoding and modifies goal-directed behavior (Sokolov, 1963; Knight, 1996; Mesulam, 1998; Lisman and Grace, 2005; Boehler et al., 2011). The presence of novelty usually induces a quick habituation and it is rejected by the rapid decrease of responding to the new environment or situation (Netto et al., 1985; Cahill et al., 1986; Izquierdo and Pereira, 1989). Likewise other forms of learning (Izquierdo and Medina, 1997), the early phase of memory formation of habituation to a novel environment requires the immediate post-training involvement of NMDA receptors (Izquierdo et al., 1992) and  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II (Wolfman et al., 1999).

A functional relationship between novelty and reward-processing by midbrain dopaminergic mechanisms highlights a biological relevance for novelty as a motivating (Schultz, 1998; Kakade and Dayan, 2002) and/or reinforcing (Reed et al., 1996) stimulus in animals and humans (Duzel et al., 2010). The lack of a novelty-induced dopaminergic input in habituated animals results in decreased motivation, and may explain why previous exposure to a given apparatus may decrease associability or attention to the CS (Cutler et al., 1975; Pearce and Hall, 1980), cause a response deficit due to a robust CS–context association (Miller et al., 1992), or association interference with the CS (Miller et al., 1986; Bouton, 1993).

Nevertheless, none of the above considerations explain why arcaïne and other NMDA antagonists do not cause amnesia in previously habituated animals, particularly if we consider that, in the current work, previous habituation to the training apparatus did not cause learning deficits *per se*. Therefore, we concluded that previous habituation may cause not only the removal of novelty-induced promnestic, but also of concurrent novelty-induced amnestic mechanisms.

Various studies have shown that post-training administration of opioid agonists impairs memory retention in different tasks, such as inhibitory avoidance (Izquierdo, 1979; Castellano et al., 1984; Castellano et al., 1989; Castellano et al., 1993), fear conditioning (Rudy et al., 1999) and Morris water maze task (Hepner et al., 2002). Moreover, the post-training administration of naloxone facilitates memory and prevents the deleterious effects of opioid agonists (Castellano et al., 1989). Additional studies have also shown that opioid agonists induce state dependency (Hill et al., 1971; Oishi et al., 1988; Siegel, 1988; Shiigi and Kaneto, 1990; Patti et al., 2006; Zarrindast et al., 2006b; Zarrindast et al., 2006e; Zarrindast et al., 2006a; Zarrindast et al., 2006c; Zarrindast et al., 2006d; Mariani et al., 2011) and enhance retrieval when given before memory tests (Cahill and McGaugh, 1998).

Interestingly, an interaction between the glutamatergic and opioid systems in memory modulation has been proposed. It has been shown that the NMDA antagonist MK-801 potentiates morphine-induced amnesia (Cestari and Castellano, 1997) and that morphine and arcaïne induce cross state-dependency in rats (Mariani et al., 2011). Moreover, naltrexone reverses the memory disruption induced by MK-801 in the inhibitory avoidance task (Castellano et al., 1999), suggesting the involvement of opioid mechanisms in the memory impairment induced by the NMDA antagonist. Nevertheless, it has also been reported that pre-training MK-801 inhibits state dependency caused by opioids (Zarrindast et al., 2006c).

Fig. 2 shows that the administration of naloxone, immediately after pre-exposure, reinstated the amnesic effect of arcaïne on contextual fear conditioning. These results suggest that opioid receptor-mediated responses elicited during the pre-exposure to the training apparatus are involved in the loss of the amnesic effect of arcaïne. Since novelty-induced  $\beta$ -endorphin release has been implicated as a marker for novelty, it is possible blocking  $\beta$ -endorphin binding sites with naloxone also impaired novelty recognition.

In order to determine if endogenous beta-endorphin was involved in pre-exposure-induced insensitivity to the effects of arcaïne, we tested whether anti beta-endorphin antibody prevented the effect of pre-exposure. Fig. 3 shows that anti-beta-endorphin antibody administration, immediately after pre-exposure, reinstated the amnesic effect of arcaïne in animals previously exposed to the training apparatus and did not prevent the arcaïne amnesic effect on memory in animals previously

exposed to the open field. These results suggest that the amnesic effect of arcaine depends, at least in part, on endogenous opioid mechanisms.

In summary, the present study describes by using two different pharmacological approaches, that opioid mechanisms are involved in the pre-exposure-induced insensistivity to the amnesic effect of the putative NMDA antagonist arcaine.

### Acknowledgements:

The authors thank Guilherme Monteiro Gomes, Dra. Gerusa Duarte Dalmolin and Gustavo Petri Guerra for a critical reading of the manuscript. This study was supported by CNPq (306164/2010-8, 481664/2010-6, 476551/2009-9). MM Rosa is recipient of a CAPES fellowship. CF Mello and MA Rubin are recipients of CNPq productivity fellowships. All the experiments comply with the current laws of Brazil.

### References

- Arletti, R., Benelli, A., Poggioli, R., Luppi, P., Menozzi, B., & Bertolini, A. (1995). Aged rats are still responsive to the antidepressant and memory-improving effects of oxytocin. *Neuropeptides*, *29*, 177-182.
- Barros, D. M., Izquierdo, L. A., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2003). Pharmacological findings contribute to the understanding of the main physiological mechanisms of memory retrieval. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, *2*, 81-94.
- Bianchin, M., Da Silva, R. C., Schmitz, P. K., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (1994). Memory of inhibitory avoidance in the rat is regulated by glutamate metabotropic receptors in the hippocampus. *Behav Pharmacol*, *5*, 356-359.
- Boehler, C. N., Bunzeck, N., Krebs, R. M., Noesselt, T., Schoenfeld, M. A., Heinze, H. J., Munte, T. F., Woldorff, M. G., & Hopf, J. M. (2011). Substantia nigra activity level predicts trial-to-trial adjustments in cognitive control. *J Cogn Neurosci*, *23*, 362-373.
- Bouton, M. E. (1993). Context, time, and memory retrieval in the interference paradigms of Pavlovian learning. *Psychol Bull*, *114*, 80-99.
- Brioni, J. D., & Arneric, S. P. (1993). Nicotinic receptor agonists facilitate retention of avoidance training: participation of dopaminergic mechanisms. *Behav Neural Biol*, *59*, 57-62.
- Bruins Slot, L. A., Pauwels, P. J., & Colpaert, F. C. (2002). Sign-reversal during persistent activation in mu-opioid signal transduction. *J Theor Biol*, *215*, 169-182.
- Burgos-Robles, A., Vidal-Gonzalez, I., Santini, E., & Quirk, G. J. (2007). Consolidation of fear extinction requires NMDA receptor-dependent bursting in the ventromedial prefrontal cortex. *Neuron*, *53*, 871-880.



- Cahill, L., Brioni, J., & Izquierdo, I. (1986). Retrograde memory enhancement by diazepam: its relation to anterograde amnesia, and some clinical implications. *Psychopharmacology (Berl)*, *90*, 554-556.
- Cahill, L., & McGaugh, J. L. (1998). Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. *Trends Neurosci*, *21*, 294-299.
- Camera, K., Mello, C. F., Ceretta, A. P., & Rubin, M. A. (2007). Systemic administration of polyaminergic agents modulate fear conditioning in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, *192*, 457-464.
- Cammarota, M., Bevilaqua, L. R., Bonini, J. S., Rossatto, J. I., Medina, J. H., & Izquierdo, N. (2004). Hippocampal glutamate receptors in fear memory consolidation. *Neurotox Res*, *6*, 205-212.
- Cammarota, M., Bevilaqua, L. R., Rossatto, J. I., Lima, R. H., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2008). Parallel memory processing by the CA1 region of the dorsal hippocampus and the basolateral amygdala. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*, 10279-10284.
- Caramanos, Z., & Shapiro, M. L. (1994). Spatial memory and N-methyl-D-aspartate receptor antagonists APV and MK-801: memory impairments depend on familiarity with the environment, drug dose, and training duration. *Behav Neurosci*, *108*, 30-43.
- Castellano, C., Cestari, V., & Ciamei, A. (2001a). NMDA receptors and learning and memory processes. *Curr Drug Targets*, *2*, 273-283.
- Castellano, C., Cestari, V., Ciamei, A., & Pavone, F. (1999). MK-801-induced disruptions of one-trial inhibitory avoidance are potentiated by stress and reversed by naltrexone. *Neurobiol Learn Mem*, *72*, 215-229.
- Castellano, C., Introini-Collison, I. B., & McGaugh, J. L. (1993). Interaction of beta-endorphin and GABAergic drugs in the regulation of memory storage. *Behav Neural Biol*, *60*, 123-128.
- Castellano, C., Introini-Collison, I. B., Pavone, F., & McGaugh, J. L. (1989). Effects of naloxone and naltrexone on memory consolidation in CD1 mice: involvement of GABAergic mechanisms. *Pharmacol Biochem Behav*, *32*, 563-567.
- Castellano, C., Pavone, F., & Puglisi Allegra, S. (1984). Morphine and memory in DBA/2 mice: effects of stress and of prior experience. *Behav Brain Res*, *11*, 3-10.
- Castellano, M. A., Rojas-Diaz, D., Martin, F., Quintero, M., Alonso, J., Navarro, E., & Gonzalez-Mora, J. L. (2001b). Opposite effects of low and high doses of arginine on glutamate-induced nitric oxide formation in rat substantia nigra. *Neurosci Lett*, *314*, 127-130.
- Ceretta, A. P., Camera, K., Mello, C. F., & Rubin, M. A. (2008). Arcaine and MK-801 make recall state-dependent in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, *201*, 405-411.
- Cestari, V., & Castellano, C. (1997). MK-801 potentiates morphine-induced impairment of memory consolidation in mice: involvement of dopaminergic mechanisms. *Psychopharmacology (Berl)*, *133*, 1-6.
- Cutler, M. G., Mackintosh, J. H., & Chance, M. R. (1975). Effects of the environment on the behavioural response of mice to non-ataxic doses of ethyl alcohol. *Neuropharmacology*, *14*, 841-846.
- Darvas, M., Fadok, J. P., & Palmiter, R. D. (2011). Requirement of dopamine signaling in the amygdala and striatum for learning and maintenance of a conditioned avoidance response. *Learn Mem*, *18*, 136-143.

