

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

**A MELHORA DA RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA
INDUZIDA POR ESPERMIDINA ENVOLVE A
PROTEÍNA CINASE DEPENDENTE DE CÁLCIO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Bruna Amanda Girardi

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

**A MELHORA DA RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA
INDUZIDA POR ESPERMIDINA ENVOLVE A
PROTEÍNA CINASE DEPENDENTE DE CÁLCIO**

por

Bruna Amanda Girardi

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maribel Antonello Rubin

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

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

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

**A MELHORA DA RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA INDUZIDA POR
ESPERMIDINA ENVOLVE A PROTEÍNA CINASE DEPENDENTE DE
CÁLCIO**

elaborada por
Bruna Amanda Girardi

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

Comissão examinadora:

Prof. Dr^a. Maribel Antonello Rubin (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Prof. Dr^a. Nilda Berenice de Vargas Barbosa (UFSM)

Prof. Dr. Denis Rosemberg (UFSM)

Santa Maria, 21 de julho de 2015.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por guiar meus caminhos e me dar forças nas horas mais difíceis.

Aos meus pais e, meus irmãos que estiveram comigo desde o início da minha caminhada. Obrigada por acreditarem na minha formação profissional, por serem a base de meus princípios e meu porto seguro.

À minha madrinha, Leonita, pela ajuda nos momentos mais difíceis, pelo incentivo, carinho e compreensão.

Ao meu namorado, Luis, pelo amor, incentivo e paciência. Obrigada por estar ao meu lado.

As minhas queridas e sempre disponíveis amigas Vanuza e Cleonir.

Aos colegas do LabNeuro que tornaram minha caminhada mais leve. Por dividirem os dias comigo, pela amizade, ajuda e pelos momentos alegres que vivenciamos juntos. Que essa convivência melhore a cada dia que ainda passaremos juntos.

À minha orientadora, Maribel, pela oportunidade de fazer parte do grupo LabNeuro, pela orientação e dedicação. Ao professor Carlos pela orientação.

Aos professores da banca, Denis e Nilda, por avaliarem este trabalho; à Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia; e à CAPES pela bolsa de estudos concedida.

RESUMO

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

A MELHORA DA RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA INDUZIDA POR ESPERMIDINA ENVOLVE A PROTEÍNA CINASE DEPENDENTE DE CÁLCIO

AUTORA: Bruna Amanda Girardi
ORIENTADORA: Dr^a Maribel Antonello Rubin
Local e Data da Defesa: Santa Maria, 21 de julho de 2015.

A reativação de uma memória resulta na sua desestabilização, que exigem um processo de reconsolidação de memória para mantê-la. A espermidina é uma amina alifática endógena com estrutura policatiônica que modula a atividade do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) e melhora a memória. Evidências recentes sugerem que a administração sistêmica de espermidina melhora a reconsolidação da memória de medo. No entanto não se sabe se a administração intra hipocampal de espermidina melhora a reconsolidação da memória e nem se a proteína cinase dependente de cálcio (PKC) e síntese proteica estão envolvidas neste efeito. Portanto, no presente estudo verificou-se o envolvimento da PKC e da síntese proteica na melhora da reconsolidação da memória do medo induzida pela administração intrahipocampal (ih) de espermidina em ratos. Ratos Wistar machos foram treinados na tarefa de medo condicionado contextual utilizando-se choque de 0,4 mA como estímulo incondicionado. Vinte e quatro horas após o treino, os animais foram re-expostos ao aparelho na ausência de choque (sessão reativação). Imediatamente após a sessão de reativação foram administradas, por via ih, espermidina (2-200 pmol/sítio); o inibidor da PKC, 3- [1- (dimetilaminopropil) indol-3-il] -4- (indol-3-il) maleimida (GF 109203X, 0,3-30 pg/sítio); o antagonista do sítio de ligação das poliaminas no receptor de NMDA, arcaína (0,2-200 pmol/sítio) ou o ativador de PKC, 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA, 0,02-2 nmol/sítio). Os testes foram realizados no mesmo aparelho, 24 horas após a sessão de reativação. O tempo de imobilidade dos animais durante o teste foi considerado como medida de memória. Enquanto a administração de espermidina (20 e 200 pmol/sítio) melhorou, GF 109203X (1, 10 e 30 pg/sítio) prejudicou a reconsolidação da memória. O GF 109203X (0,3 pg/sítio) preveniu a melhora da reconsolidação da memória induzida por espermidina (200 pmol/sítio). A administração da arcaína (200 pmol/sítio) prejudicou e PMA (2 nmol/sítio) melhorou a reconsolidação da memória. O PMA (0,2 nmol/sítio) preveniu o prejuízo na reconsolidação da memória induzido por arcaína (200 pmol/sítio). O inibidor de síntese de proteica, anisomicina (2 ug/sítio) preveniu a melhora da reconsolidação da memória induzida por espermidina (200 pmol/sítio). Estas drogas não tiveram nenhum efeito sobre a memória quando foram administrados na ausência da sessão de reativação. Estes resultados sugerem que a melhora da reconsolidação da memória induzida pela administração ih de espermidina envolve a síntese proteica e a ativação de PKC.

Palavras-chave: Poliaminas, hipocampo, reconsolidação da memória, proteína cinase C, medo condicionado contextual.

ABSTRACT

Dissertation of Master's degree
Post Graduation Program in Pharmacology
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

SPERMIDINE-INDUCED IMPROVEMENT OF RECONSOLIDATION OF MEMORY INVOLVES CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE

AUTHOR: Bruna Amanda Girardi
ADVISOR: Dr^a Maribel Antonello Rubin
Place and date of defense: Santa Maria, July 21th, 2015.

The reactivation of a memory results in its destabilization, requiring a process of memory reconsolidation to maintain it. Spermidine is an endogenous aliphatic amine with polycationic structure that modulates N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor activity and improves memory. Recent evidence suggests that systemic administration of spermidine improves the reconsolidation of fear memory. Here we determined whether the calcium-dependent protein kinase (PKC) signaling pathway is involved in the improvement of fear memory reconsolidation induced by intrahippocampal (ih) administration of spermidine in rats. Male Wistar rats were trained in a fear conditioning apparatus using a 0.4 mA footshock as unconditioned stimulus. Twenty-four hours after training, animals were re-exposed to the apparatus in the absence of shock (reactivation session). Immediately after the reactivation session, spermidine (2-200 $\mu\text{mol}/\text{site}$); the PKC inhibitor, 3-[1-(dimethylaminopropyl)indol-3-yl]-4-(indol-3-yl) maleimide hydrochloride (GF 109203X, 0.3 - 30 $\mu\text{g}/\text{site}$); the antagonist of the polyamine-binding site at the NMDA receptor, arcaine (0.2 - 200 $\mu\text{mol}/\text{site}$) or the PKC activator, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 0.02 - 2 nmol/site) were injected intra-hipocampally (i.h.). Testing was carried out in the same apparatus, twenty-four hours after reactivation. Freezing scores at testing were considered a measure of memory. While the post-reactivation administration of spermidine (20 and 200 $\mu\text{mol}/\text{site}$) improved, GF 109203X (1, 10 and 30 $\mu\text{g}/\text{site}$) impaired memory reconsolidation. GF 109203X (0.3 $\mu\text{g}/\text{site}$) prevented spermidine (200 $\mu\text{mol}/\text{site}$)-induced improvement of memory reconsolidation. The post-reactivation administration of arcaine (200 $\mu\text{mol}/\text{site}$) impaired and PMA (2 nmol/site) improved memory reconsolidation. PMA (0.2 nmol/site) prevented arcaine (200 $\mu\text{mol}/\text{site}$)-induced impairment of memory reconsolidation. The protein synthesis inhibitor anisomycin (2 $\mu\text{g}/\text{site}$) prevented spermidine (200 $\mu\text{mol}/\text{site}$)-induced improvement of memory reconsolidation. These drugs had no effect on memory if they were administered in the absence of reactivation. These results suggest that the enhancement of memory reconsolidation induced by the administration of spermidine involves PKC activation.

Keywords: Polyamines; hippocampus; memory reconsolidation; protein kinase C; contextual fear conditioning.

FIGURA

Figura 1- Classificação da memória segundo a natureza	11
Figura 2- Fases da memória	12
Figura 3- Isoforma da PKC.....	16
Figura 4- Estrutura do receptor NMDA	19
Figura 5- Estrutura química das poliaminas	20
Figura 6- Sítios de modulação alostérica do receptor NMDA.....	22
Figura 7- Metabolismo das poliaminas	24

QUADRO

Quadro 1: Classificação das isoformas da PKC.....	16
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ADC	Arginina descarboxilase
AP5	Ácido-D-2-amino-5-fosfonopentanóico
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico
ANI	Anisomicina
ARC	Sulfato de 1,4-diguanidino
BDNF	Fator neurotrófico derivado do encéfalo
CaMKII	Proteína cinase cálcio-calmodulina dependente
CREB	Proteína ligante do elemento responsivo do AMPc
ERK	Cinase reguladora de sinalização extracelular
GF 109203X	3-[1(dimetil aminopropil) indol-3-il]-4-(indol-3-il) maleimida hidrocloreto
MK-801	(+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,b]-ciclohepteno-5-10-amino
NMDAr	Receptor <i>N</i> -metil-D-aspartato
ODC	Ornitina descarboxilase
PAO	Poliamina oxidase
PBS	Solução de tampão fosfato salina
PMA	12-miristato 13-acetato de forbol
PKA	Proteína cinase dependente de AMPc
PKC	Proteína cinase dependente de cálcio
SNC	Sistema Nervoso Central
SPD	Espermidina
SSAT	Espermidina/espermina acetiltransferase
SAMDC	S-adenosil-metionina Descarboxilase

SUMÁRIO

RESUMO.....	4
ABSTRACT	5
LISTA DE FIGURAS	6
QUADRO.....	7
LISTA DE ABREVIATURAS	8
1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Memória	10
1.2 Reconsolidação da memória	13
1.3 Proteína cinase depende de cálcio (PKC).....	15
1.4 Receptor N-metil-D-Aspartato.....	17
1.5 Poliaminas.....	19
1.5.1 Metabolismo das poliaminas.....	22
1.5.2 Poliaminas e memória.....	24
1.6 Receptor NMDA, poliaminas e reconsolidação da Memória.....	25
1.7 Medo condicionado.....	26
1.8 Justificativa.....	26
2. OBJETIVOS.....	28
2.1 OBJETIVO GERAL.....	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
3. MANUSCRITO	29
4. CONCLUSÕES.....	53
4.1 CONCLUSÕES PARCIAIS.....	53
4.2 CONCLUSÃO GERAL.....	53
5. PERSPECTIVAS.....	54
6. REFERÊNCIAS.....	55

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Memória

Memória é definida como o processo de aquisição, formação ou consolidação e evocação de informações adquiridas (IZQUIERDO I, 2011; IZQUIERDO, 2002). A aquisição é conhecida como aprendizado e, novos aprendizados ou informações adquiridas podem, ou não, ser armazenados de forma permanente para serem recuperados ou evocados sempre que necessário (IZQUIERDO, 2002; BADDELY & NAVARRO, 1999).

Devido a sua complexidade, a memória pode ser classificada de acordo com o seu conteúdo e o seu tempo de duração. De acordo com o conteúdo, podemos classificar as memórias em declarativas (explícitas) e não declarativas (implícitas). As memórias declarativas (explícitas) são aquelas associadas a eventos ou conhecimentos e que podem ser evocadas pelo consciente e as quais conseguimos verbalizar. As memórias declarativas podem ser divididas em episódicas e semânticas. As memórias episódicas são aquelas referentes a eventos aos quais assistimos ou dos quais participamos, como a lembrança de nossa formatura, de um rosto ou de um filme. As memórias semânticas são aquelas de conhecimentos gerais, como o conhecimento de português, medicina ou do perfume das rosas. As memórias não declarativas (implícitas) são aquelas manifestadas por meio de comportamentos motores ou sensoriais (MÜLLER & SCHUMANN, 2011). Em comparação com as memórias declarativas, as memórias não declarativas são aquelas evocadas pelo inconsciente e que não conseguimos verbalizar, como o fato de sabermos andar de bicicleta, nadar, saltar (BEAR *et al.*, 2008; STICKGOLD, 2005; IZQUIERDO, 2002).

Em pesquisas com animais, a classificação previamente mencionada pode ser difícil de aplicar, principalmente pela complexidade que a memória pode ser avaliada em outras espécies. A figura 1 mostra essa classificação segundo a

natureza associativa ou não associativa e, alguns exemplos de modelos comportamentais em roedores para sua avaliação.

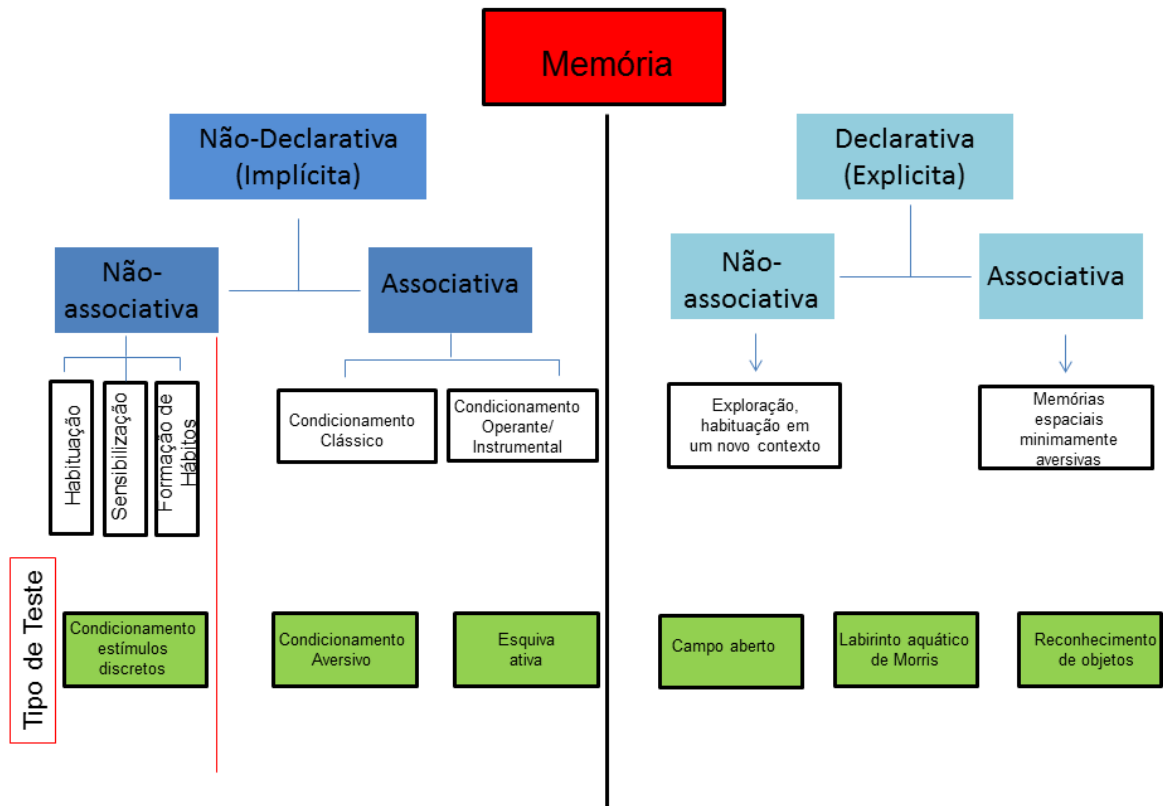


Figura 1- Classificação da memória segundo sua natureza associativa ou não associativa. Adaptado de QUILLFELDT, 2006.

De acordo com o tempo de duração, que é o tempo que as memórias permanecem disponíveis para a evocação após serem adquiridas, as memórias podem ser classificadas em: memória de trabalho (as informações que estão disponíveis por períodos muito curtos de tempo, segundos a minutos), memórias de curta duração (que duram de minutos a poucas horas após serem adquiridas) e, memórias de longa duração (que podem durar dias, meses ou anos) e levam um tempo maior para serem armazenadas (SQUIRE *et al.*, 2004). Ainda existe uma classificação para aquelas memórias que podem durar décadas, como aquelas da nossa infância e, essas são denominadas de memórias remotas (NADER *et al.*, 2000).

Tem sido proposto que a formação de memória é constituída por diferentes processos, os quais envolvem substratos neurobiológicos distintos e complexos. A formação da memória de longa duração compreende três fases distintas: aquisição,

consolidação e evocação (IZQUIERDO, 2011; IZQUIERDO, 2002), conforme ilustrado na Figura 2. A aquisição ou aprendizado refere-se ao período de tempo entre a percepção do estímulo aprendido após uma experiência prévia e o momento que esse estímulo é convertido em uma memória. Logo após o aprendizado ocorrem modificações moleculares e celulares que culminam em uma progressiva estabilização dessas informações adquiridas. Este processo, conhecido como consolidação, consiste no armazenamento da informação adquirida para que essa seja armazenada como uma memória de longa duração (NADEL *et al.*, 2012; DUBAI, 2004; McGAUGH, 2000). Durante este processo de estabilização, as memórias encontram-se lábeis, ou seja, instáveis, estando susceptíveis a intervenções por diferentes meios, incluindo agentes farmacológicos, fazendo com que a informação adquirida possa ser alterada (GLAZER, 2010; McGAUGH, 1966; 2000).

