

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

**AGENTES POLIAMINÉRGICOS MODULAM A
EXTINÇÃO DO MEDO CONDICIONADO
CONTEXTUAL EM RATOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Guilherme Monteiro Gomes

**Santa Maria, RS, Brasil
2009**

**AGENTES POLIAMINÉRGICOS MODULAM A
EXTINÇÃO DO MEDO CONDICIONADO CONTEXTUAL
EM RATOS**

por

Guilherme Monteiro Gomes

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

Orientador: Maribel Antonello Rubin

**Santa Maria, RS, Brasil
2009**

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

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

**AGENTES POLIAMINÉRGICOS MODULAM A EXTINÇÃO DO
MEDO CONDICIONADO CONTEXTUAL EM RATOS**

Elaborada por
Guilherme Monteiro Gomes
Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

Comissão Examinadora

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

Prof. Dr. Jorge Alberto Quillfeldt (UFRGS)

Dr^a. Patrícia Dutra Sauzem (UFSM)

Santa Maria, 23 de Novembro de 2009.

Morena (minha mãe), Carlos (meu pai)
Ana (minha irmã) e Leonardo (meu irmão)

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho não seria possível sem a importante colaboração de algumas pessoas, e a estas agradeço:

Meus pais Carlos e Morena, meus irmãos Ana e Leonardo, os verdadeiros pilares para construção desta conquista.

Professora Maribel Rubin, por sua orientação, que me proporcionou três anos de intenso aprendizado. Professor Carlos Fernando de Mello sempre disposto a ajudar, desde a estatística a conclusão. Agradeço também ao professor Juliano Ferreira, por sua colaboração, e pelos ensinamentos que não se findam neste trabalho.

A “minha I.C.” Michelle Melgarejo da Rosa, pelo exemplo de dedicação e disposição, deixando dias de experimentos muito mais alegres.

A colega Nádia Aléssio Velloso, por dividir seu conhecimento e coleguismo, servindo como molde de conduta.

Aos estimados colegas de LabNeuro, que de alguma maneira colaboraram com este trabalho, e mais importante, com meu crescimento.

Ao CNPQ e demais entidades financiadoras, pela concessão de auxílio para execução deste trabalho.

*“-Quero ter um aliado, mas também desejo saber tudo o que puder. Você mesmo já disse que saber é poder.
-Não! – disse ele, com ênfase. – O poder reside no tipo de conhecimento que a gente tem.
De que adianta saber coisas inúteis?”*

(Carlos Castaneda – A Erva do Diabo)

RESUMO

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

AGENTES POLIAMINÉRGICOS MODULAM A EXTINÇÃO DO MEDO CONDICIONADO CONTEXTUAL EM RATOS

AUTOR: GUILHERME MONTEIRO GOMES

ORIENTADORA: MARIBEL ANTONELLO RUBIN

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 23 de Novembro de 2009.

As poliaminas, como espermidina e espermina, são aminas alifáticas que estão presentes no sistema nervoso central e que se ligam na subunidade NR2B do receptor N-metil-D-aspartato (rNMDA). Tem-se demonstrado que a administração sistêmica, intrahipocampal e intraamígdala de poliaminas melhoram a aquisição e retenção da memória em ratos. Entretanto, seu efeito sobre a extinção do medo condicionado não foi investigado. No presente estudo, investigamos se a administração intrahipocampal de espermidina e de antagonistas seletivos para a subunidade NR2B do rNMDA alteram a extinção do medo condicionado contextual em ratos Wistar machos. A administração intrahipocampal de espermidina (2 nmol/sítio) facilitou a extinção do medo condicionado, enquanto que a injeção dos antagonistas do rNMDA, arcaína (0,2 nmol/sítio), ifenprodil (20 nmol/sítio) e traxoprodil (0,2 nmol/sítio), bloquearam a extinção do medo condicionado contextual. Já a administração dos antagonistas do rNMDA, em doses sem efeito *per se*, reverteu a facilitação da extinção induzida por espermidina. Estes resultados sugerem que as poliaminas facilitam a extinção do medo condicionado contextual através da ativação da subunidade NR2B do rNMDA hipocampal. Tendo em vista que a terapia baseada em exposição é um método amplamente utilizado como tratamento para diversos tipos de distúrbios relacionados com ansiedade, incluindo fobias e estresse pós-traumático, a facilitação da extinção causada pela administração de espermidina coloca este composto com um possível candidato para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento destas patologias.

Palavras-Chaves: Extinção do medo, poliaminas, memória, espermidina, ifenprodil, traxoprodil, arcaína.