- Duzel, E., Bunzeck, N., Guitart-Masip, M., & Duzel, S. (2010). NOvelty-related motivation of anticipation and exploration by dopamine (NOMAD): implications for healthy aging. *Neurosci Biobehav Rev*, *34*, 660-669.
- El-Ghundi, M., O'Dowd, B. F., & George, S. R. (2007). Insights into the role of dopamine receptor systems in learning and memory. *Rev Neurosci*, *18*, 37-66.
- Ferry, B., Roozendaal, B., & McGaugh, J. L. (1999). Role of norepinephrine in mediating stress hormone regulation of long-term memory storage: a critical involvement of the amygdala. *Biol Psychiatry*, *46*, 1140-1152.
- Gomes, G. M., Mello, C. F., da Rosa, M. M., Bochi, G. V., Ferreira, J., Barron, S., & Rubin, M. A. (2010). Polyaminergic agents modulate contextual fear extinction in rats. *Neurobiol Learn Mem*, *93*, 589-595.
- Guerra, G. P., Mello, C. F., Bochi, G. V., Pazini, A. M., Fachinetto, R., Dutra, R. C., Calixto, J. B., Ferreira, J., & Rubin, M. A. (2011). Hippocampal PKA/CREB pathway is involved in the improvement of memory induced by spermidine in rats. *Neurobiol Learn Mem*, *96*, 324-332.
- Hepner, I. J., Homewood, J., & Taylor, A. J. (2002). Methadone disrupts performance on the working memory version of the Morris water task. *Physiol Behav*, *76*, 41-49.
- Hill, H. E., Jones, B. E., & Bell, E. C. (1971). State dependent control of discrimination by morphine and pentobarbital. *Psychopharmacologia*, *22*, 305-313.
- Hinderliter, C. F., & Riccio, D. C. (1977). Long-term effects of prior experience in attenuating amnesia. *Am J Psychol*, *90*, 407-418.
- Horisawa, T., Ishibashi, T., Nishikawa, H., Enomoto, T., Toma, S., Ishiyama, T., & Taiji, M. (2011). The effects of selective antagonists of serotonin 5-HT<sub>7</sub> and 5-HT<sub>1A</sub> receptors on MK-801-induced impairment of learning and memory in the passive avoidance and Morris water maze tests in rats: mechanistic implications for the beneficial effects of the novel atypical antipsychotic lurasidone. *Behav Brain Res*, *220*, 83-90.
- Izquierdo, I. (1979). Effect of naloxone and morphine on various forms of memory in the rat: possible role of endogenous opiate mechanisms in memory consolidation. *Psychopharmacology (Berl)*, *66*, 199-203.
- Izquierdo, I., Barcik, N. R., & Brioni, J. D. (1989). Pretest beta-endorphin and epinephrine, but not oxotremorine, reverse retrograde interference of a conditioned emotional response in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, *33*, 545-548.
- Izquierdo, I., da Cunha, C., Rosat, R., Jerusalinsky, D., Ferreira, M. B., & Medina, J. H. (1992). Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. *Behav Neural Biol*, *58*, 16-26.
- Izquierdo, I., & McGaugh, J. L. (1985). Effect of a novel experience prior to training or testing on retention of an inhibitory avoidance response in mice: involvement of an opioid system. *Behav Neural Biol*, *44*, 228-238.
- Izquierdo, I., & McGaugh, J. L. (1987). Effect of novel experiences on retention of inhibitory avoidance behavior in mice: the influence of previous exposure to the same or another experience. *Behav Neural Biol*, *47*, 109-115.
- Izquierdo, I., & Medina, J. H. (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.

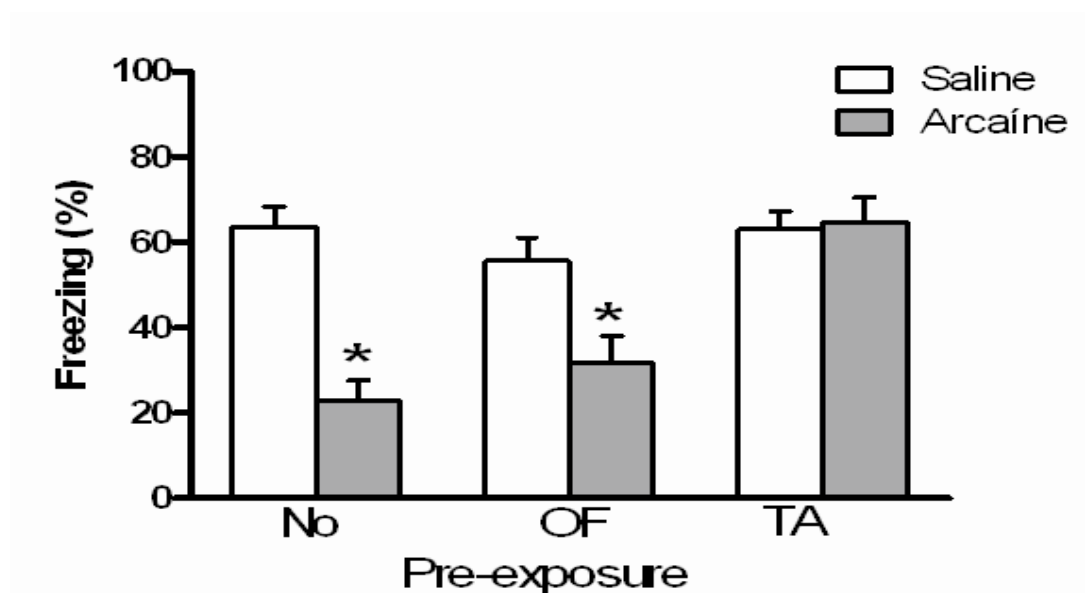
- Izquierdo, I., & Pereira, M. E. (1989). Post-training memory facilitation blocks extinction but not retroactive interference. *Behav Neural Biol*, *51*, 108-113.
- Izquierdo, I., Schroder, N., Netto, C. A., & Medina, J. H. (1999). Novelty causes time-dependent retrograde amnesia for one-trial avoidance in rats through NMDA receptor- and CaMKII-dependent mechanisms in the hippocampus. *Eur J Neurosci*, *11*, 3323-3328.
- Kakade, S., & Dayan, P. (2002). Dopamine: generalization and bonuses. *Neural Netw*, *15*, 549-559.
- Kalisch, R., Holt, B., Petrovic, P., De Martino, B., Kloppel, S., Buchel, C., & Dolan, R. J. (2009). The NMDA agonist D-cycloserine facilitates fear memory consolidation in humans. *Cereb Cortex*, *19*, 187-196.
- Knight, R. (1996). Contribution of human hippocampal region to novelty detection. *Nature*, *383*, 256-259.
- Lisman, J. E., & Grace, A. A. (2005). The hippocampal-VTA loop: controlling the entry of information into long-term memory. *Neuron*, *46*, 703-713.
- Liu, J. L., Li, M., Dang, X. R., Wang, Z. H., Rao, Z. R., Wu, S. X., Li, Y. Q., & Wang, W. (2009). A NMDA receptor antagonist, MK-801 impairs consolidating extinction of auditory conditioned fear responses in a Pavlovian model. *PLoS One*, *4*, e7548.
- Marek, P., Ben-Ellyahu, S., Gold, M., & Liebeskind, J. C. (1991). Excitatory amino acid antagonists (kynurenic acid and MK-801) attenuate the development of morphine tolerance in the rat. *Brain Res*, *547*, 77-81.
- Mariani, R. K., Mello, C. F., Rosa, M. M., Ceretta, A. P., Camera, K., & Rubin, M. A. (2011). Effect of naloxone and morphine on arcaine-induced state-dependent memory in rats. *Psychopharmacology (Berl)*.
- Medina, J. H., Bekinschtein, P., Cammarota, M., & Izquierdo, I. (2008). Do memories consolidate to persist or do they persist to consolidate? *Behav Brain Res*, *192*, 61-69.
- Medina, J. H., & Izquierdo, I. (1995). Retrograde messengers, long-term potentiation and memory. *Brain Res Brain Res Rev*, *21*, 185-194.
- Mesulam, M. M. (1998). From sensation to cognition. *Brain*, *121* ( Pt 6), 1013-1052.
- Miller, R. R., Barnet, R. C., & Grahame, N. J. (1992). Responding to a conditioned stimulus depends on the current associative status of other cues present during training of that specific stimulus. *J Exp Psychol Anim Behav Process*, *18*, 251-264.
- Miller, R. R., Kasprow, W. J., & Schachtman, T. R. (1986). Retrieval variability: sources and consequences. *Am J Psychol*, *99*, 145-218.
- Netto, C. A., Cavalheiro, E. A., Carrasco, M. A., Volkmer, N., Dias, R. D., & Izquierdo, I. (1985). Response of the rat brain beta-endorphin system to novelty: importance of the fornix connection. *Behav Neural Biol*, *43*, 37-46.
- Oishi, R., Nishibori, M., Itoh, Y., Saeki, K., Fukuda, T., & Araki, Y. (1988). Histamine turnover in the brain of morphine-dependent mice. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*, *337*, 58-63.
- Pagani, J. H., Lee, H. J., & Young, W. S., 3rd (2011). Postweaning, forebrain-specific perturbation of the oxytocin system impairs fear conditioning. *Genes Brain Behav*.
- Patti, C. L., Kameda, S. R., Carvalho, R. C., Takatsu-Coleman, A. L., Lopez, G. B., Niigaki, S. T., Abilio, V. C., Frussa-Filho, R., & Silva, R. H. (2006). Effects of morphine on the plus-maze discriminative avoidance task: role of state-dependent learning. *Psychopharmacology (Berl)*, *184*, 1-12.