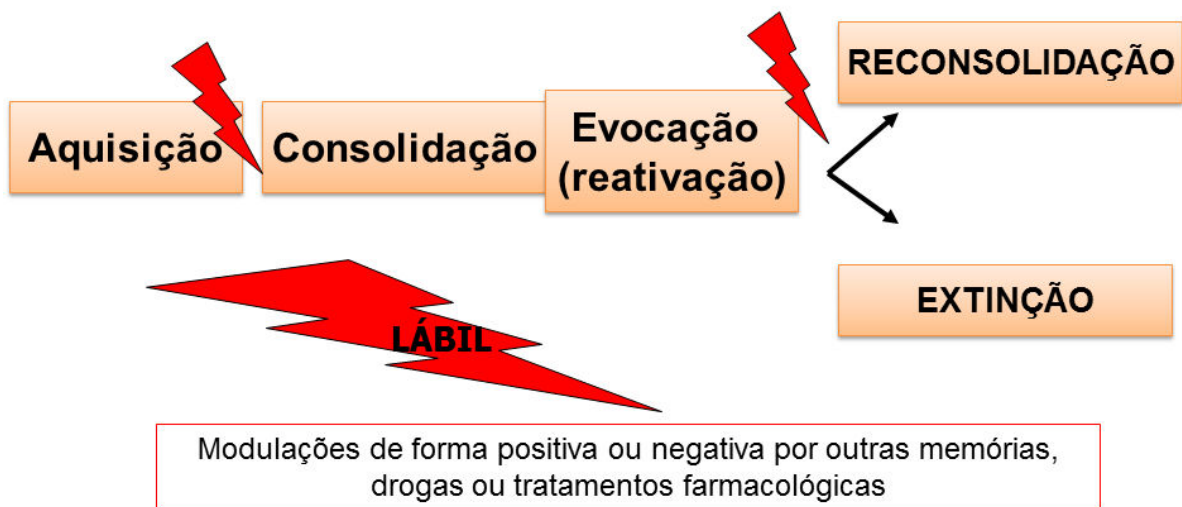


Figura 2- Fases do processamento da memória

Após a consolidação da memória ela permanece estável e pouco sensível a interferências (JI *et al.*, 2003). Assim, quando a informação armazenada não agrega mais nenhum valor ao indivíduo, a memória é esquecida, priorizando o armazenamento de novas informações. A evocação ou recordação refere-se ao acesso à informação armazenada. É o retorno da memória ao estado em que a informação pode ser acessada de maneira consciente e/ou utilizada na execução de um comportamento (AGREN *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2011). Com a evocação de uma determinada memória, dois processos paralelos importantes, que dependem

metodologicamente do tempo de reativação da memória, podem ocorrer: a extinção ou a reconsolidação da memória, conforme ilustrado na Figura 2.

Quando a evocação é prolongada em ausência de contingências aprendidas, a memória pode ser extinta (HARRIS *et al.*, 2000). A extinção consiste no aprendizado de uma nova memória que coexiste com a memória original e que é capaz de inibir, ao menos temporariamente, a evocação da memória original (BOUTON, 2004). Cabe acrescentar que a extinção não implica no esquecimento da memória. Com o passar do tempo, ou havendo mudanças no contexto ou no estado emocional, a memória original pode vir a dominar novamente o comportamento (QUIRK & MUELLER, 2008; QUIRK, 2002) e, isso pode ocorrer espontaneamente, ou através da reexposição ao estímulo incondicionado, a dicas ambientais ou, ao estresse. Assim, o sentido biológico da extinção é formar uma nova memória com significado distinto da memória original. Exposições curtas aos estímulos aprendidos geralmente desencadeiam o processo de reconsolidação (ALBERINI & LEDOUX, 2013; DEBIEC *et al.*, 2002).

1.2 Reconsolidação da Memória

A reconsolidação da memória é o processo de estabilização de uma memória reativada (NADER *et al.*, 2000; MISANIN *et al.*, 1968). A reativação refere-se ao processo de evocação da memória que induz a desestabilização da memória previamente consolidada, tornando-a lábil novamente (MILTON & EVERITT, 2010; LEWIS, 1979). Assim, a memória labilizada precisa passar por um novo processo de estabilização, dependente de síntese proteica (LOPEZ *et al.*, 2015), para persistir e ser atualizada (WINTERS *et al.*, 2009; ROSSATO *et al.*, 2007), ou seja, ser reconsolidada (NADER *et al.*, 2000; SARA, 2000). Nesse contexto, a evocação pode mudar o conteúdo da memória original, podendo ser vista como um processo dinâmico, que confere uma propriedade adaptativa ao SNC (SARA, 2000).

Na reconsolidação ocorrem mudanças dinâmicas na atividade de moléculas de sinalização intracelular, tal como a ativação da proteína cinase dependente de AMP_c (PKA) (ARGUELLO *et al.*, 2013), a ativação de fatores de transcrição como a proteína ligante do elemento responsivo ao AMP_c (CREB) (KIM *et al.*, 2014; TRONSON *et al.*, 2012; KIDA *et al.*, 2002) e a ativação da cinase reguladora de sinalização extracelular (ERK) (KIM *et al.*, 2014; TRONSON *et al.*, 2012) e, a

necessidade de síntese proteica (LOPEZ *et al.*, 2015; DEBIEC *et al.*, 2002; NADER *et al.*, 2000). Outra molécula de sinalização intracelular que é ativada durante a reconsolidação da memória é a proteína cinase dependente de cálcio (PKC). Um estudo realizado em 2007 sugeriu que a PKC hipocampal está envolvida na aquisição, consolidação e, também na reconsolidação da memória espacial (BONINI *et al.*, 2007). Especificamente este estudo mostrou que a inibição da PKC após a reativação, no hipocampo dorsal, prejudica a consolidação e reconsolidação da memória espacial. Além disso, a infusão, após a reativação, de um inibidor da PKC não inibe a evocação/reativação, mas inibe a reconsolidação da memória (BONINI *et al.*, 2007). Outro estudo também mostrou que a ativação de PKC ζ e proteína quinase M ζ (PKM ζ) é necessária para a reativação e reconsolidação de memórias (CRESPO *et al.*, 2012).

Essas evidências levaram à hipótese de que a reconsolidação envolveria uma espécie de recapitulação dos acontecimentos moleculares que ocorrem durante a consolidação (SARA, 2000). No entanto, importantes diferenças bioquímicas e farmacológicas entre consolidação e reconsolidação foram encontradas (BUCHERELLI *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2004), indicando que, apesar de existirem algumas semelhanças, consolidação e reconsolidação não são processos idênticos (ALBERINI, 2006; LEE *et al.*, 2004).

Lee e colaboradores (2004) mostraram que a consolidação e a reconsolidação são processos dissociáveis, pois utilizam substratos cerebrais diferentes. Foi demonstrado que a consolidação da memória de medo contextual envolve o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), porém não o fator de transcrição Zif-268 no hipocampo. A reconsolidação, ao contrário, requer Zif-268, mas não BDNF. Esta diferença entre os papéis do BDNF e do Zif268 não só esclarece a necessidade destas proteínas em fases distintas da memória dependente do hipocampo, mas também mostra que os mecanismos envolvidos na reconsolidação da memória de medo não são idênticos aos da consolidação. Sendo assim, o processo de reconsolidação pode ser encarado como uma janela de oportunidades para a manutenção, o fortalecimento e a atualização do traço mnemônico evocado (NADER *et al.*, 2000).

Diversos estudos têm demonstrado que a administração de inibidores de síntese proteica, após a reativação de uma memória consolidada, prejudica a memória original e reafirmam a hipótese de que a evocação de uma memória

consolidada induz um novo período de instabilidade que requer um processo que estabilize e mantenha a memória para uma futura recuperação (LOPEZ *et al.*, 2015; EINARSSON & NADER, 2013; ROSSATO *et al.*, 2010). Além disso, os inibidores de síntese proteica, assim como os antagonistas do receptor *N*-Metil-D-Aspartato (NMDA), como MK-801, têm sido utilizados para mostrar a dissociação que existe entre o processo de reconsolidação e o de extinção (MERLO *et al.*, 2014; ROSSATO *et al.*, 2010)

Além da utilização de inibidores de síntese proteica, estudos utilizando injeções sistêmicas ou intracerebrais de distintos agentes farmacológicos têm mostrado que a reconsolidação pode ser prejudicada ou facilitada quando as drogas são administradas durante a reativação da memória. Entre estas substâncias, destacam-se as drogas que prejudicam a reconsolidação da memória, como agonistas (GAMACHE *et al.*, 2012) e antagonistas dos receptores noradrenérgicos (ACHTERBERG *et al.*, 2012; DEBIEC & LEDOUX, 2004), antagonistas dos receptores de glicocorticoides (TRONEL & ALBERINI, 2007) e antagonistas do NMDA (MERLO *et al.*, 2014; LEE & HYND, 2013; CHIA & OTTO, 2013; CHARLIER & TIRELLI, 2011), além de drogas que facilitam a reconsolidação, como benzodiazepínicos (RODRIGUEZ *et al.*, 2013) e agonistas do receptor NMDA (RIBEIRO *et al.*, 2013; PORTERO-TRESSERA *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2006).

1.3 Proteína cinase depende de cálcio (PKC)

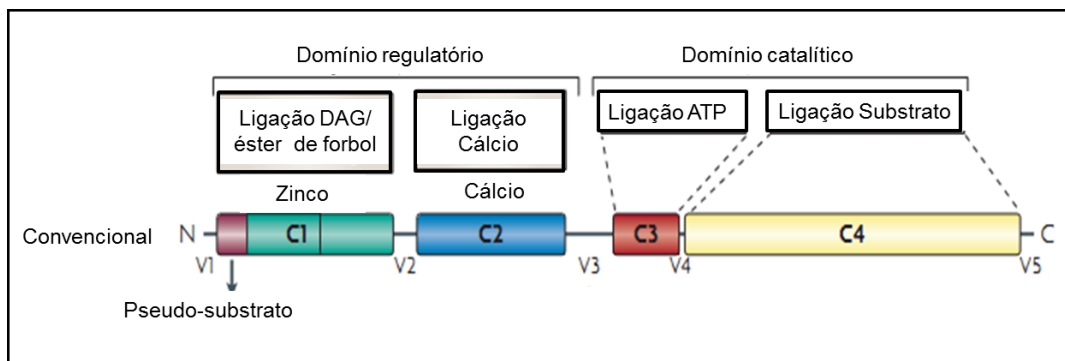
Takai e colaboradores descreveram em 1977 pela primeira vez uma proteína cinase independente de nucleotídeos cíclicos para sua ativação (TAKAI *et al.*, 1977). Posteriormente Tanaka e Nishizuka (1994) descreveram as mesmas como sendo serina/treonina cinase, ativadas por cálcio (do inglês PKC, protein kinases Ca²⁺ dependent), que estão envolvidas em vias de transdução neuronais através da fosforilação de diferentes substratos (TANAKA & NISHIZUKA, 1994)

Em mamíferos são descritas 10 isoformas de PKC, subdividas em três subfamílias, de acordo com suas características bioquímicas (Quadro 1).

Quadro 1: Classificação das isoformas da PKC.

Classificação	Isoforma	O que requerem para ser ativada
PKC Clássica ou convencional (PKCc)	α , β I, β II e γ	Requerem Ca^{2+} e DAG
PKC "nova" (PKCn)	ϵ , η , θ , δ e μ	Requerem Ca^{2+} mas não DAG
PKC atípicas (PKCa)	ζ , ι , λ	Não requerem Ca^{2+} nem DAG

A PKC é uma enzima monomérica com um domínio regulatório e um catalítico ligado a cadeia polipeptídica. A isoforma convencional da PKC é formada por quatro regiões conservadas (C1-C4). A metade amino terminal, contendo as regiões C1, que interage com o diacilglicerol (DAG- produto da hidrólise de fosfatidil- inositídeos restrito a membrana), éster de forbol e fosfatidilserina; C2 que interage com o Ca^{2+} ; além de um pseudo-substrato adjacente a C1, representam um domínio regulatório. A metade carbóxi-terminal, contendo as regiões C3 e C4, responsáveis pela ligação do ATP e do substrato, respectivamente, representa o domínio catalítico (SUN & ALKON, 2010; AMADIO *et al.*, 2006). Usualmente a PKC encontra-se na forma inativa no citosol, porém ativa-se de maneira reversível quando se liga a membrana fosfolipídica, na presença de Ca^{2+} . O íon promove a interação do subgrupo cálcio dependente da PKC com a fosfatidilserina da membrana, essa translocação para a membrana facilita a ligação do DAG e ativação do domínio catalítico da PKC (STEINBERG, 2008).

Figura 3- Isoforma da PKC. Adaptado de Ogita *et al.*, 2002.

A PKC está amplamente distribuída no sistema nervoso central (SNC) dos mamíferos, incluindo regiões como neocórtex, córtex cingulado, núcleo basolateral da amígdala e, em quase toda a formação hipocampal (VAN DER ZEE *et al.*, 1997). Sua alta atividade e expressão no SNC estão associados com a regulação da transmissão sináptica e das funções neurais em diferentes níveis, incluindo liberação de neurotransmissores, funcionamento de receptores, expressão genica e processos de aprendizagem e memória (GOULD & MANJI, 2002).

Todas as isoformas de PKC contêm um local entre o domínio regulatório e o domínio catalítico, que é susceptível à proteólise enzimática. Elevados níveis de cálcio citoplasmático podem ativar proteases que clivam PKC, libertando uma isoforma da PKC citoplasmática chamada proteína quinase M ζ (PKM ζ) (OGITA *et al.*, 1992; OSADA *et al.*, 1990). Este fragmento é constitutivamente ativo porque perde seu domínio regulamentar. Sacktor mostrou em um estudo que o aumento da expressão PKM ζ conduz à ativação persistente de PKC em neurónios hipocampais e, que isso é particularmente importante para a manutenção de memórias (SACKTOR, 2008).

Os substratos para a PKC podem ser, proteínas associadas a membrana pré ou pós-sináptica como a neurogranina, neurotransmissores como a acetilcolina e o glutamato e, subunidades específicas de receptores como a NR2B do receptor NMDA que estão envolvidas com processo de plasticidade neuronal (CASABONA, 1997).

1.4 Receptor N-metil-D-Aspartato (NMDA)

Diversos sistemas de neurotransmissores estão envolvidos com aprendizagem e memória (LEE & HYNDS, 2013; NADER *et al.*, 2009), incluindo os receptores glutamatérgicos NMDAr (figura 3). O receptor NMDA é um receptor de membrana ativado por glutamato, pertencente à família de receptores ionotrópicos glutamatérgicos responsável por mediar transmissões excitatórias tanto na medula espinhal como no encéfalo. Atualmente são conhecidas sete subunidades desse receptor, divididas em três subfamílias: uma subunidade GluN1, quatro subunidades GluN2 (GluN2A, GluN2B, GluN2C e GluN2D) e, duas subunidades GluN3 (GluN3A, GluN3B). Estas subunidades podem organizar-se em heterodímeros contendo

subunidades GluN1 e GluN2 ou uma mistura de subunidades GluN2 e GluN3 (PAOLETTI *et al.*, 2013; SANZ-CLEMENTE *et al.*, 2013).

O receptor NMDA possui duas características peculiares: é o único ativado por ligante e dependente de voltagem, devido à presença de um íon magnésio, e que necessita de dois ligantes, o glutamato e um coagonista (D-serina ou glicina) para ser ativado (KLECKNER & DINGLELINE, 1988). Em condições de repouso, o poro do receptor NMDA está bloqueado por níveis fisiológicos de Mg^{2+} . A ativação do receptor NMDA resulta no influxo de sódio e cálcio e efluxo de potássio, através do seu poro. A ativação do receptor NMDA inicialmente ocorre com um impulso nervoso com conseqüente despolarização da membrana do neurônio pré-sináptico e liberação do glutamato das vesículas por exocitose. O glutamato liberado se liga aos receptores glutamatérgicos ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA) e cainato, fazendo com que ocorra influxo de íons Na^+ . Desta forma, vai ocorrer uma despolarização na membrana do neurônio pós-sináptico, fazendo com que o magnésio seja deslocado e o receptor NMDA possa ser ativado pelo agonista glutamato e pelo seu co-agonista glicina, resultando no influxo de íons Na^+ e Ca^{2+} e no efluxo de íons K^+ (PAOLETTI & NEYTON, 2007; OZAWA *et al.*, 1998; SCATTON, 1993). O influxo de Ca^{2+} aumenta a intensidade e prolonga a duração da despolarização da membrana do neurônio pós-sináptico, promove a ativação de proteínas cinases responsáveis por algumas respostas celulares, como o aumento da expressão dos fatores de transcrição e o aumento da transmissão de informações entre os neurônios (plasticidade sináptica) que modificam a eficiência sináptica e a morfologia neuronal, cruciais para plasticidade sináptica (SANZ-CLEMENTE *et al.*, 2013; IZQUIERDO & MEDINA, 1997).