ABSTRACT

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

POLIAMINERGIC AGENTS MODULATE CONTEXTUAL FEAR EXTINCTION IN RATS

AUTHOR: GUILHERME MONTEIRO GOMES

ADVISOR: MARIBEL ANTONELLO RUBIN

Date and defense place: Santa Maria, 23 de Novembro de 2009

Polyamines, such as spermidine and spermine, have been reported to improve memory retention through the activation of N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAr). However whether polyamine agonists and antagonists alter extinction remains unclear. In the current study, we investigated whether spermidine and polyamine antagonists that selectively block the NR2B subunit at the NMDAr alter the extinction of contextual conditioned fear in male Wistar rats. While the bilateral intrahippocampal administration of exogenous spermidine (2 nmol/site) facilitated the extinction of fear conditioning, the injection of the antagonists arcaine (0.2 nmol/site), ifenprodil (20 nmol/site) and traxoprodil (0.2 nmol/site), disrupted fear extinction. NMDAr antagonists, at doses that had no effect per se, reversed the facilitatory effect of spermidine on fear extinction. These results suggest that exogenous and endogenous polyamines facilitate the extinction of contextual conditioned fear through activation of NR2B subunit-containing NMDAr in the hippocampus. Since extinction-based exposure therapy is widely used as treatment for a number of anxiety-related disorders, including phobias and post-traumatic stress, the currently reported facilitation of extinction by polyaminergic agents suggest these compounds as putative candidates for drug development.

Keywords: Fear extinction; Polyamine; Memory; Spermidine; Ifenprodil; Traxoprodil; Arcaine.

LISTA DE ABREVIATURAS

CR	Resposta Condicionada
CS	Estímulo Condicionado
US	Estímulo Não-Condicionado
rNMDA	Receptor N-Metil-D-Aspartato
SPD	Espermidina
L-NAME	Metil éster de N ^G -Nitro-L-Arginina
AMPA	Receptor amino-hidroxi-metil-isoxazol-propiónico
mGluR	Receptor glutamatérgico metabotrópico
CAMKII	Cálcio/calmodulina tipo II
PAF	Fator de agregação plaquetária
PKC	Proteína quinase dependente de cálcio
PKG	Proteína quinase dependente de GMPc
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
CREB	Proteína ligante do elemento responsivo ao AMPc
CO	Monóxido de carbono
NO	Óxido nítrico
ADC	Arginina descarboxilase
ODC	Ornitina descarboxilase
SAM	S-adenosilmetionina
SAMDC	S-adenosilmetionina descarboxilase
SSAT	Espermidina/espermina acetiltransferase
PAO	Poliamina oxidase
MTA	Metionina
LTP	Potencialização de Longa Duração
CPP	(±)3-(2-carboxipiperazina-4-il)-propil-1-fosfônico
NOS	Óxido nítrico sintase

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1: Cascata de eventos que ocasionam a formação de memórias.....	21
Figura 2: Fases de processamento de memórias, e seu decurso temporal.....	22
Figura 3: Estruturas cerebrais envolvidas no processamento da extinção do medo.....	24
Figura 4: Estrutura química das três poliaminas endógenas.....	25
Figura 5: Rotas de metabolismo e interconversão das poliaminas.....	27
Figura 6: Distintas ações da espermina sobre o rNMDA.....	29

Manuscrito

Fig. 1. Schematic representation of the behavioral procedure.....	47
Fig. 2. Effect of intrahippocampal spermidine administration on extinction of conditioned fear.....	47
Fig. 3. Effect of intrahippocampal administration of different antagonists of the NMDAr on extinction of conditioned fear.....	48
Fig. 4. Effect of the intrahippocampal coadministration of spermidine (2 nmol) and (A) ifenprodil (2 nmol), (B) traxoprodil (0.02 nmol) or (C) arcaine (0.02 nmol) on the extinction of conditioned fear.....	49

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS	x
APRESENTAÇÃO.....	xii
1. Introdução.....	14
1.1 Objetivos.....	16
2. Revisão Bibliográfica.....	18
2.1 Memória.....	18
2.2 Mecanismos de Memória.....	20
2.3 Extinção da Memória.....	22
2.4 Poliaminas.....	25
2.5 Biosíntese das poliaminas	26
2.6 Poliaminas e o receptor NMDA.....	28
2.7 Interação Poliaminas, receptor NMDA e memória.....	29
3. Manuscrito	32
4. Discussão.....	50
5. Conclusão	55
6. Referências Bibliográficas.....	56
7. Anexo	62

APRESENTAÇÃO

Na introdução está descrita uma breve abordagem geral sobre os temas abordados nesta dissertação. A revisão bibliográfica apresenta uma revisão sucinta sobre os temas trabalhados nesta dissertação. As seções discussão e conclusão, encontradas ao fim desta dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre a mesma. As referências bibliográficas encontradas ao final desta dissertação referem-se somente as citações que aparecem na introdução, revisão bibliográfica e discussão.