- Pavone, F., & Castellano, C. (1985). Effects of tifluadom on passive avoidance behaviour in DBA/2 mice. *Behav Brain Res*, *15*, 177-181.
- Pearce, J. M., & Hall, G. (1980). A model for Pavlovian learning: variations in the effectiveness of conditioned but not of unconditioned stimuli. *Psychol Rev*, *87*, 532-552.
- Reed, P., Croft, H., & Yeomans, M. (1996). Rats' memory for serially presented novel flavours: evidence for non-spatial primacy effects. *Q J Exp Psychol B*, *49*, 174-187.
- Reynolds, I. J. (1990). Arcaine uncovers dual interactions of polyamines with the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, *255*, 1001-1007.
- Roberts, A. J., & Hedlund, P. B. (2011). The 5-HT(7) receptor in learning and memory. *Hippocampus*.
- Roesler, R., Reolon, G. K., Luft, T., Martins, M. R., Schroder, N., Vianna, M. R., & Quevedo, J. (2005). NMDA receptors mediate consolidation of contextual memory in the hippocampus after context preexposure. *Neurochem Res*, *30*, 1407-1411.
- Roesler, R., Schroder, N., Vianna, M. R., Quevedo, J., Bromberg, E., Kapczinski, F., & Ferreira, M. B. (2003). Differential involvement of hippocampal and amygdalar NMDA receptors in contextual and aversive aspects of inhibitory avoidance memory in rats. *Brain Res*, *975*, 207-213.
- Roesler, R., Vianna, M., Sant'Anna, M. K., Kuyven, C. R., Krueel, A. V., Quevedo, J., & Ferreira, M. B. (1998). Intrahippocampal infusion of the NMDA receptor antagonist AP5 impairs retention of an inhibitory avoidance task: protection from impairment by pretraining or preexposure to the task apparatus. *Neurobiol Learn Mem*, *69*, 87-91.
- Rosat, R., Da-Silva, R. C., Zanatta, M. S., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (1992). Memory consolidation of a habituation task: role of N-methyl-D-aspartate, cholinergic muscarinic and GABA-A receptors in different brain regions. *Braz J Med Biol Res*, *25*, 267-273.
- 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. (2004). Intra-amygdala administration of polyamines modulates fear conditioning in rats. *J Neurosci*, *24*, 2328-2334.
- Rubin, M. A., Boemo, R. L., Jurach, A., Rojas, D. B., Zanolla, G. R., Obregon, A. D., Souza, D. O., & Mello, C. F. (2000). Intrahippocampal spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. *Behav Pharmacol*, *11*, 57-61.
- Rubin, M. A., Stiegemeier, J. A., Volkweis, M. A., Oliveira, D. M., Fenili, A. C., Boemo, R. L., Jurach, A., & Mello, C. F. (2001). Intra-amygdala spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. *Eur J Pharmacol*, *423*, 35-39.
- Rudy, J. W., Kuwagama, K., & Pugh, C. R. (1999). Isolation reduces contextual but not auditory-cue fear conditioning: a role for endogenous opioids. *Behav Neurosci*, *113*, 316-323.
- Rudy, J. W., & Pugh, C. R. (1996). A comparison of contextual and generalized auditory-cue fear conditioning: evidence for similar memory processes. *Behav Neurosci*, *110*, 1299-1308.
- Santini, E., Muller, R. U., & Quirk, G. J. (2001). Consolidation of extinction learning involves transfer from NMDA-independent to NMDA-dependent memory. *J Neurosci*, *21*, 9009-9017.