O receptor NMDA é regulado por diferentes sítios de ligação tanto para ligantes endógenos quanto para ligantes exógenos, incluindo o glutamato, glicina, magnésio, zinco e também um sítio para as poliaminas (ZIGMOND *et al.*, 1999).

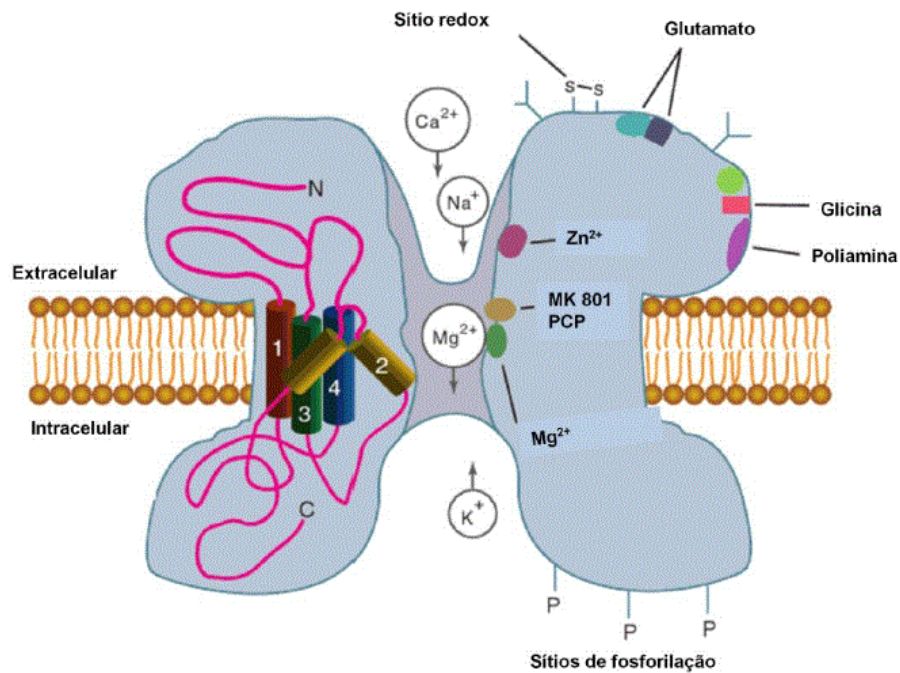


Figura 4- Estrutura do receptor NMDA. Adaptado de SQUIRE *et al.*, 2002.

1.5 Poliaminas

As poliaminas foram descritas pela primeira vez em 1678, por Antoni van Leeuwenhoek, são aminas alifáticas simples compostas por uma, duas ou três cadeias carbonadas flexíveis, as quais são conectadas por átomos de nitrogênio (figura 4). A putrescina (1,4-dianobutano) é uma diamina, a espermidina (mono-N-3-aminopropil-1,4-dianobutano) é uma triamina e a espermina (bis-N-3-aminopropil-1,4-dianobutano) é uma tetraamina (TETI *et al.*, 2002), seus nomes comuns provem da fonte de onde foram primariamente isoladas: carne em putrefação e líquido seminal (COFFINO, 2001).

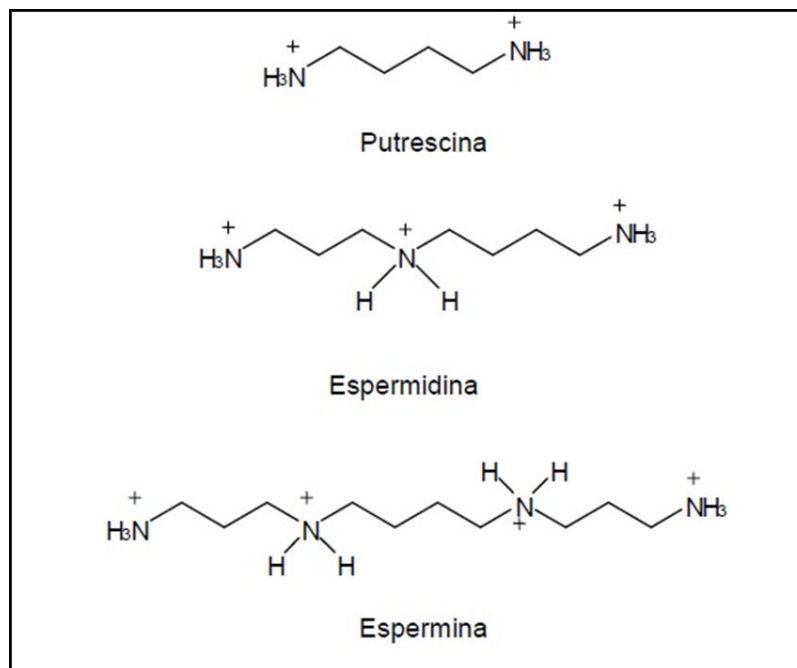


Figura 5- Estrutura química das poliaminas. Adaptado de TETI *et al.*, 2002.

As poliaminas estão amplamente distribuídas no SNC de seres humanos, sendo as maiores concentrações de espermidina, seguida pela espermina e putrescina, cada qual estando distribuída diferentemente em cada região cerebral. São encontradas principalmente em regiões como hipocampo, hipotálamo, núcleo acumbens, bulbo, hipocampo e córtex cerebelar (KRAUSS *et al.*, 2007; THOMAS & THOMAS, 2001; MORRISON & KISH, 1995).

O caráter fortemente básico das poliaminas implica na protonação de todos os grupos amino em condições fisiológicas. As poliaminas podem modular a excitabilidade neuronal agindo em diferentes canais iônicos e receptores de membrana, como canais de cálcio e o receptor NMDA (MONY *et al.*, 2009). A interação das poliaminas com sítios aniônicos de macromoléculas (ácidos nucleicos, proteínas, lipídios de membrana) é a base do mecanismo para a maioria das suas funções biológicas. Dentre estas se destacam: modulação do crescimento e diferenciação celular (TABOR & TABOR, 1984), apoptose (THOMAS & THOMAS, 2001), estabilização do DNA e RNA (IGARASHI & KASHIWAGI, 2000), regulação da expressão gênica (CELANO *et al.*, 1989), síntese de proteínas (YOSHIDA *et al.*, 1999), sinalização celular (BACHRACH *et al.*, 2001; JOHNSON & MCCORMACK, 1999), diminuição da lipoperoxidação (BELLE *et al.*, 2004) e ainda, possuem interações específicas com canais iônicos (WILLIAMS, 1997) tais como canais de

potássio (K^+), receptores AMPA permeáveis ao cálcio (Ca^{2+}), receptores cainato e o receptor NMDA (IGARASHI & KASHIWAGI, 2010; MOTT *et al.*, 2003).

A arcaína é um antagonista competitivo do sítio de ligação das poliaminas do receptor NMDA (LYNCH *et al.*, 1995) e 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 em suas extremidades, além de conter uma molécula de ácido sulfúrico, a qual confere o nome de 1, 4-diguanidinobutano (REYNOLDS, 1990).

Mony e colaboradores (2011) mostraram através de técnicas moleculares e eletrofisiológicas, que as poliaminas se ligam na interface das subunidades GluN1/GluN2B do receptor NMDA (figura 5) (MONY *et al.*, 2011). No modelo proposto, a espermina liga-se na interface formada pelos lóbulos inferiores do domínio N-terminal (NTD) das subunidades GluN1/GluN2B do receptor NMDA. O dímero formado pelo NTD das subunidades GluN1/GluN2B que possuem formato de concha, pode alternar entre dois estados conformacionais: um estado ativo e outro estado “tipo dessensibilizado”. No estado ativado, a região NTD das duas subunidades está aberta, o que mantém os lóbulos inferiores próximos e aumenta a probabilidade de ligação do agonista. Já no estado dessensibilizado, cargas eletrostáticas mantêm os lóbulos inferiores de GluN1 e GluN2B separados, o que provoca o fechamento da região NTD. A espermina e a espermidina agem estabilizando o receptor em um estado ativado, aliviando a repulsão eletrostática que separa os lóbulos inferiores das subunidades GluN1 e GluN2B.

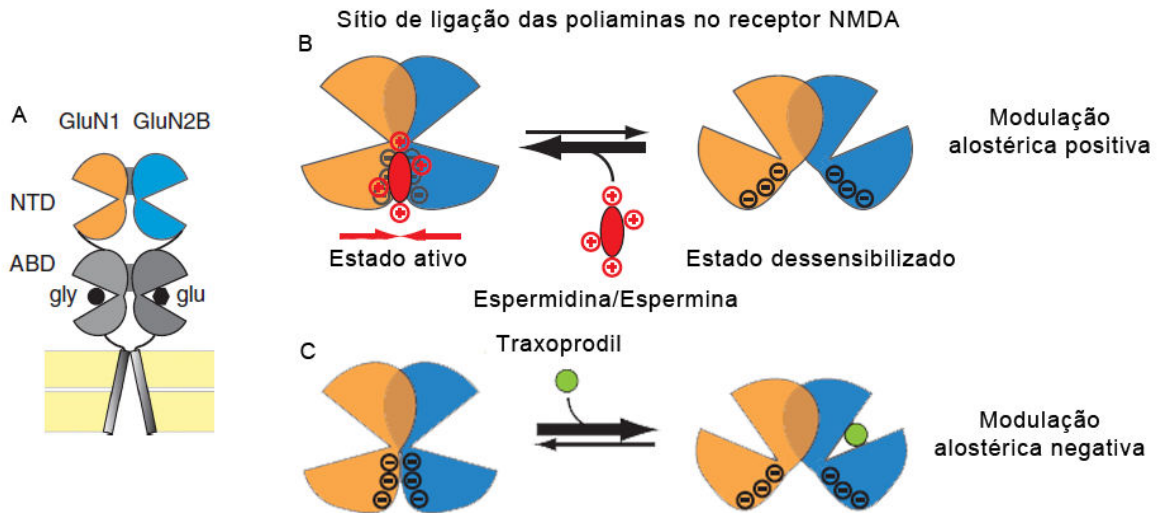


Figura 6- Sítios de modulação alostérica no receptor NMDA. A) Visão esquemática do heterodímero formado pelas subunidades GluN1 e GluN2B. B) Sítio de ligação das poliaminas no receptor NMDA. C) Sítio de ligação de antagonistas da subunidade GluN2B do receptor NMDA. Adaptado de MONY *et al.*, 2011.

1.5.1 Metabolismo das poliaminas

Nos seres humanos as poliaminas podem ser sintetizadas endogenamente pelo organismo ou provêm da flora gastrintestinal, através da metabolização dos aminoácidos provenientes da dieta (TETI *et al.*, 2002). Distinguem-se duas maiores rotas de metabolismo das poliaminas: a via da produção (*sínteses de novo*) ou da interconversão e a via do catabolismo final das poliaminas (figura 6). O aminoácido ornitina é o principal precursor das poliaminas endógenas.

No encéfalo, a ornitina é formada a partir da clivagem hidrolítica do aminoácido arginina, através da enzima arginase formando putrescina (SEILER,1981). Uma vez sintetizada, a putrescina serve como precursor para a espermina e espermidina, para isso deve haver a doação de um grupamento aminopropil para a putrescina, o qual é derivado da descarboxilação da S-adenosilmetionina através da ação da enzima S-adenosilmetionina descarboxilase. A enzima espermidina sintase, uma enzima aminopropil transferase, catalisa a transferência do grupamento aminopropil para a putrescina, formando a espermidina. A espermina é formada pela doação de um segundo grupamento

aminopropil para a espermidina, catalisada pela espermina sintase, formando então a espermina (MOINARD *et al.*, 2005; TABOR & TABOR, 1984).

A rota de interconversão permite que essa reação seja reversível, isto é, a espermina e a espermidina podem ser convertidas em espermidina e putrescina, respectivamente. A enzima espermidina/espermina acetiltransferase (SSAT), presente no encéfalo, acetila a espermina ou espermidina na posição N1, transformando as poliaminas em derivados monoacetil. Através da ação da SSAT, a espermina é transformada em N1-acetilespermina e a espermidina em N1-acetilespermidina. As poliaminas acetiladas sofrem, por fim, uma clivagem oxidativa, catalisada pela enzima poliamina oxidase (PAO), liberando os grupamentos aminopropil, e formando a espermidina e putrescina, respectivamente (PEGG, 2009; URDIALES *et al.*, 2001; SEILER, 1987).

O catabolismo das poliaminas é realizado por amino-oxidases dependentes de cobre. Cada intermediário da rota de interconversão pode ser transformado em um aldeído, através da desaminação oxidativa do grupamento amino primário, o qual é posteriormente oxidado em um aminoácido ou em um grupamento gama-lactâmico. Os produtos finais do catabolismo das poliaminas não podem ser reconvertidos em poliaminas novamente, sendo então excretados através da urina como poliaminas inalteradas, na forma de produtos acetilados e oxidados (TETI *et al.*, 2002; URDIALES *et al.*, 2001; SEILER *et al.*, 1996; CARTER, 1994).

Três enzimas chaves regulam a biossíntese das poliaminas, são essas: a ornitina descarboxilase, a S-adenosilmetionina descarboxilase e a espermidina/espermina N-acetiltransferase. Estas enzimas regulam os níveis de poliaminas no organismo envolvendo três passos do metabolismo das poliaminas, que são a síntese, a rota de interconversão e o catabolismo (SEILER, 2004; MORGAN, 1999).

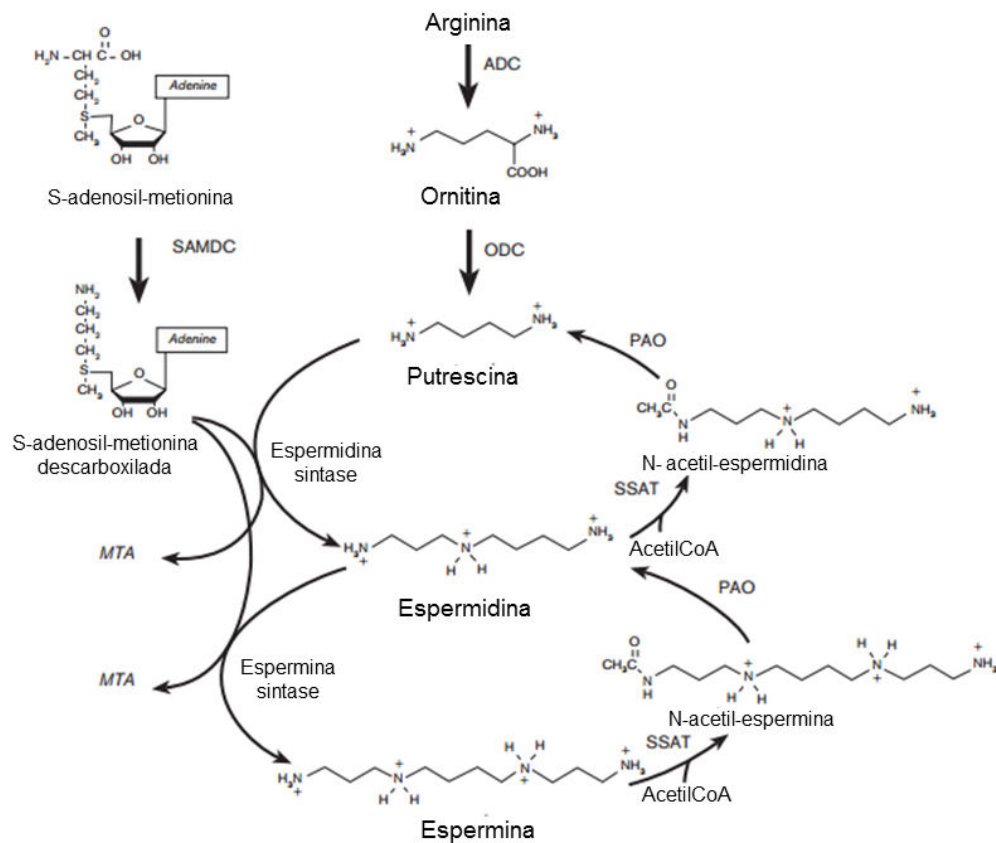


Figura 7- Metabolismo das poliaminas. Arginina descarboxilase (ADC); ornitina descarboxilase (ODC); S-adenosil-metionina descarboxilase (SAMDC); espermidina/espermina N1 acetil-transferase (SSAT); poliamina oxidase (PAO); metiltioadenosina (MTA). Adaptado de URDIALES *et al.*, 2001.

1.5.2 Poliaminas e memória

As poliaminas, ao se ligarem a seu sítio de ligação no receptor NMDA, podem potencializar ou inibir as respostas induzidas pelo glutamato (JOHNSON, 1996). Como consequência de uma potencialização da ativação do receptor NMDA ocorreria um aumento da atividade de moléculas de sinalização intracelular, tal como a ativação da PKA, PKC, ERK, proteína cinase cálcio-calmodulina dependente (CaMKII) e a ativação de fatores de transcrição como a CREB que por sua vez poderiam ativar demais mecanismos celulares que culminam com a síntese proteica, e no aumento de transmissão de informações entre os neurônios (McGAUGH, 2002; McGAUGH & IZQUIERDO, 2000).

Tem sido descrito que a administração intracerebral (GUERRA *et al.*, 2012, 2011, 2006; BERLESE *et al.*, 2005; RUBIN *et al.*, 2004; RUBIN *et al.*, 2001; RUBIN *et al.*, 2000) e sistêmica (CAMERA *et al.*, 2007) de espermidina melhora o

desempenho de ratos em tarefas como esquivas inibitórias, medo condicionado, reconhecimento social e facilita a extinção da memória (GOMES *et al.*, 2010). A espermidina modula a aquisição e/ou início da consolidação da memória na tarefa da esquivas inibitórias, não apresentando efeito sobre a consolidação tardia e nem sobre a evocação da memória, sugerindo que as poliaminas exercem seu efeito sobre a memória em uma determinada janela de tempo (BERLESE *et al.*, 2005). O efeito facilitador da espermidina sobre a consolidação da memória parece depender da ativação da enzima óxido nítrico sintase (GUERRA *et al.*, 2006) da PKA e da CREB no hipocampo de ratos (GUERRA *et al.*, 2011), bem como da ativação sequencial de vias da PKC e da PKA/CREB (GUERRA *et al.*, 2012).

Recentemente foi descrito que a administração sistêmica de espermidina melhora a persistência (SIGNOR *et al.*, 2014) bem como a reconsolidação (RIBEIRO *et al.*, 2013) da memória da tarefa de medo condicionado contextual em ratos. Estes efeitos da espermidina são revertidos por arcaína, antagonista das poliaminas no receptor NMDA, sugerindo o envolvimento do sítio das poliaminas neste efeito.

Além disso, tem sido mostrado que a espermidina reverte o déficit de memória induzido pela injeção intra-estriatal de ácido quinolínico, que é um modelo de doença de Huntington, na tarefa de reconhecimento de objeto (VELLOSO *et al.*, 2009). Também foi mostrado que a espermidina reverte o prejuízo da memória induzido por neuroinflamação (FRUHAUF *et al.*, 2015).

1.6 Receptor NMDA, reconsolidação da memória e poliaminas

Diversos estudos mostram o envolvimento dos receptores NMDA no processo de reconsolidação da memória, utilizando diferentes tarefas experimentais (LOPEZ *et al.*, 2015; MERLO *et al.*, 2014; FLINT *et al.*, 2013; MILTON *et al.*, 2013; CHARLIER & TIRELLI, 2011; BUSTOS *et al.*, 2010). Antagonistas do receptor NMDA, como MK-801, AP5 e ifenprodil prejudicam, enquanto que o agonista parcial D-cicloserina melhora a reconsolidação da memória de medo em camundongos e ratos (CHARLIER & TIRELLI, 2011; BEN MAMOU *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2006). Além disso, um estudo recente mostrou que o efeito amnésico do MK-801 na reconsolidação da memória é revertido pela administração da mesma droga antes do teste, mostrando evidências para um efeito de reconsolidação dependente de estado (FLINT *et al.*, 2013).

A subunidade GluN2B, do receptor NMDA, é fundamental para que as memórias de medo ao tom, consolidadas e estáveis, retornem a um estado lábil durante a reativação (BEN MAMOU *et al.*, 2006). Assim, Ben Mamou e colaboradores (2006) demonstraram que a anisomicina prejudica a reconsolidação da memória de medo ao tom e que a administração de ifenprodil, um antagonista seletivo da subunidade NR2B, previne a piora da memória causada pela anisomicina. Este resultado foi confirmado por Milton e colaboradores (2013) que mostraram que a subunidade NR2B é necessária para a desestabilização da memória de medo ao tom consolidada, enquanto a subunidade NR2A para a reestabilização (MILTON *et al.*, 2013).

Corroborando essas informações, estudos do nosso grupo mostraram que a administração sistêmica de espermidina melhora a reconsolidação da memória na tarefa de medo condicionado e, a administração de arcaína, antagonista do sítio de ligação das poliaminas no receptor NMDA, prejudica a reconsolidação da memória na mesma tarefa comportamental (RIBEIRO *et al.*, 2013).

1.7 Medo condicionado

O medo condicionado é um modelo experimental utilizado para mensurar a base neural da memória emocional. Esta tarefa utiliza memória associativa e, reflete a capacidade de estímulos ambientais originalmente neutros passarem a atuar como estímulo condicionado (EC) devido ao pareamento com um estímulo incondicionado (EI), que pode ser aversivo, como um choque nas patas. Quando o animal aprender esta associação (EC-EI), e for exposto apenas ao estímulo condicionado, ou seja, ao contexto, ele vai responder de forma condicionada, com comportamentos defensivos, congelando os movimentos. Seu pelo fica eriçado, ocorre aumento dos batimentos cardíacos e de sua pressão sanguínea, que são reações caracterizadas como respostas de medo do animal (TZSCHENTKE, 2007). Esse teste é utilizado para avaliar memórias de medo (MAREN, 2005).

1.8 Justificativa

As respostas emocionais a situações aversivas, constrangedoras ou ameaçadoras, como o medo e a ansiedade são bastante comuns em seres

humanos, possuindo grande importância para a sua sobrevivência. Entretanto, quando de forma excessiva, essas emoções podem ocasionar patologias, como ocorre nos transtornos do estresse pós-traumático e transtornos da ansiedade, afetando significativamente a qualidade de vida do indivíduo (SCHWABE *et al.*, 2014). Dessa forma, o medo condicionado pode ser utilizado para investigar os mecanismos de aprendizado e memória nos mamíferos e, para o conhecimento das origens dos distúrbios relacionados ao medo em humanos (NADER *et al.*, 2013).

Embora já tenha sido mostrado o envolvimento das poliaminas, administradas sistemicamente, na reconsolidação da memória de medo, nenhum estudo relatou o efeito da administração intra-hipocampal das poliaminas e, a possível via de sinalização envolvida no efeito das poliaminas. Portanto, no presente estudo foram investigados os efeitos da administração intra-hipocampal de espermidina e da arcaína na reconsolidação da memória, assim como o envolvimento da PKC sobre a melhora da reconsolidação da memória de medo induzida por espermidina.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o envolvimento da síntese proteica e da proteína cinase C sobre a melhora da reconsolidação da memória de medo induzida por espermidina em ratos.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1 Verificar o envolvimento das poliaminas e do hipocampo na reconsolidação da memória de medo.

2.2.2 Verificar o envolvimento da proteína cinase C sobre o efeito das poliaminas na reconsolidação da memória.

2.2.3 Verificar o envolvimento da síntese proteica sobre o efeito das poliaminas na reconsolidação da memória.

2.2.4 Analisar se o efeito das drogas administradas é específico para a reconsolidação da memória.

3. MANUSCRITO

3. MANUSCRITO

Título:

Spermidine-induced improvement of reconsolidation of memory involves calcium-dependent protein kinase in rats

Manuscrito submetido para publicação no periódico:

Learning & Memory

Comprovante de submissão do manuscrito:

LEARNING
MEMORY

Dr Maribel Rubin (Author) Queue Summary Reviewer Area Submit Submission History Help FAQ Feedback Log Out

Click Here to Check Status of Manuscripts Under Editorial Consideration or Review

The manuscript below has entered the review process. Click on the links below the manuscript metadata to perform actions.

LEARNMEM/2015/039396

SPERMIDINE-INDUCED IMPROVEMENT OF RECONSOLIDATION OF MEMORY INVOLVES CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE IN RATS

Bruna Amanda Girardi, Daniela Aymone Ribeiro, Cristiane Signor, Michele Muller, Mayara Ana Gais, Carlos Fernando Mello, and Maribel Antonello Rubin

Status: Under Review

Date Received: 19 Jun 2015

Editor: Susan Cushman

Article Types: Research Paper

Corresponding Author: Maribel Antonello Rubin

Keywords: contextual fear conditioning; hippocampus; memory reconsolidation; polyamines; protein kinase C

Supplemental Files: 0

**SPERMIDINE-INDUCED IMPROVEMENT OF RECONSOLIDATION OF MEMORY
INVOLVES CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE IN RATS**

Bruna Amanda Girardi¹, Daniela Aymone Ribeiro², Cristiane Signor²,
Michele Muller³, Mayara Ana Gais³, Carlos Fernando Mello¹,
Maribel Antonello Rubin^{1,2*}

¹Graduation Program in Pharmacology, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil.

²Graduation Program in Biochemistry, Center of Exact and Natural Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil.

³Undergraduation in Pharmacy, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil.

*Correspondence: Maribel Antonello Rubin, PhD, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Center of Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, Camobi. CEP: 97105900, Santa Maria, RS, Brazil. Fax: + 55 55 3220 8978.
E-mail address: maribel.rubin@gmail.com

Running title: Spermidine activates protein kinase C

ABSTRACT

In this study we determined whether the calcium-dependent protein kinase (PKC) signaling pathway is involved in the improvement of fear memory reconsolidation induced by intrahippocampal administration of spermidine in rats. Male Wistar rats were trained in a fear conditioning apparatus using a 0.4 mA footshock as unconditioned stimulus. Twenty-four hours after training, animals were re-exposed to the apparatus in the absence of shock (reactivation session). Immediately after the reactivation session, spermidine (2 - 200 $\mu\text{mol}/\text{site}$); the PKC inhibitor 3-[1-(dimethylaminopropyl)indol-3-yl]-4-(indol-3-yl) maleimide hydrochloride (GF 109203X, 0.3 - 30 $\mu\text{g}/\text{site}$); the antagonist of the polyamine-binding site at the NMDA receptor, arcaine (0.2 - 200 $\mu\text{mol}/\text{site}$) or the PKC activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 0.02 - 2 nmol/site) were injected. While the post-reactivation administration of spermidine (20 and 200 $\mu\text{mol}/\text{site}$) and PMA (2 nmol/site) improved, GF 109203X (1, 10 and 30 $\mu\text{g}/\text{site}$) and arcaine (200 $\mu\text{mol}/\text{site}$) impaired memory reconsolidation. GF 109203X (0.3 $\mu\text{g}/\text{site}$) prevented spermidine (200 $\mu\text{mol}/\text{site}$)-induced improvement of memory reconsolidation. PMA (0.2 nmol/site) prevented arcaine (200 $\mu\text{mol}/\text{site}$)-induced impairment of memory reconsolidation. Anisomycin (2 $\mu\text{g}/\text{site}$) prevented spermidine (200 $\mu\text{mol}/\text{site}$)-induced improvement of memory reconsolidation. Drugs had no effect if they were administered in the absence of reactivation. These results suggest that spermidine-induced enhancement of memory reconsolidation involves PKC activation.

Keywords: Polyamines; memory reconsolidation

1. Introduction

At the end of the 1960s, Misanin and colleagues (Misanin et al. 1968) suggested that consolidated memories become labile and susceptible to modulation when reactivated, that is, when evoked they need to go through a new stabilization process to persist (Nader et al. 2000; Sara 2000; de la Fuente et al. 2011; Gräff et al. 2014). This new stabilization process has been termed “reconsolidation” (Przybylski et al. 1999).

N-methyl-D-aspartate glutamatergic receptors (NMDAr), particularly those containing GluN2B subunit, play an important role in reconsolidation (Wang et al. 2009). The GluN2B subunit of the NMDA receptor is essential to consolidated and stable auditory fear memories return to a labile state during reactivation (Ben Mamou et al. 2006). This is supported by current evidence that NMDA receptor antagonists such as MK-801, ifenprodil and AP5 impair, while the agonist D-cycloserine enhances fear memory reconsolidation in mice and rats (Ben Mamou et al. 2006; Lee et al. 2006; Milton et al. 2012; Flint et al. 2013; Merlo et al. 2014). Moreover, it has been shown that spermidine, an endogenous polyamine that bind to the interface between GluN1 and GluN2B subunits of the NMDA receptor (Mony et al. 2011), improves the reconsolidation of fear conditioning memory (Ribeiro et al. 2013). Accordingly, the antagonist of this polyamine-binding site at the NMDAr, arcaine, impairs reconsolidation, suggesting a putative physiological role for polyamines in this process (Ribeiro et al. 2013).

Current behavioral and neurochemical evidence suggests that the facilitatory effect of spermidine on memory depends on nitric oxide synthase (NOS) activity, since the administration of N(G)-nitro L-arginine methyl ester (L-NAME), a nonspecific inhibitor of NOS, prevents the facilitatory effects of spermidine on the inhibitory avoidance task (Guerra et al. 2006). In addition, Guerra and colleagues (Guerra et al. 2011, 2012) have shown that protein kinase A (PKA) and PKC inhibitors prevent the facilitatory effect of spermidine on the memory of an inhibitory avoidance task. Accordingly, they also prevented spermidine-induced phosphorylation of PKC, PKA and CREB in the hippocampus (Guerra et al. 2011, 2012). Therefore, the effect of spermidine on memory consolidation seems to involve a sequence of biochemical events which is triggered by NMDA receptor, followed by activation of NOS and sequential activation of PKC and PKA/CREB signaling in the

hippocampus of rats. However, no study has addressed the neurochemical mechanisms involved in the improvement of memory reconsolidation by polyamines.

Reconsolidation requires dynamic changes in the activity of intracellular signaling molecules thought to be upstream gene transcription, such as PKA and ERK-MAPK (Duvarci et al. 2005; Tronson et al. 2006), as well as transcription factors, such as phosphoCREB (Kida et al. 2002; Milekic et al. 2007; Arguello et al. 2013). Bonini and colleagues (Bonini et al. 2007) have shown that post-retrieval administration of a PKC inhibitor in the CA1 region disrupts spatial memory reconsolidation, indicating that activation of hippocampal PKC is necessary for reconsolidation of memory (Bonini et al. 2007). Considering these studies, we hypothesized that the facilitatory effects of spermidine on memory reconsolidation involved PKC. Therefore, in the current study we investigated whether the intrahippocampal infusion of spermidine and arcaine alters memory reconsolidation in rats and whether protein synthesis and PKC are involved in the polyamine-induced improvement of fear memory reconsolidation.

2. Results

2.1. *Postreactivation intrahippocampal spermidine improves reconsolidation*

Fig. 1 shows the effect of the bilateral intrahippocampal injection of spermidine (2-200 pmol/site) immediately after reactivation on the reconsolidation of fear conditioning. Statistical analysis (one-way ANOVA) of freezing scores at testing revealed a significant effect of drug ($F_{(3,14)} = 3.78$, $P < 0.05$). *Post hoc* analysis (SNK) revealed that spermidine at the dose of 20 and 200 pmol/site increased freezing scores at test. These results suggest that the spermidine facilitates memory reconsolidation. As expected, statistical analysis (one-way ANOVA) of freezing scores during the reactivation session revealed no difference between groups ($F_{(3,14)} = 0.048$, $P > 0.05$, data not shown), indicating that the behavior of the animals was similar between groups before drug administration.

2.2. *GF 109203X impairs memory reconsolidation and prevents spermidine-induced improvement of memory*

Fig. 2A shows the effect of the bilateral intrahippocampal injection of GF 109203X (0.3, 1, 10 or 30 $\mu\text{g}/\text{site}$) immediately post-reactivation on the reconsolidation of fear conditioning. Statistical analysis (one-way ANOVA) of test freezing scores revealed a significant effect of drug treatment ($F_{(4,17)} = 9.21$, $P < 0.05$). Post hoc analysis (SNK) revealed that GF 109203X at the dose of 1, 10 and 30 $\mu\text{g}/\text{site}$ decreased freezing scores at test. These results suggest that intrahippocampal administration of the selective PKC inhibitor impairs memory reconsolidation. As expected, statistical analysis (one-way ANOVA) of reactivation session freezing scores revealed no difference among groups ($F_{(4,17)} = 0.20$, $P > 0.05$, data not shown), indicating that the behavior of the animals was similar between groups before drug administration.

Fig. 2B shows the effect of the bilateral intrahippocampal injection of GF 109203X, at a non-effective dose (0.3 $\mu\text{g}/\text{site}$, immediately post-reactivation), on spermidine-induced (200 $\mu\text{mol}/\text{site}$, 5 min post-reactivation) improvement of reconsolidation. Statistical analysis (two-way ANOVA) revealed a significant pretreatment (PBS or GF 109203X) versus treatment (PBS or spermidine) interaction ($F_{(1,16)} = 5.45$, $P < 0.05$). These results suggest that intrahippocampal administration of the selective PKC inhibitor prevented the improvement of fear conditioning reconsolidation induced by spermidine. Statistical analysis (one-way ANOVA) of reactivation freezing scores revealed no difference among groups in this experiment ($F_{(1,16)} = 0.034$, $P > 0.05$, data not shown).