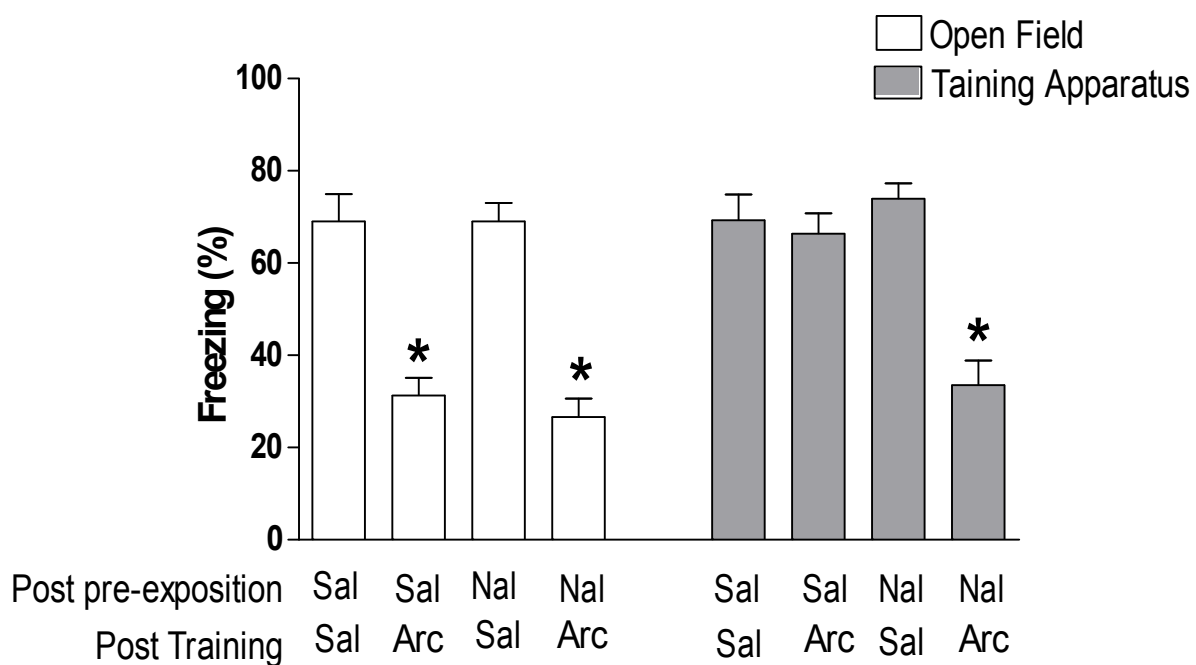
- Savic, M. M., Milinkovic, M. M., Rallapalli, S., Clayton, T., Sr., Joksimovic, S., Van Linn, M., & Cook, J. M. (2009). The differential role of alpha1- and alpha5-containing GABA(A) receptors in mediating diazepam effects on spontaneous locomotor activity and water-maze learning and memory in rats. *Int J Neuropsychopharmacol*, *12*, 1179-1193.
- Schultz, W. (1998). The phasic reward signal of primate dopamine neurons. *Adv Pharmacol*, *42*, 686-690.
- Shapiro, M. L., & O'Connor, C. (1992). N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 and spatial memory representation: working memory is impaired in an unfamiliar environment but not in a familiar environment. *Behav Neurosci*, *106*, 604-612.
- Shiigi, Y., & Kaneto, H. (1990). Facilitation of memory retrieval by pre-test morphine and its state dependency in the step-through type passive avoidance learning test in mice. *Jpn J Pharmacol*, *54*, 79-81.
- Siegel, S. (1988). State dependent learning and morphine tolerance. *Behav Neurosci*, *102*, 228-232.
- Slipczuk, L., Bekinschtein, P., Katche, C., Cammarota, M., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2009). BDNF activates mTOR to regulate GluR1 expression required for memory formation. *PLoS One*, *4*, e6007.
- Sokolov, E. N. (1963). Higher nervous functions; the orienting reflex. *Annu Rev Physiol*, *25*, 545-580.
- Thiel, C. M., Huston, J. P., & Schwarting, R. K. (1998). Hippocampal acetylcholine and habituation learning. *Neuroscience*, *85*, 1253-1262.
- Trujillo, K. A., & Akil, H. (1994). Inhibition of opiate tolerance by non-competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. *Brain Res*, *633*, 178-188.
- Van der Zee, E. A., Douma, B. R., Bohus, B., & Luiten, P. G. (1994). Passive avoidance training induces enhanced levels of immunoreactivity for muscarinic acetylcholine receptor and coexpressed PKC gamma and MAP-2 in rat cortical neurons. *Cereb Cortex*, *4*, 376-390.
- Wolfman, C., Izquierdo, L. A., Schroder, N., & Izquierdo, I. (1999). Intra-hippocampal KN-62 hinders the memory of habituation acquired alone, but not simultaneously with a water-finding task. *Behav Pharmacol*, *10*, 99-104.
- Xu, L., Anwyl, R., & Rowan, M. J. (1998). Spatial exploration induces a persistent reversal of long-term potentiation in rat hippocampus. *Nature*, *394*, 891-894.
- Zarrindast, M. R., Askari, E., Khalilzadeh, A., & Nouraei, N. (2006a). Morphine state-dependent learning sensitization and interaction with nitric oxide. *Pharmacology*, *78*, 66-71.
- Zarrindast, M. R., Bananej, M., Khalilzadeh, A., Fazli-Tabaei, S., Haeri-Rohani, A., & Rezayof, A. (2006b). Influence of intracerebroventricular administration of dopaminergic drugs on morphine state-dependent memory in the step-down passive avoidance test. *Neurobiol Learn Mem*, *86*, 286-292.
- Zarrindast, M. R., Fazli-Tabaei, S., Ahmadi, S., & Yahyavi, S. H. (2006c). Effect of lithium on morphine state-dependent memory of passive avoidance in mice. *Physiol Behav*, *87*, 409-415.
- Zarrindast, M. R., Jafari-Sabet, M., Rezayat, M., Djahanguiri, B., & Rezayof, A. (2006d). Involvement of NMDA receptors in morphine state-dependent learning in mice. *Int J Neurosci*, *116*, 731-743.

Zarrindast, M. R., Noorbakhshnia, M., Motamedi, F., Haeri-Rohani, A., & Rezayof, A. (2006e). Effect of the GABAergic system on memory formation and state-dependent learning induced by morphine in rats. *Pharmacology*, 76, 93-100.

## Figuras e legendas

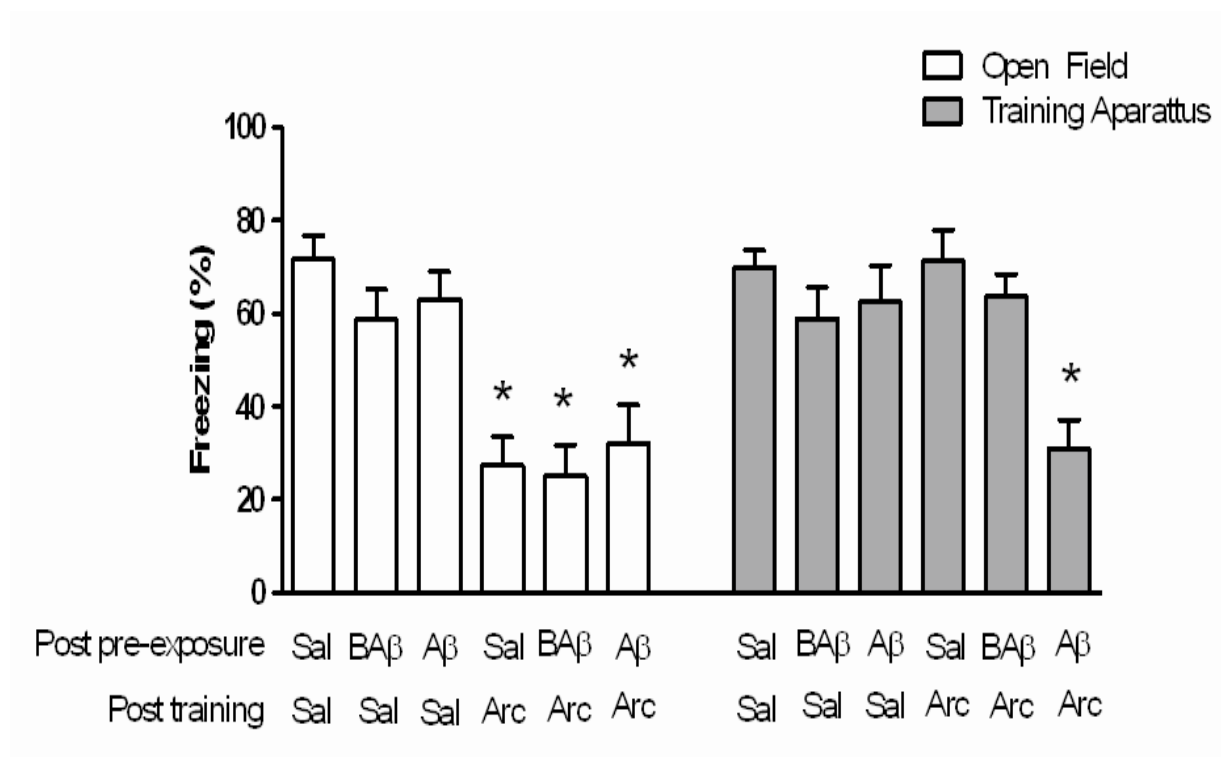


**Fig. 1.** Effect of i.p. post training administration of saline (0.9% NaCl) or Arcaïne (30 mg/kg) on freezing to context in rats without pre-exposure (No), pre-exposed to the open field (Xiaoping et al.) or to the training apparatus (TA). Training to fear conditioning occurs 48h after pre-exposure. \*  $p < 0.05$  compared with saline. Data are the mean  $\pm$  SEM (n= 12-13 animals in each group).



**Fig. 2.** Effect of i.p. post pre-exposure administration of saline, naloxone (Nal, 0.5 mg/kg) and immediately post training saline or arcaine (Arc, 30 mg/kg) on freezing to context. Training to fear conditioning occurs 48h after pre-exposure to the open field or to the training apparatus. \*  $p < 0.05$  compared with Sal/Sal group. Data are mean  $\pm$  SEM (n= 7-8 animals in each group).





**Fig. 3.** Effect of i.c.v. post pre-exposure administration of saline, boiled anti beta-endorphin antibody (BA $\beta$ ) or anti beta-endorphin antibody (A $\beta$ ) and i.p. immediately post training saline or arcaine (30 mg/kg) on freezing to context. Training to fear conditioning occurs 48h after pre-exposure to the open field or to the training apparatus. \*  $p < 0.05$  compared with Sal/Sal group. Data are the mean  $\pm$  SEM ( $n = 7$  animals in each group).

## **5. CONCLUSÕES**

---

## **5.CONCLUSÕES**

Com os resultados do presente estudo podemos concluir que:

- 1 – O efeito amnésico da arcaína depende da novidade.
- 2 - O bloqueio de receptores opióides com naloxona possibilita o efeito amnésico da arcaína em ratos pré-expostos ao mesmo ambiente de treinamento.
- 3 – A liberação de beta-endorphina endógena é necessária para o efeito amnésico da arcaína.

### **5.1 Conclusão geral**

O efeito amnésico da arcaína depende da novidade e do sistema opióide.