2.3. Postreactivation intrahippocampal administration of arcaine impairs reconsolidation of contextual fear memories

Fig. 3 shows the effect of the bilateral intrahippocampal injection of arcaine (0.2- 200 $\mu\text{mol}/\text{site}$) immediately post-reactivation on fear conditioning reconsolidation. Statistical analysis (one-way ANOVA) of test freezing scores revealed a significant effect of drug treatment ($F_{(4,24)} = 2.94$, $P < 0.05$). Post hoc analysis (SNK) revealed that 200 $\mu\text{mol}/\text{site}$ arcaine decreased freezing scores at test. These results suggest that intrahippocampal administration of arcaine impairs memory reconsolidation. As expected, statistical analysis (one-way ANOVA) of reactivation session freezing scores revealed no difference among groups ($F_{(4,24)} = 0.41$, $P > 0.05$).

2.4. *Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) improves reconsolidation and prevents arcaine-induced impairment of reconsolidation*

Fig. 4A shows the effect of bilateral intrahippocampal injection of PMA (0.02- 2 nmol/site) immediately post-reactivation on the reconsolidation of fear conditioning. Statistical analysis (one-way ANOVA) of test freezing scores revealed a significant effect of drug ($F_{(3,16)} = 21.63$, $P < 0.050$). Post hoc analysis (SNK) revealed that PMA (2 nmol/site) increased freezing scores at test. These results suggest that the intrahippocampal administration of PMA facilitates memory reconsolidation. As expected, statistical analysis (one-way ANOVA) of reactivation session freezing scores revealed no difference among groups ($F_{(3,16)} = 0.66$, $P > 0.05$).

Fig. 4B shows the effect of bilateral intrahippocampal injection of PMA, at a non-effective dose (0.2 nmol/site, immediately post-reactivation), on the impairment of reconsolidation induced by arcaine (200 μ mol/site, 5 min post-reactivation). Statistical analysis (two-way ANOVA) revealed a significant pretreatment (PBS or PMA) versus treatment (PBS or arcaine) interaction ($F_{(1,28)} = 6.11$, $P < 0.05$). These results indicate that PMA prevents arcaine-induced impairment of fear conditioning reconsolidation. Statistical analysis (one-way ANOVA) of reactivation freezing scores revealed no difference among groups in this experiment ($F_{(1,28)} = 0.21$, $P > 0.05$, data not shown).

2.5. *Anisomycin impairs reconsolidation and prevents spermidine-induced improvement of reconsolidation*

Fig. 5A shows the effect of the bilateral intrahippocampal injection of anisomycin (0.2, 2, 20 μ g/site), immediately post-reactivation, on the reconsolidation of fear conditioning. Statistical analysis (one-way ANOVA) of test freezing scores revealed a significant effect of drug ($F_{(3,16)} = 11.16$, $P < 0.05$). *Post hoc* analysis (SNK) revealed that anisomycin (20 μ g/site) decreases freezing scores at test. These results suggest that intrahippocampal anisomycin impairs memory reconsolidation. As expected, statistical analysis (one-way ANOVA) of reactivation session freezing scores revealed no difference among groups ($F_{(3,16)} = 0.33$, $P > 0.05$).

Fig. 5B shows the effect of the bilateral intrahippocampal injection of anisomycin at a non-effective dose (0.2 µg/site, immediately post-reactivation) on spermidine-induced (200 µmol/site, 5 min post-reactivation) improvement of reconsolidation. Statistical analysis (two-way ANOVA) revealed a significant pretreatment (PBS or anisomycin) versus treatment (PBS or spermidine) interaction ($F_{(1,16)} = 29.29$, $P < 0.05$). These results suggest that anisomycin prevents spermidine-induced improvement of fear conditioning reconsolidation. Statistical analysis (one-way ANOVA) of reactivation freezing scores revealed no difference among groups in this experiment ($F_{(1,16)} = 0.006$, $P > 0.05$, data not shown).

2.6. The effects of spermidine, GF 109203X, arcaine, PMA and anisomycin are specific for reconsolidation of contextual fear memories

Fig. 6 shows the effect of the bilateral intrahippocampal injection of spermidine (200 µmol/site), GF 109203X (30 µg/site), arcaine (200 µmol/site), PMA (2 nmol/site), or anisomycin (20 µg/site) 24 hours after training, in the absence of reactivation session, on reconsolidation of fear conditioning. Statistical analysis (one-way ANOVA) of test freezing scores revealed that spermidine, GF 109203X, arcaine, PMA and anisomycin does not alter contextual fear conditioning in the absence of reactivation ($F_{(5,23)} = 0.66$, $P > 0.05$).

3. Discussion

The main findings of the current study are that while the ih injection of spermidine improved, arcaine impaired memory reconsolidation. Phorbol 12-myristate 13-acetate and GF 109203X respectively prevented arcaine-induced impairment and spermidine-induced improvement of memory reconsolidation. At last, anisomycin also prevented the facilitatory effects of spermidine on memory.

The currently reported spermidine-induced improvement of memory reconsolidation (Fig. 1A) is in agreement with Ribeiro et al (2013), who have shown that systemic injection of spermidine facilitates the reconsolidation of fear conditioning memory (Ribeiro et al. 2013). Moreover, it implies the polyaminergic modulation in the dorsal hippocampus in the reconsolidation of fear conditioning memory, a view that is fully corroborated by the finding that ih arcaine, a polyaminergic antagonist, disrupted memory reconsolidation (Fig. 3). Accordingly, pharmacological, functional imaging and lesioning studies indicate an important role

for the dorsal hippocampus in the reconsolidation contextual fear conditioning (Boccia et al. 2010; Jobim et al. 2012; Lee and Hynds 2013; De Jaeger et al. 2014). These findings may also be interpreted as additional evidence supporting a role for hippocampal NMDA receptors, particularly those containing the GluN2 subunit, in memory reconsolidation (Ribeiro et al., 2013; Charlier and Tirelli, 2011; Lee et al., 2006; Pedreira et al., 2002), as far as the agonist and the antagonist of the polyamine binding site at the NMDAR respectively improved and disrupted memory reconsolidation.

The PKC family of Ser/Thr kinases (Nishizuka 1995) regulates neuronal activity at different levels, including neurotransmitter release, neurotransmitter receptor function and gene expression (Ben-Ari et al. 1992; Meberg et al. 1993; Manseau et al. 1998; Macek et al. 1998; Kleschevnikov and Routtenberg 2001). There are at least 10 genes coding for PKC family members. Based on their structure and sensitivity to Ca^{2+} and diacylglycerol (DAG) these isoforms have been classified as conventional (α , β and γ), novel (δ , ϵ , η , θ and μ) and atypical PKCs (ζ and λ) which are structurally homologous, but can be regulated independently of calcium (Parekh et al. 2000; Weeber et al. 2000; Ohno and Nishizuka 2002). All PKC isoforms contain a site between the regulatory and catalytic domain, which is susceptible to enzymatic proteolysis. High levels of cytoplasmic calcium can activate proteases that cleave PKC, releasing a cytoplasmic isoform of PKC called protein kinase M ζ (PKM ζ) (Kishimoto et al. 1983). This fragment is constitutively active because it loses its regulatory domain. Increased PKM ζ expression leads to persistent activation of PKC in hippocampal neurons. In this context Sacktor (Sacktor 2008) has shown that PKC ζ is particularly important for the maintenance of fear memories.

In line with this view, Bonini and colleagues (Bonini et al. 2007) suggested that post-retrieval inhibition of PKC in the CA1 region of dorsal hippocampus disrupts further retention of spatial memory. Moreover, the amnesia induced by the post-retrieval injection of an inhibitor of PKC is not caused by a delayed inhibitory effect on retrieval, but due to inhibition of a process that stabilizes the retrieved trace (Bonini et al. 2007). Crespo and colleagues (Crespo et al. 2012) have also show that activation of PKC ζ and PKM ζ is necessary for the retrieval and reconsolidation of drug memory. Analogously, we showed that the effect of spermidine on memory reconsolidation of contextual fear conditioning is fully prevented by a non-effective dose of GF

109203X, an inhibitor of PKC. Accordingly, the deleterious effect of arcaine on memory reconsolidation was also fully prevented by a non-effective dose of the PKC activator PMA, indicating that the improving effects of spermidine on memory reconsolidation involve the activation of PKC in the hippocampus.

The finding that anisomycin prevented spermidine-induced improvement of memory reconsolidation suggests the involvement of protein synthesis in the currently described effects of spermidine. These results are in agreement with previous studies that showed that consolidation and reconsolidation require protein synthesis (Nader et al. 2000; Sol Fustiñana et al. 2014). Indeed, the injection of protein synthesis inhibitors before or after training, or after reactivation, impairs long-term memory (Nader et al. 2000; Lopez et al. 2015). Nevertheless, anisomycin can have other important effects on neurobiological function, including induction of immediate early genes (Edwards and Mahadevan 1992; Rudy et al. 2006; Gold 2008; Radulovic and Tronson 2008), alterations in synaptic release (Canal et al. 2007) and profound suppression of neural activity (Sharma et al. 2012; Greenberg et al. 2014). Therefore, we cannot rule out that other effects of anisomycin, unrelated to protein synthesis inhibition, have interfered in the spermidine-induced improvement of memory reconsolidation.

In summary, this study showed that intrahippocampal injection of GF 109203X prevents the improvement of memory reconsolidation induced by spermidine and that the injection of PMA prevents arcaine-induced impairment of memory reconsolidation. These findings suggest that ligands of the polyamine binding site at the NMDA receptor modulate memory reconsolidation by PKC-mediated mechanisms.

4. Materials and methods

4.1 Animals

Experimentally naive adult male Wistar rats (260–320 g), from the animal house of the Federal University of Santa Maria were used. The animals were housed four to a cage on a 12-h day/night cycle (lights on at 7:00 A.M.) at a temperature of 21°C with water and standard laboratory chow (Guabi, Santa Maria, Rio Grande do

Sul, Brazil) *ad libitum*. All experimental procedures were conducted 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).

4.2 Surgery

Rats were anesthetized with ketamine (80 mg/kg) and xylazine (8 mg/kg, i.p.), and were implanted with two 27-gauge guide cannulae placed 1 mm above the CA1 region of the dorsal hippocampus at the following coordinates: A = 4.0 mm; L = 3.0 mm; and V = 2.0 mm (Paxinos and Watson 1986). Placement of injections was histologically verified, as described elsewhere (Rubin et al. 1997). Only data from the animals with correct cannula placement were analyzed.

4.3 Drugs

N-(3-aminopropyl)-1,4-butanediamine trihydrochloride (spermidine; Sigma, St. Louis, MO), 3-[1(dimethylaminopropyl) indol-3-yl]-4-(indol-3-yl) maleimide hydrochloride (GF 109203X; Sigma St. Louis, MO), 1,4-diguanidinobutane sulfate (arcaine; Pfaltz & Bauer, Waterbury, CT, USA), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; Sigma, St. Louis, MO) or anisomycin (Sigma, St. Louis, MO). Anisomycin, spermidine, arcaine and GF 109203X were dissolved in 50 mM phosphate-buffered saline solution (PBS; pH 7.4). PMA was dissolved in DMSO and diluted to the final concentration of 0.05 % DMSO (v/v) with PBS. Drugs were bilaterally injected into the hippocampus (ih, 0.5 μ l/brain hemisphere for 1 min). The injections were performed by using an infusion pump and a 30-gauge needle fitted into the guide cannula. The tip of the infusion needle protruded 1.0 mm beyond that of the guide cannula into the CA1 region in the dorsal hippocampus. The needles were left in place for additional 60 s to minimize backflow. Doses were selected based on previous studies (Guerra et al. 2012) and pilot experiments.

4.4 Conditioning apparatus

Contextual fear conditioning training, reactivation and test 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.

4.5 Behavioral procedure

4.5.1. Contextual fear conditioning

In the conditioning trial each animal was 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 for 3 min. Immediately after habituation, three 1 s, 0.4 mA-footshocks (unconditioned stimulus, US) were delivered. The shocks were 40 s apart. After the last US, rats were allowed to stay in the chamber for additional 60 s before returning to their home cages.

4.5.2. Reactivation and testing sessions

The animals were subjected to reactivation and testing sessions according to Ribeiro *et al* (2013). Briefly, twenty-four hours after conditioning rats were re-exposed to the same conditioning context for 3 min, in the absence of footshock (reactivation session). The animals were returned to their home cages immediately after the reactivation session. Twenty-four hours after reactivation each rat was placed back in the conditioning chamber and a 6-min test was performed. During this time, no shock was given. The rat was observed every 4 s to assess whether it was in freezing, or not, by a trained observer who was unaware of the experimental treatment conditions. Data were converted to the percentage of samples scored as freezing. The percentage of samples scored as freezing over 6 min was taken as a contextual fear conditioning measure.

4.6 Experimental groups

Experiment 1

This experiment was designed to investigate the effect of the intrahippocampal administration of spermidine on memory reconsolidation. Animals were trained in the fear conditioning apparatus, as described above. Immediately after the reactivation session the animals were injected with PBS or spermidine (2, 20 or 200 $\mu\text{mol}/\text{site}$) and, 24h later, tested in the fear conditioning apparatus, where their freezing responses were scored as described above.

Experiment 2

This experiment was designed to investigate the effect of intrahippocampal administration of the PKC inhibitor GF 109203X on memory reconsolidation, as well as the involvement of PKC in the effect of spermidine on memory reconsolidation. Animals were trained in the fear conditioning apparatus, as described above. Immediately after reactivation session, the animals were injected with PBS or GF 109203X (0.3, 1, 10 or 30 $\mu\text{g}/\text{site}$) and, 24h later, tested in the fear conditioning apparatus where their freezing responses were scored.

Once it was determined that GF 109203X, at a dose of 0.3 $\mu\text{g}/\text{site}$, did not alter memory reconsolidation, the effect of GF 109203X on spermidine-induced improvement of memory reconsolidation was determined. The animals were trained in the fear conditioning apparatus, as described above. Immediately after reactivation session, they were injected with PBS or GF 109203X (0.3 $\mu\text{g}/\text{site}$) and, 5 min later, they were injected with PBS or spermidine (200 $\mu\text{mol}/\text{site}$). This dose of spermidine (200 $\mu\text{mol}/\text{site}$) was selected because it improved memory reconsolidation, as shown in Figure 1. Twenty-four hours after reactivation, the animals were tested in the fear conditioning apparatus and their freezing responses were scored.

Experiment 3

This experiment was designed to investigate the effect of intrahippocampal administration of arcaïne on memory reconsolidation. Animals were trained in the fear conditioning apparatus, as described above. Immediately after reactivation

session the animals were injected (ih) with PBS or arcaine (0.2, 2, 20 or 200 $\mu\text{mol}/\text{site}$) and, 24h later, tested in the fear conditioning apparatus where their freezing responses were scored.

Experiment 4

This experiment was designed to investigate the effect of PMA, a PKC activator, on memory reconsolidation determine whether PMA prevents arcaine-induced impairment of memory reconsolidation. Animals were trained in the fear conditioning apparatus, as described above. Immediately after reactivation session, the animals were injected (ih) with PBS or PMA (0.02, 0.2 or 2 nmol/site) and, 24h later, tested in the fear conditioning apparatus where their freezing responses were scored, as described above. Once it was determined that PMA, at a dose of 0.2 nmol/site , did not alter the reconsolidation of memory, the effect of PMA on arcaine-induced impairment of memory reconsolidation was determined. The animals were trained in the fear conditioning apparatus, as described above. Immediately after reactivation session, the animals were injected with PBS or PMA (0.2 nmol/site) and 5 min later they were injected with PBS or arcaine (200 $\mu\text{mol}/\text{site}$). Twenty-four hours after reactivation, the animals were tested in the fear conditioning apparatus and their freezing responses were scored.

Experiment 5

This experiment was designed to investigate the involvement of protein synthesis in the effect of spermidine on memory reconsolidation.

Animals were trained in the fear conditioning apparatus, as described above. Immediately after reactivation session, the animals were injected (ih) with PBS or a protein synthesis inhibitor, anisomycin (0.2, 2 or 20 $\mu\text{g}/\text{site}$) and, 24h later, tested in the fear conditioning apparatus where their freezing responses were scored, as described above. Once determined that anisomycin, at a dose of 0.2 $\mu\text{g}/\text{site}$, did not alter memory reconsolidation, the effect of anisomycin on spermidine-induced improvement of memory reconsolidation was determined. The animals were trained in the fear conditioning apparatus, as described above. Immediately after reactivation session, the animals were injected with PBS or anisomycin (0.2 $\mu\text{g}/\text{site}$, ih) and 5 min

later they were injected with PBS or SPD (200 pmol/site, ih). Twenty-four hours after reactivation, the animals were tested in the fear conditioning apparatus and their freezing responses were scored.

Experiment 6

Control experiments without the memory reactivation session were performed to evaluate whether the effects of spermidine, GF 109203X, arcaine, PMA or anisomycin are specific for reconsolidation of contextual fear memories. Animals were trained in the fear conditioning apparatus but without the memory reactivation session 24 h later. The animals were injected (ih) with PBS, spermidine (200 pmol/site), GF 109203X (30 µg/site), arcaine (200 pmol/site), PMA (2 nmol/site) or anisomycin (20 µg/site), 24 h after training and, 24 h later, were tested in the fear conditioning apparatus and had their freezing responses scored.