## **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abel T, Lattal KM (2001) Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Curr Opin Neurobiol* 11:180-187.
- Arletti R, Benelli A, Poggioli R, Luppi P, Menozzi B, Bertolini A (1995) Aged rats are still responsive to the antidepressant and memory-improving effects of oxytocin. *Neuropeptides* 29:177-182.
- Barros DM, Izquierdo LA, Medina JH, Izquierdo I (2003) Pharmacological findings contribute to the understanding of the main physiological mechanisms of memory retrieval. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2:81-94.
- Berlese DB, Sauzem PD, Carati MC, Guerra GP, Stiegemeier JA, Mello CF, Rubin MA (2005) Time-dependent modulation of inhibitory avoidance memory by spermidine in rats. *Neurobiol Learn Mem* 83:48-53.
- Bianchin M, Da Silva RC, Schmitz PK, Medina JH, Izquierdo I (1994) Memory of inhibitory avoidance in the rat is regulated by glutamate metabotropic receptors in the hippocampus. *Behav Pharmacol* 5:356-359.
- Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.
- Boehler CN, Bunzeck N, Krebs RM, Noesselt T, Schoenfeld MA, Heinze HJ, Munte TF, Woldorff MG, Hopf JM (2011) Substantia nigra activity level predicts trial-to-trial adjustments in cognitive control. *J Cogn Neurosci* 23:362-373.
- Bonaccorso C, Micale N, Ettari R, Grasso S, Zappala M (2011) Glutamate Binding-Site Ligands of NMDA Receptors. *Curr Med Chem* 18:5483-5506.
- Bouton ME (1993) Context, time, and memory retrieval in the interference paradigms of Pavlovian learning. *Psychol Bull* 114:80-99.
- Brioni JD, Arneric SP (1993) Nicotinic receptor agonists facilitate retention of avoidance training: participation of dopaminergic mechanisms. *Behav Neural Biol* 59:57-62.
- Burban A, Faucard R, Armand V, Bayard C, Vorobjev V, Arrang JM Histamine potentiates N-methyl-D-aspartate receptors by interacting with an allosteric site distinct from the polyamine binding site. *J Pharmacol Exp Ther* 332:912-921.
- Burgos-Robles A, Vidal-Gonzalez I, Santini E, Quirk GJ (2007) Consolidation of fear extinction requires NMDA receptor-dependent bursting in the ventromedial prefrontal cortex. *Neuron* 53:871-880.
- Cahill L, McGaugh JL (1998) Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. *Trends Neurosci* 21:294-299.
- Cahill L, Brioni J, Izquierdo I (1986) Retrograde memory enhancement by diazepam: its relation to anterograde amnesia, and some clinical implications. *Psychopharmacology (Berl)* 90:554-556.
- Camera K, Mello CF, Ceretta AP, Rubin MA (2007) Systemic administration of polyaminergic agents modulate fear conditioning in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 192:457-464.
- Cammarota M, Bevilaqua LR, Bonini JS, Rossatto JI, Medina JH, Izquierdo N (2004) Hippocampal glutamate receptors in fear memory consolidation. *Neurotox Res* 6:205-212.

- Cammarota M, Bevilaqua LR, Rossato JI, Lima RH, Medina JH, Izquierdo I (2008) Parallel memory processing by the CA1 region of the dorsal hippocampus and the basolateral amygdala. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:10279-10284.
- Caramanos Z, Shapiro ML (1994) Spatial memory and N-methyl-D-aspartate receptor antagonists APV and MK-801: memory impairments depend on familiarity with the environment, drug dose, and training duration. *Behav Neurosci* 108:30-43.
- Carter C (1994) *The Neuropharmacology of Polyamines*. American Press.
- Castellano C, Pavone F, Puglisi Allegra S (1984) Morphine and memory in DBA/2 mice: effects of stress and of prior experience. *Behav Brain Res* 11:3-10.
- Castellano C, Introini-Collison IB, McGaugh JL (1993) Interaction of beta-endorphin and GABAergic drugs in the regulation of memory storage. *Behav Neural Biol* 60:123-128.
- Castellano C, Cestari V, Ciamei A (2001a) NMDA receptors and learning and memory processes. *Curr Drug Targets* 2:273-283.
- Castellano C, Introini-Collison IB, Pavone F, McGaugh JL (1989) Effects of naloxone and naltrexone on memory consolidation in CD1 mice: involvement of GABAergic mechanisms. *Pharmacol Biochem Behav* 32:563-567.
- Castellano C, Cestari V, Ciamei A, Pavone F (1999) MK-801-induced disruptions of one-trial inhibitory avoidance are potentiated by stress and reversed by naltrexone. *Neurobiol Learn Mem* 72:215-229.
- Castellano MA, Rojas-Diaz D, Martin F, Quintero M, Alonso J, Navarro E, Gonzalez-Mora JL (2001b) Opposite effects of low and high doses of arginine on glutamate-induced nitric oxide formation in rat substantia nigra. *Neurosci Lett* 314:127-130.
- Ceretta AP, Camera K, Mello CF, Rubin MA (2008) Arcaine and MK-801 make recall state-dependent in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 201:405-411.
- Cestari V, Castellano C (1997) MK-801 potentiates morphine-induced impairment of memory consolidation in mice: involvement of dopaminergic mechanisms. *Psychopharmacology (Berl)* 133:1-6.
- Chaves ML, Bizzi JW, Palmieri AL, Izquierdo I (1988) Naltrexone blocks the enhancing effect of novel experiences on performance in memory tests in humans. *Neuropsychologia* 26:491-494.
- Coughenour LL, Barr BM (2001) Use of trifluoroperazine isolates a [(3)H]ifenprodil binding site in rat brain membranes with the pharmacology of the voltage-independent ifenprodil site on N-methyl-D-aspartate receptors containing NR2B subunits. *J Pharmacol Exp Ther* 296:150-159.
- Cutler MG, Mackintosh JH, Chance MR (1975) Effects of the environment on the behavioural response of mice to non-ataxic doses of ethyl alcohol. *Neuropharmacology* 14:841-846.
- Darvas M, Fadok JP, Palmiter RD (2011) Requirement of dopamine signaling in the amygdala and striatum for learning and maintenance of a conditioned avoidance response. *Learn Mem* 18:136-143.
- Davis AT, Fagerman KE, Downer FD, Dean RE (1986) Effect of enteral feeding bag composition and freezing and thawing upon vitamin stability in an enteral feeding solution. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 10:245-246.

- Do S, Luo JH, Qiu S (2011) [Mechanism of NMDA receptor-dependent neuronal survival and neuroprotection]. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 40:440-445.
- Duzel E, Bunzeck N, Guitart-Masip M, Duzel S (2010) NOvelty-related motivation of anticipation and exploration by dopamine (NOMAD): implications for healthy aging. *Neurosci Biobehav Rev* 34:660-669.
- Egerton A, Fusar-Poli P, Stone JM (2011) Glutamate and Psychosis Risk. *Curr Pharm Des*.
- Eichenbaum H (2001) The long and winding road to memory consolidation. *Nat Neurosci* 4:1057-1058.
- El-Ghundi M, O'Dowd BF, George SR (2007) Insights into the role of dopamine receptor systems in learning and memory. *Rev Neurosci* 18:37-66.
- Fanselow MS, Kim JJ, Young SL, Calcagnetti DJ, DeCola JP, Helmstetter FJ, Landeira-Fernandez J (1991) Differential effects of selective opioid peptide antagonists on the acquisition of pavlovian fear conditioning. *Peptides* 12:1033-1037.
- Fendt M, Fanselow MS (1999) The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neurosci Biobehav Rev* 23:743-760.
- Feng Y, He X, Yang Y, Chao D, Lazarus LH, Xia Y (2011) Current Research on Opioid Receptor Function. *Curr Drug Targets*.
- Ferry B, Roozendaal B, McGaugh JL (1999) Role of norepinephrine in mediating stress hormone regulation of long-term memory storage: a critical involvement of the amygdala. *Biol Psychiatry* 46:1140-1152.
- Flores-Soto ME, Chaparro-Huerta V, Escoto-Delgadillo M, Vazquez-Valls E, Gonzalez-Castaneda RE, Beas-Zarate C (2011) Structure and function of NMDA-type glutamate receptor subunits. *Neurologia*.
- Flores-Soto ME, Chaparro-Huerta V, Escoto-Delgadillo M, Vazquez-Valls E, Gonzalez-Castaneda RE, Beas-Zarate C (2012) Structure and function of NMDA-type glutamate receptor subunits. *Neurologia*.
- Frussa-Filho R, Ribeiro Rde A (2002) One-trial tolerance to the effects of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze is not due to acquisition of a phobic avoidance of open arms during initial exposure. *Life Sci* 71:519-525.
- Gomes GM, Mello CF, da Rosa MM, Bochi GV, Ferreira J, Barron S, Rubin MA (2010) Polyaminergic agents modulate contextual fear extinction in rats. *Neurobiol Learn Mem* 93:589-595.
- Guerra GP, Mello CF, Sauzem PD, Berlese DB, Furian AF, Tabarelli Z, Rubin MA (2006) Nitric oxide is involved in the memory facilitation induced by spermidine in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 186:150-158.
- Guerra GP, Mello CF, Bochi GV, Pazini AM, Fachinetti R, Dutra RC, Calixto JB, Ferreira J, Rubin MA (2011) Hippocampal PKA/CREB pathway is involved in the improvement of memory induced by spermidine in rats. *Neurobiol Learn Mem* 96:324-332.
- Gugliucci A (2004) Polyamines as clinical laboratory tools. *Clin Chim Acta* 344:23-35.
- Guijarro JZ, Tiba PA, Ferreira TL, Kawakami SE, Oliveira MG, Suchecki D (2007) Effects of brief and long maternal separations on the HPA axis activity and the performance of rats on context and tone fear conditioning. *Behav Brain Res* 184:101-108.

- Hartley CA, Fischl B, Phelps EA (2011) Brain structure correlates of individual differences in the acquisition and inhibition of conditioned fear. *Cereb Cortex* 21:1954-1962.
- Hedegaard M, Hansen KB, Andersen KT, Brauner-Osborne H, Traynelis SF (2011) Molecular pharmacology of human NMDA receptors. *Neurochem Int.*
- Hepner IJ, Homewood J, Taylor AJ (2002) Methadone disrupts performance on the working memory version of the Morris water task. *Physiol Behav* 76:41-49.
- Hill HE, Jones BE, Bell EC (1971) State dependent control of discrimination by morphine and pentobarbital. *Psychopharmacologia* 22:305-313.
- Hinderliter CF, Riccio DC (1977) Long-term effects of prior experience in attenuating amnesia. *Am J Psychol* 90:407-418.
- HM W (2003) Polyamines and their role in human disease: and introduction. *Biochem Soc Trans* 31: 354-355.
- Holmstrom L, Roberts PD, Portfors CV (2007) Responses to social vocalizations in the inferior colliculus of the mustached bat are influenced by secondary tuning curves. *J Neurophysiol* 98:3461-3472.
- Horisawa T, Ishibashi T, Nishikawa H, Enomoto T, Toma S, Ishiyama T, Taiji M (2011) The effects of selective antagonists of serotonin 5-HT<sub>7</sub> and 5-HT<sub>1A</sub> receptors on MK-801-induced impairment of learning and memory in the passive avoidance and Morris water maze tests in rats: mechanistic implications for the beneficial effects of the novel atypical antipsychotic lurasidone. *Behav Brain Res* 220:83-90.
- Hu NW, Ondrejcek T, Rowan MJ (2011) Glutamate receptors in preclinical research on Alzheimer's disease: Update on recent advances. *Pharmacol Biochem Behav* 100:855-862.
- Igarashi K, Kashiwagi K (2000) Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochem Biophys Res Commun* 271:559-564.
- Iwata J, LeDoux JE (1988) Dissociation of associative and nonassociative concomitants of classical fear conditioning in the freely behaving rat. *Behav Neurosci* 102:66-76.
- Izquierdo I (1979) Effect of naloxone and morphine on various forms of memory in the rat: possible role of endogenous opiate mechanisms in memory consolidation. *Psychopharmacology (Berl)* 66:199-203.
- Izquierdo I (2002) Memória.
- Izquierdo I, McGaugh JL (1985) Effect of a novel experience prior to training or testing on retention of an inhibitory avoidance response in mice: involvement of an opioid system. *Behav Neural Biol* 44:228-238.
- Izquierdo I, McGaugh JL (1987) Effect of novel experiences on retention of inhibitory avoidance behavior in mice: the influence of previous exposure to the same or another experience. *Behav Neural Biol* 47:109-115.
- Izquierdo I, Pereira ME (1989) Post-training memory facilitation blocks extinction but not retroactive interference. *Behav Neural Biol* 51:108-113.
- Izquierdo I, Medina JH (1995) Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. *Neurobiol Learn Mem* 63:19-32.



- 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.
- Izquierdo I, McGaugh JL (2000) Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. *Behav Pharmacol* 11:517-534.
- Izquierdo I, Barcik NR, Brioni JD (1989) Pretest beta-endorphin and epinephrine, but not oxotremorine, reverse retrograde interference of a conditioned emotional response in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 33:545-548.
- Izquierdo I, Schroder N, Netto CA, Medina JH (1999) Novelty causes time-dependent retrograde amnesia for one-trial avoidance in rats through NMDA receptor- and CaMKII-dependent mechanisms in the hippocampus. *Eur J Neurosci* 11:3323-3328.
- Izquierdo I, da Cunha C, Rosat R, Jerusalinsky D, Ferreira MB, Medina JH (1992) Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. *Behav Neural Biol* 58:16-26.
- Izquierdo I, Vianna MR, Izquierdo LA, Barros DM, Szapiro G, Coitinho AS, Muller L, Cammarota M, Bevilaqua LR, Medina JH (2002) Memory retrieval and its lasting consequences. *Neurotox Res* 4:573-593.
- Jackson A, Koek W, Colpaert FC (1992) NMDA antagonists make learning and recall state-dependent. *Behav Pharmacol* 3:415-421.
- Johansson T, Elfverson M, Zhou Q, Nyberg F (2010) Allosteric modulation of the NMDA receptor by neurosteroids in rat brain and the impact of long term morphine administration. *Biochem Biophys Res Commun* 401:504-508.
- Kakade S, Dayan P (2002) Dopamine: generalization and bonuses. *Neural Netw* 15:549-559.
- Kalac P KP (2005) A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chem* 90:219-230.
- Kalisch R, Holt B, Petrovic P, De Martino B, Kloppel S, Buchel C, Dolan RJ (2009) The NMDA agonist D-cycloserine facilitates fear memory consolidation in humans. *Cereb Cortex* 19:187-196.
- Kerchner GA, Nicoll RA (2008) Silent synapses and the emergence of a postsynaptic mechanism for LTP. *Nat Rev Neurosci* 9:813-825.
- Kim JJ, Jung MW (2006) Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: a critical review. *Neurosci Biobehav Rev* 30:188-202.
- Kishi A, Ohno M, Watanabe S (1998) Spermidine, a polyamine site agonist, attenuates working memory deficits caused by blockade of hippocampal muscarinic receptors and mGluRs in rats. *Brain Res* 793:311-314.
- Knight R (1996) Contribution of human hippocampal region to novelty detection. *Nature* 383:256-259.
- Kowarik MC, Einhauser J, Jochim B, Buttner A, Tolle TR, Riemenschneider M, Platzer S, Berthele A (2011) Impact of the COMT Val(108/158)Met polymorphism on the mu-opioid receptor system in the human brain: Mu-opioid receptor, met-enkephalin and beta-endorphin expression. *Neurosci Lett* 506:214-219.
- Kreek MJ LK (2007) Stress responsivity addiction and a functional variant of the human Mu-opioid receptor gene. *7:74-78.*

- LeDoux J (1998) Fear and the brain: where have we been, and where are we going? *Biol Psychiatry* 44:1229-1238.
- Lees GV, Jones EG, Kandel E (2000) Expressive genes record memories. *Neurobiol Dis* 7:533-536.
- Lisman JE, Grace AA (2005) The hippocampal-VTA loop: controlling the entry of information into long-term memory. *Neuron* 46:703-713.
- Liu JL, Li M, Dang XR, Wang ZH, Rao ZR, Wu SX, Li YQ, Wang W (2009) A NMDA receptor antagonist, MK-801 impairs consolidating extinction of auditory conditioned fear responses in a Pavlovian model. *PLoS One* 4:e7548.
- Liu MG, Wang RR, Chen XF, Zhang FK, Cui XY, Chen J (2011) Differential roles of ERK, JNK and p38 MAPK in pain-related spatial and temporal enhancement of synaptic responses in the hippocampal formation of rats: multi-electrode array recordings. *Brain Res* 1382:57-69.
- Lynch DR, Lenz S, Anegawa NJ, Dichter M, Pritchett DB (1995) Pharmacological characterisation of heterodimeric NMDA receptors composed of NR1A and 2B subunits: differences with receptors formed from NR1A and 2A. *Neurochem Int* 146:68-64.
- Marek P, Ben-Eliyahu S, Gold M, Liebeskind JC (1991) Excitatory amino acid antagonists (kynurenic acid and MK-801) attenuate the development of morphine tolerance in the rat. *Brain Res* 547:77-81.
- Maren S (2005) Synaptic mechanisms of associative memory in the amygdala. *Neuron* 47:783-786.
- Maren S, Yap SA, Goosens KA (2001) The amygdala is essential for the development of neuronal plasticity in the medial geniculate nucleus during auditory fear conditioning in rats. *J Neurosci* 21:RC135.
- Mariani RK, Mello CF, Rosa MM, Ceretta AP, Camera K, Rubin MA (2011) Effect of naloxone and morphine on arcaïne-induced state-dependent memory in rats. *Psychopharmacology (Berl)*.
- Marton LJ, Pegg AE (1995) Polyamines as targets for therapeutic intervention. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35:55-91.
- Masuko T, Yoshida S, Metori K, Kizawa Y, Kusama T, Miyake M (2010) Synthesis of water-soluble polyamine derivatives effective as N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 58:862-867.
- McGaugh JL, Izquierdo I (2000) The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. *Trends Pharmacol Sci* 21:208-210.
- Medina JH, Izquierdo I (1995) Retrograde messengers, long-term potentiation and memory. *Brain Res Brain Res Rev* 21:185-194.
- Medina JH, Bekinschtein P, Cammarota M, Izquierdo I (2008) Do memories consolidate to persist or do they persist to consolidate? *Behav Brain Res* 192:61-69.
- Mesulam MM (1998) From sensation to cognition. *Brain* 121 ( Pt 6):1013-1052.
- Meyer RC, Knox J, Purwin DA, Spangler EL, Ingram DK (1998) Combined stimulation of the glycine and polyamine sites of the NMDA receptor attenuates NMDA blockade-induced learning deficits of rats in a 14-unit T-maze. *Psychopharmacology (Berl)* 135:290-295.
- Mikolajczak P, Okulicz-Kozaryn I, Kaminska E, Niedopad L, Polanska A, Gebka J (2002) Effects of acamprosate and some polyamine site ligands of