4.7 Statistics

The data were analyzed by one or two-way analysis of variance (ANOVA), depending on the experimental design. Post hoc analyses were carried out by the Student–Newman–Keuls test, when indicated. A $p < 0.05$ was considered significant.

5. Acknowledgements

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (306164/2010-8, 481664/2010-6, 476551/2009-9) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul-FAPERGS. CFM and MAR are recipients of CNPq fellowships. BAG, CS are recipients of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES fellowships. MAG is recipient of Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul-FAPERGS.

6. References

Arguello A a, Ye X, Bozdagi O, Pollonini G, Tronel S, Bambah-Mukku D, Huntley GW, Platano D, Alberini CM. 2013. CCAAT enhancer binding protein δ plays an

- essential role in memory consolidation and reconsolidation. *J Neurosci* **33**: 3646–58.
- Ben Mamou C, Gamache K, Nader K. 2006. NMDA receptors are critical for unleashing consolidated auditory fear memories. *Nat Neurosci* **9**: 1237–1239.
- Ben-Ari Y, Aniksztejn L, Bregestovski P. 1992. Protein kinase C modulation of NMDA currents: An important link for LTP induction. *Trends Neurosci* **15**: 333–339.
- Bonini JS, Da Silva WC, Bevilaqua LRM, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. 2007. On the participation of hippocampal PKC in acquisition, consolidation and reconsolidation of spatial memory. *Neuroscience* **147**: 37–45.
- Canal CE, Chang Q, Gold PE. 2007. Amnesia produced by altered release of neurotransmitters after intraamygdala injections of a protein synthesis inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 12500–12505.
- Crespo J a., Stöckl P, Ueberall F, Jenny M, Saria A, Zernig G. 2012. Activation of PKCzeta and PKMzeta in the nucleus accumbens core is necessary for the retrieval, consolidation and reconsolidation of drug memory. *PLoS One* **7**: 1–10.
- De la Fuente V, Freudenthal R, Romano A. 2011. Reconsolidation or extinction: transcription factor switch in the determination of memory course after retrieval. *J Neurosci* **31**: 5562–5573.
- Duvarci S, Nader K, LeDoux JE. 2005. Activation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase cascade in the amygdala is required for memory reconsolidation of auditory fear conditioning. *Eur J Neurosci* **21**: 283–289.
- Edwards DR, Mahadevan LC. 1992. Protein synthesis inhibitors differentially superinduce c-fos and c-jun by three distinct mechanisms: lack of evidence for labile repressors. *EMBO J* **11**: 2415–2424.
- Flint RW, Noble LJ, Ulmen AR. 2013. NMDA receptor antagonism with MK-801 impairs consolidation and reconsolidation of passive avoidance conditioning in adolescent rats: Evidence for a state dependent reconsolidation effect. *Neurobiol Learn Mem* **101**: 114–119.
- Gold PE. 2008. Protein synthesis inhibition and memory: Formation vs amnesia. *Neurobiol Learn Mem* **89**: 201–211.
- Gräff J, Joseph NF, Horn ME, Samiei A, Meng J, Seo J, Rei D, Bero AW, Phan TX, Wagner F, et al. 2014. Epigenetic priming of memory updating during reconsolidation to attenuate remote fear memories. *Cell* **156**: 261–276.
- Greenberg A, Ward-Flanagan R, Dickson CT, Treit D. 2014. ANI inactivation: Unconditioned anxiolytic effects of anisomycin in the ventral hippocampus. *Hippocampus* **24**: 1308–1316.
- 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* **186**: 150–158.
- Guerra GP, Mello CF, Bochi GV, Pazini AM, Fachinetto 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.
- Guerra GP, Mello CF, Bochi G V., Pazini AM, Rosa MM, Ferreira J, Rubin M a. 2012. Spermidine-induced improvement of memory involves a cross-talk between protein kinases C and A. *J Neurochem* **122**: 363–373.
- Jobim PFC, Pedroso TR, Christoff RR, Werenicz A, Maurmann N, Reolon GK, Roesler R. 2012. Inhibition of mTOR by rapamycin in the amygdala or

- hippocampus impairs formation and reconsolidation of inhibitory avoidance memory. *Neurobiol Learn Mem* **97**: 105–112.
- Kida S, Josselyn S a, Peña de Ortiz S, Kogan JH, Chevere I, Masushige S, Silva AJ. 2002. CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. *Nat Neurosci* **5**: 348–355.
- Kishimoto a., Kajikawa N, Shiota M, Nishizuka Y. 1983. Proteolytic activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by calcium-dependent neutral protease. *J Biol Chem* **258**: 1156–1164.
- Kleschevnikov AM, Routtenberg A. 2001. PKC activation rescues LTP from NMDA receptor blockade. *Hippocampus* **11**: 168–175.
- Lee JLC, Milton AL, Everitt BJ. 2006. Reconsolidation and extinction of conditioned fear: inhibition and potentiation. *J Neurosci* **26**: 10051–10056.
- Lopez J, Gamache K, Schneider R, Nader K. 2015. Memory Retrieval Requires Ongoing Protein Synthesis and NMDA Receptor Activity-Mediated AMPA Receptor Trafficking. *J Neurosci* **35**: 2465–2475.
- Macek T a, Schaffhauser H, Conn PJ. 1998. Protein kinase C and A3 adenosine receptor activation inhibit presynaptic metabotropic glutamate receptor (mGluR) function and uncouple mGluRs from GTP-binding proteins. *J Neurosci* **18**: 6138–6146.
- Manseau F, Sossin WS, Castellucci VF. 1998. Long-term changes in excitability induced by protein kinase C activation in *Aplysia* sensory neurons. *J Neurophysiol* **79**: 1210–1218.
- Meberg PJ, Barnes C a, McNaughton BL, Routtenberg a. 1993. Protein kinase C and F1/GAP-43 gene expression in hippocampus inversely related to synaptic enhancement lasting 3 days. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 12050–12054.
- Merlo E, Milton a. L, Goozee ZY, Theobald DE, Everitt BJ. 2014. Reconsolidation and Extinction Are Dissociable and Mutually Exclusive Processes: Behavioral and Molecular Evidence. *J Neurosci* **34**: 2422–2431.
- Milekic MH, Pollonini G, Alberini CM. 2007. Temporal requirement of C/EBPbeta in the amygdala following reactivation but not acquisition of inhibitory avoidance. *Learn Mem* **14**: 504–511.
- Milton AL, Schramm MJW, Wawrzynski JR, Gore F, Oikonomou-Mpegeti F, Wang NQ, Samuel D, Economidou D, Everitt BJ. 2012. Antagonism at NMDA receptors, but not β -adrenergic receptors, disrupts the reconsolidation of pavlovian conditioned approach and instrumental transfer for ethanol-associated conditioned stimuli. *Psychopharmacology (Berl)* **219**: 751–761.
- Misanin JR, Miller RR, Lewis DJ. 1968. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science* **160**: 554–555.
- 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.
- Nader K, Schafe GE, Doux JE Le. 2000. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*. **406**: 722–726.
- Nishizuka Y. 1995. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J* **9**: 484–496.
- Ohno S, Nishizuka Y. 2002. Protein kinase C isoforms and their specific functions: prologue. *J Biochem* **132**: 509–511.
- Parekh DB, Ziegler W, Parker PJ. 2000. Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *EMBO J* **19**: 496–503.

- Przybylski J, Roulet P, Sara SJ. 1999. Attenuation of emotional and nonemotional memories after their reactivation: role of beta adrenergic receptors. *J Neurosci* **19**: 6623–6628.
- Radulovic J, Tronson NC. 2008. Protein synthesis inhibitors, gene superinduction and memory: Too little or too much protein? *Neurobiol Learn Mem* **89**: 212–218.
- Ribeiro DA, Mello CF, Signor C, Rubin MA. 2013. Polyaminergic agents modulate the reconsolidation of conditioned fear. *Neurobiol Learn Mem* **104**: 9–15.
- Rudy JW, Biedenkapp JC, Moineau J, Bolding K. 2006. Anisomycin and the reconsolidation hypothesis. *Learn Mem* **13**: 1–3.
- Sacktor TC. 2008. PKM ζ , LTP maintenance, and the dynamic molecular biology of memory storage. *Prog Brain Res* **169**: 27–40.
- Sara SJ. 2000. Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. *Learn Mem* **7**: 73–84.
- Sharma a. V., Nargang FE, Dickson CT. 2012. Neurosilence: Profound Suppression of Neural Activity following Intracerebral Administration of the Protein Synthesis Inhibitor Anisomycin. *J Neurosci* **32**: 2377–2387.
- Sol Fustiñana M, Federman N, Freudenthal R, Romano A. 2014. Protein degradation by ubiquitin-proteasome system in formation and labilization of contextual conditioning memory. *Learn Mem* **21**: 478–87.
- Tronson NC, Wiseman SL, Olausson P, Taylor JR. 2006. Bidirectional behavioral plasticity of memory reconsolidation depends on amygdalar protein kinase A. *Nat Neurosci* **9**: 167–169.
- Weeber EJ, Atkins CM, Selcher JC, Varga a W, Mirnikjoo B, Paylor R, Leitges M, Sweatt JD. 2000. A role for the beta isoform of protein kinase C in fear conditioning. *J Neurosci* **20**: 5906–5914.

Figures and legends

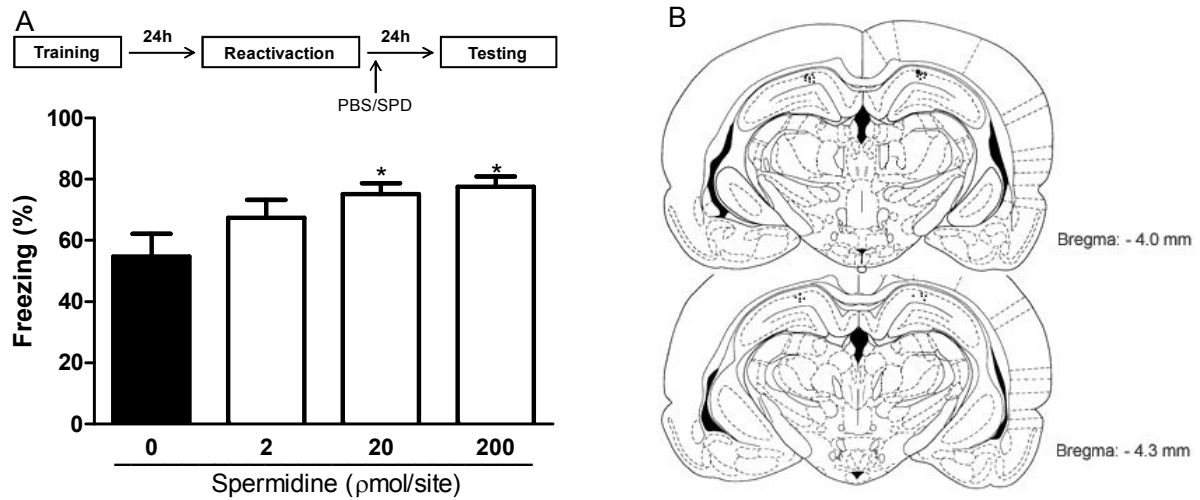


Fig.1. Postreactivation intrahippocampal administration of spermidine improves reconsolidation of contextual fear memories. (A) Rats received spermidine (SPD, 2–200 μmol/site, ih) or PBS, immediately after a reactivation session, and were tested for memory reconsolidation 1 day later. * $p < 0.05$ compared with vehicle by the SNK Test. Data are the means + SEM percentage of freezing at testing session ($n = 4–5$ animals in each group). (B) Schematic representations of rat brain sections at two rostrocaudal planes (-4.0 and -4.3 from bregma) taken from the atlas of Paxinos and Watson (1986). The dark squares showing the cannulae placements and infusion sites in the CA1 region of the dorsal hippocampus.

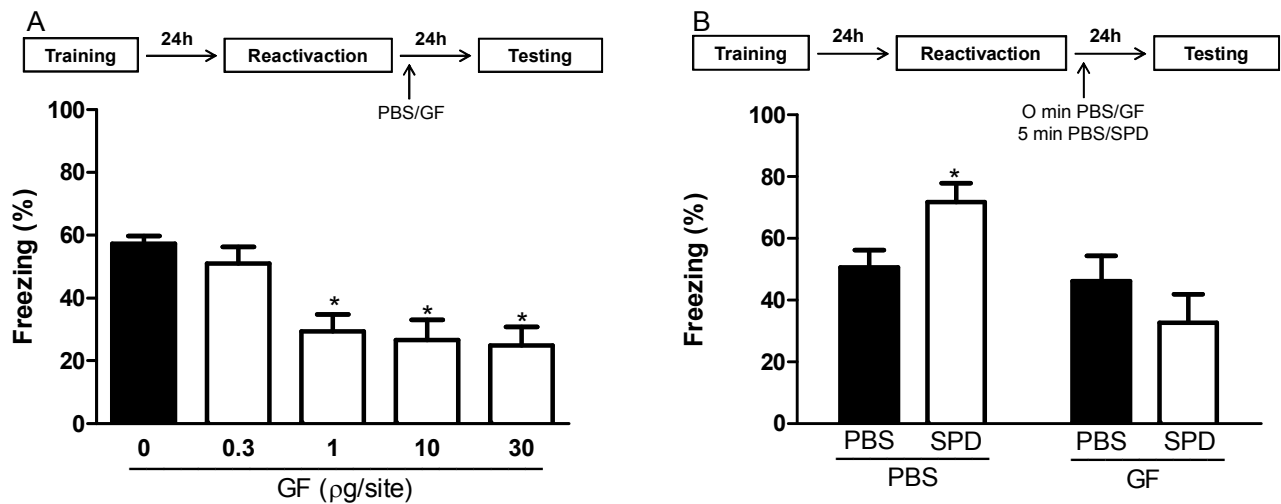


Fig. 2. Postreactivation intrahippocampal administration of GF 109203X impairs the reconsolidation of contextual fear memories and prevents the spermidine-induced improvement of memory reconsolidation. (A) Rats received GF 109203X (0.3, 1, 10 and 30 µg/site, ih) or PBS, immediately after a reactivation session, and were tested for memory reconsolidation 1 day later. (B) Rats received GF 109203X (0.3 µg/site, ih) or PBS immediately and spermidine (SPD, 200 pmol/site, ih) or PBS 5 min after the reactivation session, and were tested for memory reconsolidation 1 day later. * $p < 0.05$ compared with vehicle by the SNK. Data are means + SEM percentage of freezing at testing session ($n = 4-8$ animals in each group).

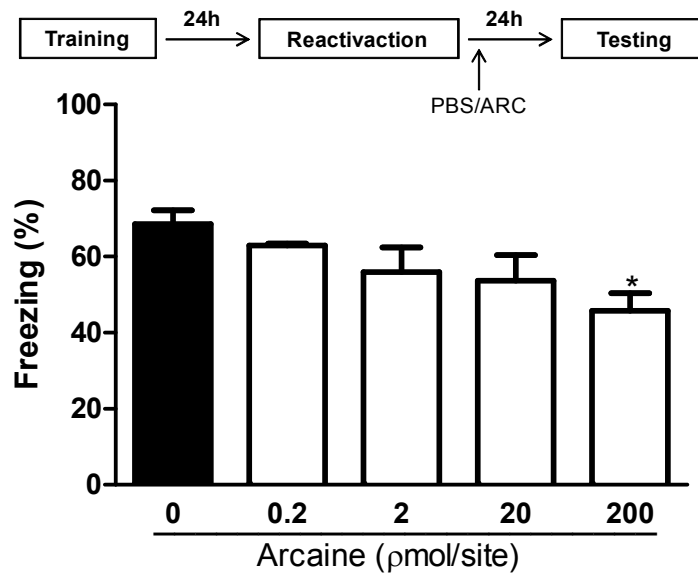


Fig. 3. Postreactivation intrahippocampal administration of arcaine impairs the reconsolidation of contextual fear memories. Rats received arcaine (ARC, 0.2-200 µmol/site, ih) or PBS, immediately after the reactivation session, and were tested for memory reconsolidation 1 day later. * $p < 0.05$ compared with vehicle by the SNK Test. Data are the means + SEM percentage of freezing at testing session ($n = 5-6$ animals in each group).