- NMDA receptor on short-term memory in rats. *Eur J Pharmacol* 444:83-96.
- Miller RR, Kaspro WJ, Schachtman TR (1986) Retrieval variability: sources and consequences. *Am J Psychol* 99:145-218.
- Miller RR, Barnett RC, Grahame NJ (1992) Responding to a conditioned stimulus depends on the current associative status of other cues present during training of that specific stimulus. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 18:251-264.
- Milner B, Squire LR, Kandel ER (1998) Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* 20:445-468.
- Moinard C, Cynober L, de Bandt JP (2005) Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clin Nutr* 24:184-197.
- Monaghan DT, Cotman CW (1985) Distribution of N-methyl-D-aspartate-sensitive L-[3H]glutamate-binding sites in rat brain. *J Neurosci* 5:2909-2919.
- Mony L, Zhu S, Carvalho S, Paoletti P (2011) Molecular basis of positive allosteric modulation of GluN2B NMDA receptors by polyamines. *Embo J* 30:3134-3146.
- Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg PH (1992) Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 256:1217-1221.
- Morgan DM (1999) Polyamines. An overview. *Mol Biotechnol* 11:229-250.
- Netto CA, Oliveira CB, Gianlupi A, Quillfeldt J, Izquierdo I (1989) Beta-endorphin and electroconvulsive shock alter the retrieval of two avoidance tasks when given after the first, but not the second, training session. *Braz J Med Biol Res* 22:199-204.
- Netto CA, Cavalheiro EA, Carrasco MA, Volkmer N, Dias RD, Izquierdo I (1985) Response of the rat brain beta-endorphin system to novelty: importance of the fornix connection. *Behav Neural Biol* 43:37-46.
- Newpher TM, Ehlers MD (2009) Spine microdomains for postsynaptic signaling and plasticity. *Trends Cell Biol* 19:218-227.
- Nicholson AM, Methner DN, Ferreira A (2011) Membrane cholesterol modulates {beta}-amyloid-dependent tau cleavage by inducing changes in the membrane content and localization of N-methyl-D-aspartic acid receptors. *J Biol Chem* 286:976-986.
- Oishi R, Nishibori M, Itoh Y, Saeki K, Fukuda T, Araki Y (1988) Histamine turnover in the brain of morphine-dependent mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 337:58-63.
- Okada Y, Tsuda Y, Bryant SD, Lazarus LH (2002) Endomorphins and related opioid peptides. *Vitam Horm* 65:257-279.
- Ouameur AA, Mangier E, Diamantoglou S, Rouillon R, Carpentier R, Tajmir-Riahi HA (2004) Effects of organic and inorganic polyamine cations on the structure of human serum albumin. *Biopolymers* 73:503-509.
- Pagani JH, Lee HJ, Young WS, 3rd (2011) Postweaning, forebrain-specific perturbation of the oxytocin system impairs fear conditioning. *Genes Brain Behav*.
- Patti CL, Kameda SR, Carvalho RC, Takatsu-Coleman AL, Lopez GB, Niigaki ST, Abilio VC, Frussa-Filho R, Silva RH (2006) Effects of morphine on the plus-maze discriminative avoidance task: role of state-dependent learning. *Psychopharmacology (Berl)* 184:1-12.

- Pavone F, Castellano C (1985) Effects of tifiudom on passive avoidance behaviour in DBA/2 mice. *Behav Brain Res* 15:177-181.
- Pearce JM, Hall G (1980) A model for Pavlovian learning: variations in the effectiveness of conditioned but not of unconditioned stimuli. *Psychol Rev* 87:532-552.
- Pegg AE, McCann PP (1982) Polyamine metabolism and function. *Am J Physiol* 243:C212-221.
- Quevedo J, Moretto A, Colvero M, Roesler R, Ferreira MB (1997) The N-methyl-D-aspartate receptor blocker MK-801 prevents the facilitatory effects of naloxone and epinephrine on retention of inhibitory avoidance task in rats. *Behav Pharmacol* 8:471-474.
- Ramanan N, Shen Y, Sarsfield S, Lemberger T, Schutz G, Linden DJ, Ginty DD (2005) SRF mediates activity-induced gene expression and synaptic plasticity but not neuronal viability. *Nat Neurosci* 8:759-767.
- Ransom RW, Stec NL (1988) Cooperative modulation of [3H]MK-801 binding to the N-methyl-D-aspartate receptor-ion channel complex by L-glutamate, glycine, and polyamines. *J Neurochem* 51:830-836.
- Raymond LA, Andre VM, Cepeda C, Gladding CM, Milnerwood AJ, Levine MS (2011) Pathophysiology of Huntington's disease: time-dependent alterations in synaptic and receptor function. *Neuroscience* 198:252-273.
- Reed P, Croft H, Yeomans M (1996) Rats' memory for serially presented novel flavours: evidence for non-spatial primacy effects. *Q J Exp Psychol B* 49:174-187.
- Reynolds IJ (1990) Arcaine uncovers dual interactions of polyamines with the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 255:1001-1007.
- Roberts AJ, Hedlund PB (2011) The 5-HT(7) receptor in learning and memory. *Hippocampus*.
- Rock DM, Macdonald RL (1995) Polyamine regulation of N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35:463-482.
- Roesler R, Vianna M, Sant'Anna MK, Kuyven CR, Krueel AV, Quevedo J, Ferreira MB (1998) Intrahippocampal infusion of the NMDA receptor antagonist AP5 impairs retention of an inhibitory avoidance task: protection from impairment by pretraining or preexposure to the task apparatus. *Neurobiol Learn Mem* 69:87-91.
- Roesler R, Schroder N, Vianna MR, Quevedo J, Bromberg E, Kapczinski F, Ferreira MB (2003) Differential involvement of hippocampal and amygdalar NMDA receptors in contextual and aversive aspects of inhibitory avoidance memory in rats. *Brain Res* 975:207-213.
- Roesler R, Reolon GK, Luft T, Martins MR, Schroder N, Vianna MR, Quevedo J (2005) NMDA receptors mediate consolidation of contextual memory in the hippocampus after context preexposure. *Neurochem Res* 30:1407-1411.
- Roesler R, Mcgaugh (2010) Memory consolidation - book chapter
- Rosat R, Da-Silva RC, Zanatta MS, Medina JH, Izquierdo I (1992) Memory consolidation of a habituation task: role of N-methyl-D-aspartate, cholinergic muscarinic and GABA-A receptors in different brain regions. *Braz J Med Biol Res* 25:267-273.
- Rubin MA, Boemo RL, Jurach A, Rojas DB, Zanolli GR, Obregon AD, Souza DO, Mello CF (2000) Intrahippocampal spermidine administration