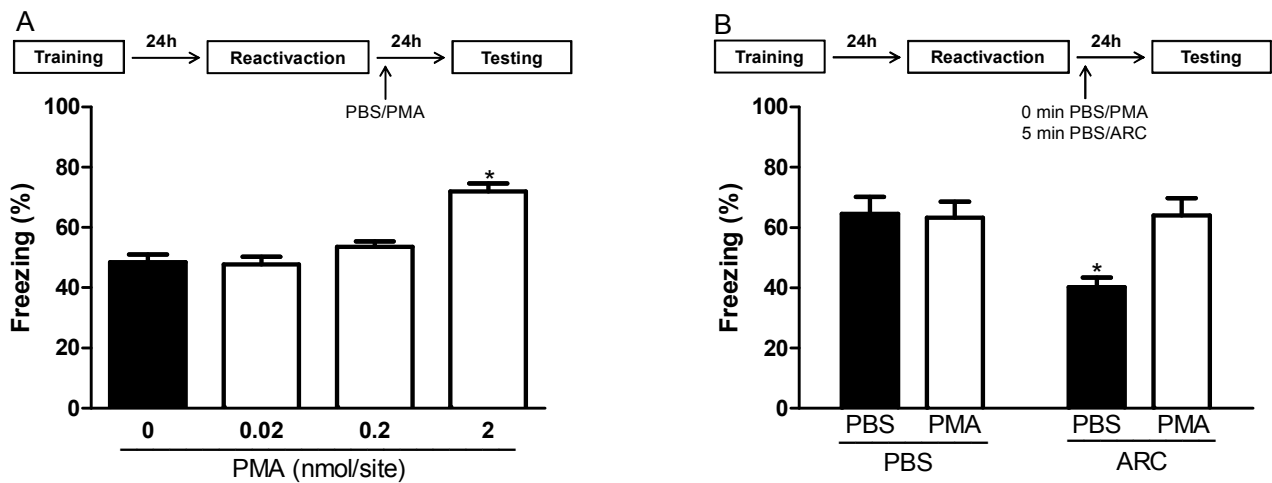


Fig. 4. Postreactivation intrahippocampal administration of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) improves the reconsolidation of contextual fear memories and prevents arcaine-induced impairment of memory reconsolidation. (A) Rats received PMA (0.02-2 nmol/site, ih) or PBS, immediately after a reactivation session, and were tested for memory reconsolidation 1 day later. (B) Rats received PMA (0.2 µg/site, ih) or PBS immediately and arcaine (ARC, 200 µmol/site, ih) or PBS 5 min after the reactivation session, and were tested for memory reconsolidation 1 day later. * $p < 0.05$ compared with vehicle by the SNK. Data are means + SEM percentage of freezing at testing session ($n = 5-8$ animals in each group).

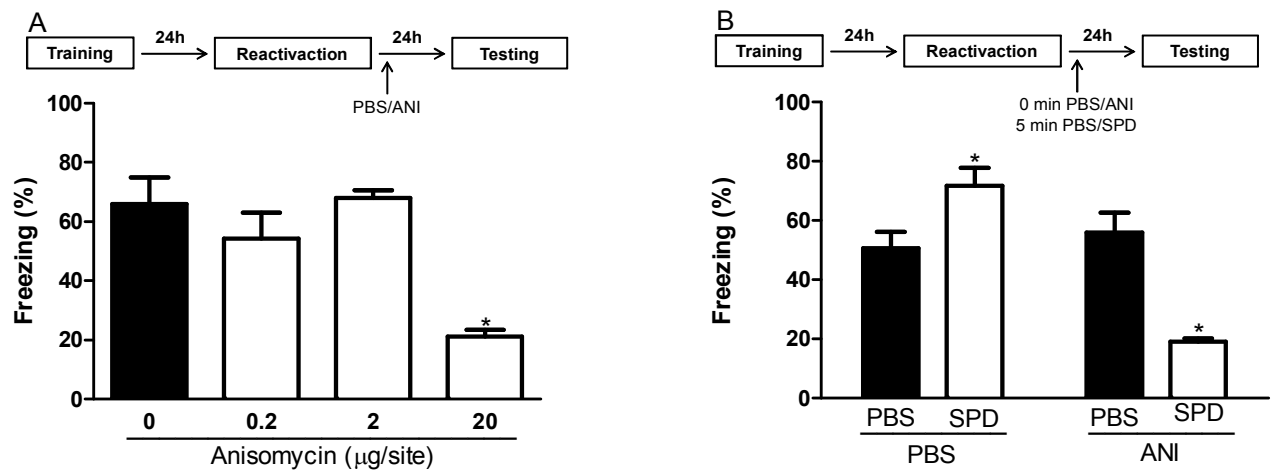


Fig. 5. Postreactivation intrahippocampal administration of anisomycin impairs the reconsolidation of contextual fear memories and prevents spermidine-induced improvement of memory reconsolidation. (A) Rats received anisomycin (0.2 -20 µg/site, ih) or PBS, immediately after a reactivation session, and were tested for memory reconsolidation 1 day later. (B) Rats received anisomycin (ANI, 2 µg/site, ih) or PBS immediately and spermidine (SPD, 200 pmol/site, ih) or PBS 5 min after the reactivation session, and were tested for memory reconsolidation 1 day later. * $p < 0.05$ compared with vehicle by the SNK Test. Data are the means + SEM percentage of freezing at testing session ($n = 5$ animals in each group).

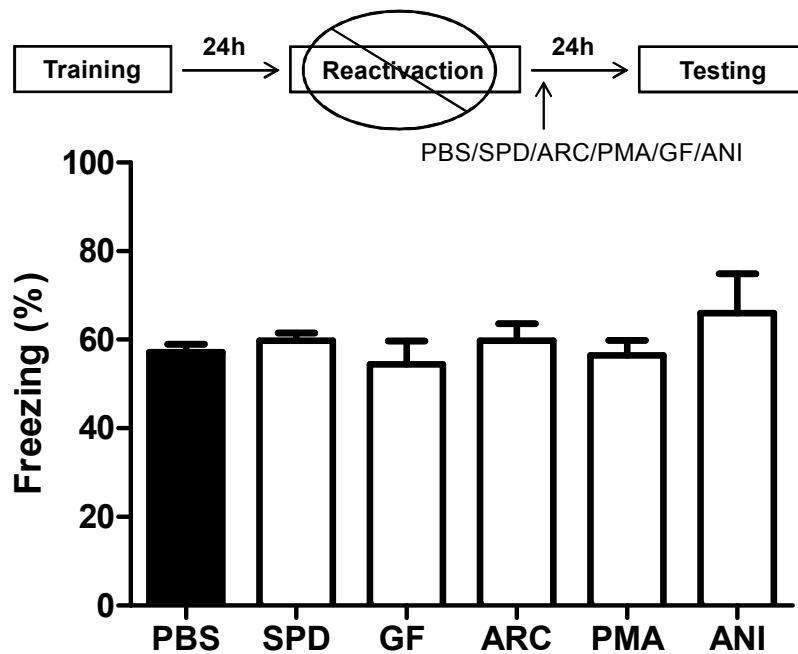


Fig. 6. Spermidine, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), arcaine, GF109203X and anisomycin are specific for reconsolidation of contextual fear memories. Rats received an intrahippocampal administration of PBS, spermidine (SPD, 200 $\mu\text{mol}/\text{site}$), GF109203X (30 $\mu\text{g}/\text{site}$), arcaine (ARC, 200 $\mu\text{mol}/\text{site}$), PMA (2 nmol/site), anisomycin (ANI, 20 $\mu\text{g}/\text{site}$) 24 h after training in the absence of reactivation session, and were tested for memory reconsolidation 1 day later. Data are means + SEM percentage of freezing in the testing session ($n = 4\text{--}5$ animals in each group).

4. CONCLUSÕES

4. CONCLUSÕES

4.1 CONCLUSÕES PARCIAIS

Com os resultados do presente estudo podemos concluir que:

4.1.1 A infusão intra-hipocampal de espermidina melhorou e a arcaína piorou a reconsolidação da memória, sugerindo o das poliaminas sobre a reconsolidação da memória.

4.1.2 O efeito da espermidina e da arcaína na reconsolidação da memória envolve a ativação da PKC no hipocampo. Chegou-se a esta conclusão porque a arcaína preveniu a melhora da reconsolidação da memória induzida pelo ativador da PKC, PMA, e porque o inibidor da PKC, GF 109203X, preveniu a melhora da reconsolidação da memória induzida por espermidina.

4.1.3 O efeito da espermidina sobre a reconsolidação da memória envolve a síntese de proteínas, uma vez que o inibidor da síntese protéica, anisomicina, piorou e, em uma dose sem efeito *per se*, preveniu a melhora da reconsolidação da memória induzida por espermidina.

4.1.4 O efeito de espermidina, arcaína, PMA, GF 109203X e anisomicina foi específico para a reconsolidação da memória, uma vez que estes compostos não apresentaram efeito na ausência da reativação.

4.2. CONCLUSÃO GERAL

Com os resultados do presente estudo concluímos que a melhora da reconsolidação da memória induzida pela administração intra-hipocampal de espermidina envolve a síntese protéica e ativação da PKC.

5. PERPECTIVAS

5. PERSPECTIVAS

Os autores deste trabalho pretendem confirmar o envolvimento da PKC, assim como investigar quais os demais mecanismos envolvidos na reconsolidação da memória de medo induzida por espermidina. Para isso serão realizados ensaios de Western Blot para verificar a expressão da PKC. Ainda pretende-se estudar o envolvimento das poliaminas durante a reconsolidação da memória na expressão de fatores de transcrição, como a CREB.

6. REFERÊNCIAS

6. REFERÊNCIAS

- ACHTERBERG, E. J.; TREZZA, V.; VANDERDERSCHUREN, L. J. Beta-adrenoreceptor stimulation mediates reconsolidation of social reward-related memories. **PLoS One**, v. 7, p. 396-39, 2012.
- AGREN, T.; ENGMAN, J.; FRICK, A.; BJORKSTRAND, J.; LARSSON, E. M.; FURMARK, T. Disruption of reconsolidation erases a fear memory trace in the human amygdala. **Science**, v. 337, p. 1550–1552, 2012.
- ALBERINI, C. M. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? **Trends in Neurosciences**, v. 28, p. 51-56, 2005.
- ALBERINI, C. M.; LEDOUX, J. E. Memory reconsolidation. **Current Biology**, v. 23, p. 746–750, 2013.
- AMADIO, M.; BATTAINI, F.; PASCALE, A. The different facets of protein kinases C: old and new players in neuronal signal transduction pathways. **Pharmacological Research**, v. 54, p. 317–325, 2006.
- ANTOINE, B.; SERGE, L.; JOCELYNE, C. Comparative dynamics of MAPK/ERK signalling components and immediate early genes in the hippocampus and amygdala following contextual fear conditioning and retrieval. **Brain Structure and Function**, v. 219, p. 415–430, 2014.
- ARGUELLO, A. A.; HODGES, M. A.; WELLS, A. M.; LARA, H.; XIE, X.; FUCHS, R. A. Involvement of amygdalar protein kinase A, but not calcium/calmodulindependent protein kinase II, in the reconsolidation of cocaine-related contextual memories in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 231, p. 55–65, 2015.
- BACHRACH, U.; WANG, Y. C.; TABIB, A. Polyamines: new cues in cellular signal transduction. **News in physiological sciences**, v. 16, p. 106-109, 2001.
- BADDLEY, A. D.; NAVARRO, G. E. Memoria humana: teoría y práctica. **McGraw-Hill Interamericana de España S.L.**, 1999.
- BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. Neurociências: desvendando o sistema nervoso. Porto Alegre, **Artmed**, 2008.
- BELLE, N. A.; DALMOLIN, G. D.; FONINI, G.; RUBIN M.; A, Rocha J. B. Polyamines reduces lipid peroxidation induced by different pro-oxidant agents. **Brain Research**, v. 1008, p. 245-251, 2004.
- BEM MAMOU, C.; GAMACHE, K.; NADER, K. NMDA receptors are critical for unleashing consolidated auditory fear memories. **Nature Neuroscience**, v. 9, p. 1237-1239, 2006.
- BERLEZE, D. B.; SAUZEM, P. D.; CARATI, M. C.; GUERRA, G. P.; STIEGEMEIER, J. A.; MELLO, C. F.; RUBIN, M. A. Time-dependent modulation of inhibitory avoidance memory by spermidine in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 83, p. 48-53, 2005.
- BONINI, J. S.; Da SILVA, W. C.; BEVILAQUA, L. R. M.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. On the participation of hippocampal PKC in acquisition,

- consolidation and reconsolidation of spatial memory. **Neuroscience**, v. 147, p. 37-45, 2007
- BOUTON, M. E. Context and behavioral processes in extinction. **Learning & Memory**, v. 11(5), p. 485-494, 2004.
- BUCHERELLI, C.; BALDI, E.; MARIOTTINI, C.; PASSANI, M. B.; BLANDIA, P. Aversive memory reactivation engages in the amygdala only some neurotransmitters involved in consolidation. **Learning & Memory**, v. 13, p. 426-430, 2006.
- BUSTOS, S. G.; GIACHERO, M.; MALDONADO, H.; MOLINA, V. A. Previous stress attenuates the susceptibility to Midazolam's disruptive effect on fear memory reconsolidation: influence of pre-reactivation D-cycloserine administration. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, p. 1097-1108, 2010.
- CAMERA, K.; MELLO, C. F.; CERETTA, A. P.; RUBIN, M. A. Systemic administration of polyaminergic agents modulate fear conditioning in rats. **Psychopharmacology**, v. 192, p. 457-464, 2007.
- CARTER, C. Neuropharmacology of polyamines. **Academic Press**, 1994.
- CASABONA, G. Intracellular signal modulation: a pivotal role for protein kinase C. **Progress in Neuro-Psychopharmacology Biological & Psychiatry**, v. 21(3), p. 407-425, 1997.
- CELANO, P.; BAVLIN, S. B.; CASERO, R. A. Jr. Polyamines differentially modulate the transcription of growth-associated genes in human colon carcinoma cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 8922-8927, 1989.
- CHARLIER, Y.; TIRELLI, E. Differential effects of histamine H(3) receptor inverse agonist thioperamide, given alone or in combination with the N-methyl-d-aspartate receptor antagonist dizocilpine, on reconsolidation and consolidation of a contextual fear memory in mice. **Neuroscience**, v. 193, p. 132-142, 2011.
- CHEN, D. Y.; STERN, S. A.; GARCIA-OSTA, A.; SAUNIER-REBORI, B.; POLLONINI, G.; BAMBAH- MUKKU, D.; BLITZER, R. D.; ALBERINI, C. M. A critical role for IGF-II in memory consolidation and enhancement. **Nature**, v. 469, p. 491-497, 2011.
- CHIA, C.; OTTO, T. Hippocampal Arc (Arg3.1) expression is induced by memory recall and required for memory reconsolidation in trace fear conditioning. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 106, p. 48-55, 2013.
- COFFINO, P. Regulation of cellular polyamines by antizyme. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2, p. 188-194, 2001.
- CRESPO, J. A.; STOCKL, P.; UEBERALL, F.; JENNY, M.; SARIA A.; ZERNING, G. Activation of PKCzeta and PKMzeta in the nucleus accumbens core is necessary for the retrieval, consolidation and reconsolidation of drug memory. **PLoS One**, v. 7, p. 1-10, 2012.
- DEBIEC, J.; LEDOUX, J. E.; NADER, K. Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. **Neuron**, v. 36, p. 527-38, 2002.
- DEBIEC, J.; LEDOUX, J. E. Disruption of reconsolidation but not consolidation of auditory fear conditioning by noradrenergic blockade in the amygdala. **Neuroscience**, v. 129, p. 267-272, 2004.
- DUDAI, Y. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? **Annual Review of Psychology**, v. 55, p. 51-86, 2004.
- EINARSSONI, E. O.; NADER, K. Involvement of the anterior cingulate cortex in formation, consolidation, and reconsolidation of recent and remote contextual fear memory. **Learning & Memory**, v. 19, p. 449-452, 2012.

- FLINT, R. W. Jr.; NOBLE, L. J.; ULMEN, A. R. NMDA receptor antagonism with MK-801 impairs consolidation and reconsolidation of passive avoidance conditioning in adolescent rats: Evidence for a state dependent reconsolidation effect. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 101, p. 114–119, 2013.
- FRUHAUF, P. K. S.; INEU, R. P.; TOMAZI, L.; DUARTE, T.; MELLO, C. F.; RUBIN, M. A. Spermine reverses lipopolysaccharide-induced memory deficit in mice. **Jurnal of Neuroinflammation**, v. 12 (3), p. 1-11, 2015.
- GAMACHE, K.; PITMAN, R. K.; NADER, K. Preclinical evaluation of reconsolidation blockade by clonidine as a potential novel treatment for posttraumatic stress disorder. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, p. 2789-2796, 2012.
- GLASER, V.; CARLINI, V. P.; GABACH, L.; De BARIOGLIO, S. R.; RAMIREZ, O. A.; PEREZ, M. F.; LATINI, A. The intra-hippocampal leucine administration impairs memory consolidation and LTP generation in rats. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 30, p. 1067-1075, 2010.
- GOMES, G. M.; MELLO, C. F.; DA ROSA, M. M.; BOCHI, G. V.; FERREIRA, J.; BARRON, S., RUBIN, M. A. Polyaminergic agents modulate contextual fear extinction in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 93, p. 589-595, 2010.
- GOULD, T. D.; MANJI, H. K. Signaling networks in the pathophysiology and treatment of mood disorders. **Journal of Psychosomatic Research**, v. 21 (3), p. 407-425, 2002.
- GUERRA, G. P.; MELLO, C. F.; SAUZEM, P. D.; BERLEZE, D. B.; FURIAN, A. F.; TABARELLI, Z.; RUBIN, M. A. Nitric oxide is involved in the memory facilitation induced by spermidine in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 186, p. 150-158, 2006.
- 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. Hippocampal PKA/CREB pathway is involved in the improvement of memory induced by spermidine in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 96, p. 324-332, 2011.
- GUERRA, G. P.; MELLO, C. F.; BOCHI, G. V.; PAZINI, A. M.; ROSA, M. M.; FERREIRA, J.; RUBIN, M. A. Spermidine-induced improvement of memory involves a cross-talk between protein kinases C and A. **Journal of Neurochemistry**, v. 122, p. 363-373, 2012.
- HARRIS, J. A.; JONES, M. L.; BAILEY, G. K.; *et al.*, Contextual control over conditioned responding in an extinction paradigm. **Journal of Experimental Psychology Animal Behavior Processes**, v. 26, p. 179-85, 2000.
- IGARASHI, K.; KASHIWAGI, K. Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 271, p. 559-564, 2000.
- IGARASHI, K.; KASHIWAGI, K. Modulation of cellular function by polyamines. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 42, p. 39-51, 2010.
- IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 68, p. 285-316, 1997.
- IZQUIERDO, I. Memória: Iván Izquierdo, **Artmed**, 2002.
- IZQUIERDO, I. Memória, **Artmed**, 2011.

- JI, J. Z.; WANG, X. M.; LI, B. M. Deficit in long-term contextual fear memory induced by blockade of beta-adrenoceptors in hippocampal CA1 region. **European Journal of Neuroscience**, v. 17, p. 1947-1952, 2003.
- JOHNSON, T. D. Modulation of channel function by polyamines. **Trends in Pharmacological Science**, v. 17, p. 22-27, 1996.
- JOHNSON, L. R.; MCCORMACK, S. A. Healing of Gastrointestinal Mucosa: Involvement of Polyamines. **News in Physiological Sciences**, v. 14, p. 12-17, 1999.
- KIDA, S.; JOSSELYN, S. A.; PENA DE ORTIZ, S.; KOGAN, J. H.; CHEVERE, I.; MASUSHIGE, S.; SILVA, A. J. CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. **Nature Neuroscience**, v. 5, p. 348-355, 2002.
- KIM, J.; KWON, J. T.; KIM, H. S.; JOSSELYN, S. A.; HAN, J. H. Memory recall and modifications by activating neurons with elevated CREB. **Nature Neuroscience**, v. 17(1), p. 65-72, 2014.
- KISHIMOTO, A.; TAKAI, Y.; MORI, T.; KIKKAWA, U.; NISHIZUKA, Y. Activation of calcium and phospholipid dependent protein kinase by diacylglycerol: its possible relation to phosphatidyl inositol turnover. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 2 (55), p. 2273-2276, 1980.
- KLECKNER, N. W.; DINGLEDINE, R. Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. **Science**, v. 241, p. 835-837, 1988.
- KRAUSS, M.; WEISS, T.; LANGNAESE, K.; RICHTER, K.; KOWSKI, A.; VEH, R. W.; LAUBE, G. Cellular and subcellular rat brain spermidine synthase expression patterns suggest region-specific roles for polyamines, including cerebellar pre-synaptic function. **Journal of Neurochemistry**, v. 103, p. 679-693, 2007.
- LEE, J. L.; EVERITT, B. J.; THOMAS, K. L. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. **Science**, v. 304, p. 839-843, 2004.
- LEE, J. L.; MILTON, A. L.; EVERITT, B. J. Reconsolidation and extinction of conditioned fear: inhibition and potentiation. **Journal of Neuroscience**, v. 26, p. 10051-10056, 2006.
- LEE, J.L. Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. **Nature Neuroscience**, v. 11, p. 1264-1266, 2008.
- LEE, J. L. C.; HYND, E. Divergent Cellular Pathways of Hippocampal Memory Consolidation and Reconsolidation. **Hippocampus**, v. 23, p. 233-244, 2013.
- LEWIS, D.J. Psychobiology of active and inactive memory. **Psychological Bulletin**, v. 86 (5), p. 1054-1083, 1979.
- LOPEZ, J.; GAMACHE, K.; SCHNEIDER, R.; NADER, K. Memory Retrieval Requires Ongoing Protein Synthesis and NMDA Receptor Activity-Mediated AMPA Receptor Trafficking. **The Journal of Neuroscience**, v. 35, p. 2465-2475, 2015.
- LYNCH, D. R.; LAWRENCE, J. J.; LENZ, S.; ANEGAWA, N. J.; DICHTER, M.; PRITCHETT, D. B. Pharmacological characterization of heterodimeric NMDA receptors composed of NR1a and 2B subunits: differences with receptors formed from NR1a and 2A. **Journal of Neurochemistry**, v. 64, p. 1462-1468, 1995.
- MAREN, S. Synaptic mechanisms of associative memory in the amygdala. **Neuron**, v. 47, p. 783-786, 2005.

- McGAUGH, J. L.; IZQUIERDO, I. The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 21, p. 208-210, 2000.
- McGAUGH, J. L. Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective. **Trends in Neurosciences**, v. 25, p. 456-461, 2002.
- MERLO, E.; MILTON, A.L.; GOOZEE, Z.Y.; THEOBALD, D.E.; EVERITT, B. J. Reconsolidation and Extinction Are Dissociable and Mutually Exclusive Processes: Behavioral and Molecular Evidence. **The Journal of Neuroscience**, v. 34(7), p. 2422-243, 2014.
- MILTON, A. L.; EVERITT, B. J. The psychological and neurochemical mechanisms of drug memory reconsolidation: implications for the treatment of addiction. **The European Journal of Neuroscience**, v. 31, p. 2308-19, 2010.
- MILTON, A. L.; MERLO, E.; RATANO, P.; GREGORY, B. L.; DUMBRECK, J. K.; EVERITT, B. J. Double dissociation of the requirement for GluN2B- and GluN2A-containing NMDA receptors in the destabilization and restabilization of a reconsolidating memory. **Journal of Neuroscience**, v. 33, p. 1109-1115, 2013.
- MISANIN, J. R.; MILLER, R. R.; LEWIS, D. J. 1968. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. **Science**, v. 160, p. 554-555, 1968.
- MOINARD, C.; CYNOBER, L.; De BANDT, J. P. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. **Clinical Nutrition**, v. 24, p. 184-197, 2005.
- MONY, L.; KEW, J. N.; GUNTHORPE, M. J.; PAOLETTI, P. Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors: molecular mechanisms and therapeutic potential. **British Journal of Pharmacology**, v. 157, p. 1301-1317, 2009.
- MONY, L.; ZHU, S.; CARVALHO, S.; PAOLETTI, P. Molecular basis of positive allosteric modulation of GluN2B NMDA receptors by polyamines. **The Embo Journal**, v. 30, p. 3134-3146, 2011.
- MORGAN, D. M. Polyamines. An overview. **Molecular Biotechnology**, v. 11, p. 229-250, 1999.
- MORRISON, L. D.; KISH, S. J. Brain polyamine levels are altered in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 197, p. 5-8, 1995.
- MOTT, D. D.; WASHBURN, M. S.; ZHANG, S.; DINGLEDINE, R. J. Subunit-dependent modulation of kainate receptors by extracellular protons and polyamines. **Journal of Neuroscience**, v. 23, p. 1179-1188, 2003.
- MÜLLER, C. P.; SHUMANN, G. Drugs as instruments: a new framework for non-addictive psychoactive drug use. **The Behavioral and Brain Sciences**, v. 34(6), p. 293-10, 2011.
- NADEL, L.; HUPBACH, A.; GOMEZ, R.; NEWMAN-SMITH, K. Memory formation, consolidation and transformation. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 36, p. 1640-1645, 2012.
- NADER, K.; SCHAFF, G. N. E.; Le DOUX, J. E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. **Nature**, v. 406, p. 722-726, 2000.
- NADER, K.; HARDT, O. A single standard for memory: the case for reconsolidation. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, p. 224-234, 2009.
- NADER, K.; HARDT, O.; LANIUS, R. Memory as a new therapeutic target. **Dialogues in Clinical Neuroscience**, v. 15, p. 475-486, 2013.
- OGITA, K.; MIYAMOTO, S.; YAMAGUCHI, K.; KOIDE, H.; FUJISAWA, N.; KIKKAWA, U.; SAHARA, S.; FUKAMI, Y.; NISHIZUKA, Y. Isolation and

- characterization of delta-subspecies of protein kinase C from rat brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, p. 1592-1596, 1992.
- OSADA, S.; MIZUNO, K.; SAIDO, T. C.; AKITA, Y.; SUZIKI, K.; KUROKI, T.; OHNO, S. A phorbol ester receptor/protein kinase, nPKC zeta, a new member of protein kinase C family predominantly expressed in lung and skin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 22434-22440, 1990.
- OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Progress in Neurobiology**, v. 54, p. 581-618, 1998.
- PAOLETTI, P.; NEYTON, J. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 7, p. 39-47, 2007.
- PAOLETTI P; BELLONE, C.; ZHOU, Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 14, p. 383-400, 2013.
- PEGG, A. E. Mammalian polyamine metabolism and function. **IUBMB Life**, v. 61, p. 880-894, 2009.
- PORTERO-TRESSERRA, M.; MARTI-NICOLOVIUS, M.; GUILLAZO-BLANCH, G.; BOADAS-VAELLO, P.; VALE-MARTINEZ, A. D-cycloserine in the basolateral amygdala prevents extinction and enhances reconsolidation of odor-reward associative learning in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 100, p. 1-11, 2012.
- QUILLFELDT, J. A. Behavioral Methods to Study Learning and Memory in Rats. v. 21, 2006.
- QUIRK, G. J. Memory for extinction of conditioned fear is long-lasting and persists following spontaneous recovery. **Learning & memory**, v. 9(6), p. 402-407, 2002.
- QUIRK, G. J.; MUELLER, D. Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. **Neuropsychopharmacology**, v. 33, p. 56-72, 2008.
- REYNOLDS, I. J. Arcaine is a competitive antagonist of the polyamine site on the NMDA receptor. **European Journal of Pharmacology**, v. 177, p. 215-216, 1990.
- RIBEIRO, D. A.; MELLO, C. F.; SIGNOR, C.; RUBIN, M. A. Polyaminergic agents modulate the reconsolidation of conditioned fear. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 104, p. 9-15, 2013.
- RODRIGUEZ, M. L.; CAMPOS, J.; FORCATO, C.; LEIGUARDA, R.; MALDONADO, H.; MOLINA, V. A.; PEDREIRA, M. E. Enhancing a declarative memory in humans: the effect of clonazepam on reconsolidation. **Neuropharmacology**, v. 64, p. 432-442, 2013.
- ROSSATO, J. I.; BEVILAQUA, L. R.; IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H.; CAMMAROTA, M. Retrieval induces reconsolidation of fear extinction memory. **PNAS**, v. 107, p. 21801-21805, 2010.
- ROSSATO, J. I.; BEVILAQUA, L.R.; MYSKIW, J.C.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. **Learning & Memory**, v. 14, p. 36-46, 2007.
- RUBIN, M. A.; BOEMO, R. L.; JURACH, A.; ROJAS, D. B.; ZANOLLA, G. R.; OBREGON, A. D.; SOUZA, D. O.; MELLO, C. F. Intrahippocampal spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. **Behavioural Pharmacology**, v. 11, p. 57-61, 2000.

- RUBIN, M. A.; STIEGEMEIER, J. A.; VOLKWEIS, M. A.; OLIVEIRA, D. M.; FENILI, A. C.; BOEMO, R. L.; JURACH, A.; MELLO, C. F. Intra-amygdala spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 423, p. 35-39, 2001.
- RUBIN, M. A.; BERLEZE, D. B.; STIEGEMEIER, J. A.; VOLKWEIS, M. A.; OLIVEIRA, D. M.; DOS SANTOS, T. L.; FENILI, A. C.; MELLO, C. F. Intra-amygdala administration of polyamines modulates fear conditioning in rats. **Journal of Neuroscience**, v. 24, p. 2328-2334, 2004.
- SARA, S. J. Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. **Learning & Memory**, v. 7(2), p. 73–84, 2000.
- SANZ-CLEMENTE, A.; NICOLL, R. A.; ROCHE, K. W. Diversity in NMDA receptor composition: many regulators, many consequences. **The Neuroscientist : A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry**, v. 19, p. 62-75, 2013.
- SCATTON, B. The NMDA receptor complex. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 7, p. 389-400, 1993.
- SCHWABE, L.; NADER, K.; JENS, C. Pruessner Reconsolidation of Human Memory: Brain Mechanisms and Clinical Relevance. **Biological Psychiatry**, v. p. 1-7, 2014
- SEILER, N. Polyamine metabolism and function in brain. **Neurochemistry International**, v. 3, p. 95-110, 1981.
- SEILER, N.; DELCROS, J. G.; MOULINOX, J. P. Polyamine transport in mammalian cells. An update. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 28, p. 843-861, 1996.
- SEILER, N. Catabolism of polyamines. **Amino Acids**, v. 26, p. 217-233, 2004.
- SIGNOR, C.; MELLO, C.F.; PORTO, G.P.; RIBEIRO, D.A.; RUBIN, M.A. Spermidine improves fear memory persistence. **European Journal of Pharmacology**, v. 730, p. 72-76, 2014.
- SQUIRE, L. R.; STARK, C. E. L.; CLARK, R. E. The Medial Temporal Lobe. **Annual Review of Neuroscience**, v. 27, p. 279-306, 2004.
- STEINBERG, S. F. Structural basis of protein kinase C isoform function. **Physiological Reviews**, v. 88, p. 1341-1378, 2008.
- STICKGOLD, R. Sleep-dependent memory consolidation. **Nature**, v. 437, p. 1272-1278, 2005.
- SUN, M. K.; ALKON, D. L. Pharmacology of protein kinase C activators: cognition-enhancing and antidementic therapeutics. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 127, p. 66-77, 2010.
- TABOR, C.W.; TABOR, H. Polyamines. **Annual Review of Biochemistry**, v. 53, p. 749-790, 1984.
- TAKAI, Y.; YAMAMOTO, M.; INOUE, M.; KISHMOTO, A.; NISHIZUKA, Y. Aproxymase of cyclic nucleotide-independent protein kinase and its activation by calcium-dependent neutral protease from rat liver. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 2, p.542-550, 1997.
- TANAKA, C.; NISHIZUKA, Y. The protein kinase C family for neuronal signaling. **Annual review of Neuroscience**, v. 17, p. 551-567, 1994.
- TETI, D.; VISALLI, M.; McNAIR, H. Analysis of polyamines as markers of (patho)physiological conditions. **Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.781, p.107-149, 2002.

- THOMAS, T.; THOMAS, T.J. Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. **Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS**, v. 58, p. 244-258, 2001.
- TRONEL, S.; ALBERINI, C. M. Persistent disruption of a traumatic memory by postretrieval inactivation of glucocorticoid receptors in the amygdala. **Biological Psychiatry**, v. 62, p. 33-39, 2007.
- TRONSON, N. C.; WISEMAN, S. L.; NEVE, R. L.; NESTLER, E. J.; OLAUSSON, P.; TAYLOR, J. R. Distinctive roles for amygdalar CREB in reconsolidation and extinction of fear memory. **Learning & Memory**, v. 19(5), p. 178-181, 2012.
- TZSCHENTKE, T.M. Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. **Addiction Biology**, v.12, p. 227- 462, 2007.
- URDIALES, J. L.; MEDINA, M. A.; SANCHEZ-JIMENEZ, F. Polyamine metabolism revisited. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v.13, p.1015-1019, 2001.
- VAN DER ZEE, E. A.; DOUMA, B. R. Historical review of research on protrin kinase C in learning and memory. **Progress in Neuro-Psycopharmacology Biological & Psychiatry**, v. 21(3), p. 379-406, 1997.
- VELLOSO, N. A.; DALMOLIN, G. D.; GOMES, G. M.; RUBIN, M. A.; CANAS, P. M.; CUNHA, R. A.; MELLO, C. F. Spermine improves recognition memory deficit in a rodent model of Huntington's disease. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 92, p. 574-580, 2009.
- WILLIAMS, K. Interactions of polyamines with ion channels. **Biochemical Journal**, v. 325, p. 289-297, 1997.
- WINTERS, B. D.; TUCCI, M. C.; DACOSTA-FURTADO, M. Older and stronger object memories are selectively destabilized by reactivation in the presence of new information. **Learning & Memory**, v. 16, p. 545-553, 2009.
- YOSHIDA, M.; MEKSURIYEN, D.; KASHIWAGI, K.; KAWAI, G.; IGARASHI, K. Polyamine stimulation of the synthesis of oligopeptide-binding protein (OppA). Involvement of a structural change of the Shine-Dalgarno sequence and the initiation codon aug in oppa mRNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 22723-22728, 1999.
- ZIGMOND, M. J. *Fundamental Neuroscience*. London: Academic Press, 1999.