- improves inhibitory avoidance performance in rats. *Behav Pharmacol* 11:57-61.
- Rubin MA, Stiegemeier JA, Volkweis MA, Oliveira DM, Fenili AC, Boemo RL, Jurach A, Mello CF (2001) Intra-amygdala spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. *Eur J Pharmacol* 423:35-39.
- Rubin MA, Berlese DB, Stiegemeier JA, Volkweis MA, Oliveira DM, dos Santos TL, Fenili AC, Mello CF (2004) Intra-amygdala administration of polyamines modulates fear conditioning in rats. *J Neurosci* 24:2328-2334.
- Rudy JW (1996a) Scopolamine administered before and after training impairs both contextual and auditory-cue fear conditioning. *Neurobiol Learn Mem* 65:73-81.
- Rudy JW (1996b) Postconditioning isolation disrupts contextual conditioning: an experimental analysis. *Behav Neurosci* 110:238-246.
- Rudy JW, Pugh CR (1996) A comparison of contextual and generalized auditory-cue fear conditioning: evidence for similar memory processes. *Behav Neurosci* 110:1299-1308.
- Rudy JW, Kuwagama K, Pugh CR (1999) Isolation reduces contextual but not auditory-cue fear conditioning: a role for endogenous opioids. *Behav Neurosci* 113:316-323.
- Ruiz-Chica J, Medina MA, Sanchez-Jimenez F, Ramirez FJ (2003) Raman spectroscopy study of the interaction between biogenic polyamines and an alternating AT oligodeoxyribonucleotide. *Biochim Biophys Acta* 1628:11-21.
- Sacaan AI, Johnson KM (1990) Characterization of the stimulatory and inhibitory effects of polyamines on [3H]N-(1-[thienyl]cyclohexyl) piperidine binding to the N-methyl-D-aspartate receptor ionophore complex. *Mol Pharmacol* 37:572-577.
- Salmina AB, Okuneva OS, Mikhutkina SV, Malinovskaya NA, Morgun AV, Zykova LD, Yudin GV, Laletin DV, Fursov MA, Frolova OV, Tagaeva GA, Bolshakova EV (2011) Perinatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury Affects the Glutamatergic Signal Transduction Coupled with Neuronal ADP-Ribosyl Cyclase Activity. *Bull Exp Biol Med* 150:583-586.
- Salter MW, Pitcher GM (2011) Dysregulated Src upregulation of NMDA receptor activity: a common link in chronic pain and schizophrenia. *Febs J* 279:2-11.
- Santini E, Muller RU, Quirk GJ (2001) Consolidation of extinction learning involves transfer from NMDA-independent to NMDA-dependent memory. *J Neurosci* 21:9009-9017.
- Savic MM, Milinkovic MM, Rallapalli S, Clayton T, Sr., Joksimovic S, Van Linn M, Cook JM (2009) The differential role of alpha1- and alpha5-containing GABA(A) receptors in mediating diazepam effects on spontaneous locomotor activity and water-maze learning and memory in rats. *Int J Neuropsychopharmacol* 12:1179-1193.
- Schenberg EE, Soares JC, Oliveira MG (2005) Effects of pre- or post-training entorhinal cortex AP5 injection on fear conditioning. *Physiol Behav* 86:508-515.
- Schultz W (1998) The phasic reward signal of primate dopamine neurons. *Adv Pharmacol* 42:686-690.

- Schwartz BL, Hashtroudi S, Herting RL, Schwartz P, Deutsch SI (1996) d-Cycloserine enhances implicit memory in Alzheimer patients. *Neurology* 46:420-424.
- Scott RH, Sutton KG, Dolphin AC (1993) Interactions of polyamines with neuronal ion channels. *Trends Neurosci* 16:153-160.
- Seiler N (2004) Catabolism of polyamines. *Amino Acids* 26:217-233.
- Seiler N, Lamberty U (1975) Interrelations between polyamines and nucleic acids: changes of polyamine and nucleic acid concentrations in the developing rat brain. *J Neurochem* 24:5-13.
- Seiler N, Raul F (2005) Polyamines and apoptosis. *J Cell Mol Med* 9:623-642.
- Shapiro ML, O'Connor C (1992) N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 and spatial memory representation: working memory is impaired in an unfamiliar environment but not in a familiar environment. *Behav Neurosci* 106:604-612.
- Shiigi Y, Kaneto H (1990) Facilitation of memory retrieval by pre-test morphine and its state dependency in the step-through type passive avoidance learning test in mice. *Jpn J Pharmacol* 54:79-81.
- Shimada A, Spangler EL, London ED, Ingram DK (1994) Spermidine potentiates dizocilpine-induced impairment of learning performance by rats in a 14-unit T-maze. *Eur J Pharmacol* 263:293-300.
- Siegel S (1988) State dependent learning and morphine tolerance. *Behav Neurosci* 102:228-232.
- Slipczuk L, Bekinschtein P, Katche C, Cammarota M, Izquierdo I, Medina JH (2009) BDNF activates mTOR to regulate GluR1 expression required for memory formation. *PLoS One* 4:e6007.
- Sokolov EN (1963) Higher nervous functions; the orienting reflex. *Annu Rev Physiol* 25:545-580.
- Tabor CW, Tabor H (1984) Polyamines. *Annu Rev Biochem* 53:749-790.
- Tadano T, Hozumi S, Yamadera F, Murata A, Niijima F, Tan-No K, Nakagawasai O, Kisara K (2004) Effects of NMDA receptor-related agonists on learning and memory impairment in olfactory bulbectomized mice. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 26:93-97.
- Taylor DA (2011) In vitro opioid receptor assays. *Curr Protoc Pharmacol* Chapter 4:Unit4 8.
- Teti D, Visalli M, McNair H (2002) Analysis of polyamines as markers of (patho)physiological conditions. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 781:107-149.
- Thiel CM, Huston JP, Schwarting RK (1998) Hippocampal acetylcholine and habituation learning. *Neuroscience* 85:1253-1262.
- Thomas T, Thomas TJ (2001) Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol Life Sci* 58:244-258.
- Trujillo KA, Akil H (1994) Inhibition of opiate tolerance by non-competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. *Brain Res* 633:178-188.
- Ueda H (1989) [Molecular pharmacology of opioid receptor mechanisms]. *Nihon Yakurigaku Zasshi* 94:339-349.
- Urdiales JL MM, Sanchez-Jimenez F (2001) Polyamine metabolism revisited. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 13:1015-1019.
- Van der Zee EA, Douma BR, Bohus B, Luiten PG (1994) Passive avoidance training induces enhanced levels of immunoreactivity for muscarinic

- acetylcholine receptor and coexpressed PKC gamma and MAP-2 in rat cortical neurons. *Cereb Cortex* 4:376-390.
- Voglis G, Tavernarakis N (2006) The role of synaptic ion channels in synaptic plasticity. *EMBO Rep* 7:1104-1110.
- Wallace HM (2009) The polyamines: past, present and future. *Essays Biochem* 46:1-9.
- Whetsell WO, Jr. (1996) Current concepts of excitotoxicity. *J Neuropathol Exp Neurol* 55:1-13.
- Williams K (1997a) Modulation and block of ion channels: a new biology of polyamines. *Cell Signal* 9:1-13.
- Williams K (1997b) Interactions of polyamines with ion channels. *Biochem J* 325 ( Pt 2):289-297.
- Williams K (2009) Extracellular Modulation of NMDA Receptors.
- Wolfman C, Izquierdo LA, Schroder N, Izquierdo I (1999) Intra-hippocampal KN-62 hinders the memory of habituation acquired alone, but not simultaneously with a water-finding task. *Behav Pharmacol* 10:99-104.
- Xiaoping G, Xiaofang Z, Yaguo Z, Juan Z, Junhua W, Zhengliang M (2011) Involvement of the spinal NMDA receptor/PKCgamma signaling pathway in the development of bone cancer pain. *Brain Res* 1335:83-90.
- Xu L, Anwyl R, Rowan MJ (1998) Spatial exploration induces a persistent reversal of long-term potentiation in rat hippocampus. *Nature* 394:891-894.
- Zadina JE, Martin-Schild S, Gerall AA, Kastin AJ, Hackler L, Ge LJ, Zhang X (1999) Endomorphins: novel endogenous mu-opiate receptor agonists in regions of high mu-opiate receptor density. *Ann N Y Acad Sci* 897:136-144.
- Zarrindast MR, Fazli-Tabaei S, Ahmadi S, Yahyavi SH (2006a) Effect of lithium on morphine state-dependent memory of passive avoidance in mice. *Physiol Behav* 87:409-415.
- Zarrindast MR, Askari E, Khalilzadeh A, Nouraei N (2006b) Morphine state-dependent learning sensitization and interaction with nitric oxide. *Pharmacology* 78:66-71.
- Zarrindast MR, Jafari-Sabet M, Rezayat M, Djahanguiri B, Rezayof A (2006c) Involvement of NMDA receptors in morphine state-dependent learning in mice. *Int J Neurosci* 116:731-743.
- Zarrindast MR, Noorbakhshnia M, Motamedi F, Haeri-Rohani A, Rezayof A (2006d) Effect of the GABAergic system on memory formation and state-dependent learning induced by morphine in rats. *Pharmacology* 76:93-100.
- Zarrindast MR, Bananej M, Khalilzadeh A, Fazli-Tabaei S, Haeri-Rohani A, Rezayof A (2006e) Influence of intracerebroventricular administration of dopaminergic drugs on morphine state-dependent memory in the step-down passive avoidance test. *Neurobiol Learn Mem* 86:286-292.
- Zigmond MJ BF, Landis SC, Roberts JL, Squire LR (1999) *Fundamental Neuroscience*. London: Academic Press.