Os resultados que fazem parte dessa dissertação estão apresentados sob forma de manuscrito, submetido para o periódico *Neurobiology of Learning and Memory*, em fase de revisão. As seções Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio manuscrito e representam a íntegra deste estudo. Em anexo encontram-se as cartas dos revisores do manuscrito submetido para publicação.

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

A extinção da memória refere-se à alteração de um comportamento condicionado, quando a associação, que condiciona a resposta, muda ou é retirada do contexto. Por exemplo, no condicionamento Pavloviano, a resposta condicionada (CR = medo) diminui gradativamente a cada exposição ao estímulo condicionado (CS = ambiente) quando este é aplicado sem a exposição ao estímulo não-condicionado (US = choque), processo denominado extinção (Lovibond, 2004). Entretanto, com o passar do tempo, uma reexposição ao CS pode reativar a resposta extinta, um fenômeno denominado “recuperação espontânea” (Bouton, 2004). A extinção da memória é considerada um novo aprendizado e não um simples esquecimento, e esta envolve o córtex ventromedial, pré-frontal, hipocampo, núcleo basolateral da amígdala e córtex entorrinal (Szapiro et. al., 2003, Lebron et. al., 2004, Cammarota et. al., 2005, Bevilaqua et. al., 2006). As bases biológicas da extinção são semelhantes às da formação da memória: envolvem ativação da subunidade NR2B do receptor N-Metil-D-Aspartato (rNMDA), expressão gênica e síntese protéica (Lin et. al., 2003, Vianna et. al., 2003, Cammarota et. al., 2005).

As poliaminas, como a espermidina e espermina, são um grupo de aminas alifáticas necessárias para o crescimento e diferenciação celular, estando presentes em altas concentrações no sistema nervoso central. As poliaminas são importantes moduladores de alguns canais iônicos, incluindo o rNMDA (Williams, 1997a), o qual está envolvido na formação da memória.

Vários relatos demonstram que as poliaminas melhoram a memória e atenuam déficits de memória induzidos por diferentes agentes amnésicos (Shimada et. al., 1994, Kishi et. al., 1998, Meyer et. al., 1998, Rubin et. al., 2000, Rubin et. al., 2001, Mikolajczak et. al., 2002, Rubin et. al., 2004, Tadano et. al., 2004, Berlese et. al., 2005, Camera et. al., 2007). A administração sistêmica, intra-hipocampal e intra-amígdala de espermidina (SPD) melhora o desempenho dos animais nas tarefas de esquiva inibitória (Rubin et. al., 2000, Rubin et. al., 2001) e de medo condicionado (Rubin et. al., 2004, Camera et. al., 2007). O efeito da SPD no teste de esquiva inibitória ocorre somente nas fases de aquisição e início da consolidação da memória, não ocorrendo nas fases de consolidação final e nem na evocação da memória (Berlese et. al., 2005). Além disso, a administração sistêmica e intra-amígdala, mas não intra-hipocampal de arcaína,

antagonista do sítio das poliaminas no rNMDA, piora o desempenho de animais no teste de esquiva inibitória e medo condicionado (Rubin et. al., 2004, Camera et. al., 2007). Este efeito facilitador da memória induzido por SPD parece depender do rNMDA, uma vez que a administração de MK-801, antagonista deste receptor, e de arcaína revertem a melhora da memória induzida por SPD (Rubin et. al., 2000, Rubin et. al., 2001, Rubin et. al., 2004, Camera et. al., 2007). Além disso, o efeito da SPD parece depender da atividade da enzima óxido nítrico sintase hipocampal e da produção de óxido nítrico, uma vez que a administração intra-hipocampal de metil éster de N^G-Nitro-L-arginina (L-NAME), um inibidor não específico da enzima óxido nítrico sintase, imediatamente após o treino previne a melhora da memória causada por SPD na tarefa de esquiva inibitória . A SPD aumenta os níveis de nitratos e nitritos, e a co-administração de L-NAME previne este efeito (Guerra et. al., 2006). Apesar de os agentes poliaminérgicos modularem o rNMDA e a memória, seu efeito sobre a extinção da memória ainda é pouco estudado.

Levando em consideração que os agentes poliaminérgicos ligam-se no rNMDA e alteram a aquisição e consolidação de memórias, estas substâncias também poderiam modular a extinção de memórias traumáticas. Portanto, neste trabalho investigamos se a administração intrahipocampal de espermidina modula a extinção do medo condicionado e se o efeito da espermidina sobre a extinção depende da subunidade NR2B do rNMDA.

1.1 Objetivos

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar os efeitos dos agentes poliaminérgicos sobre a extinção do medo condicionado contextual em ratos.

Objetivos específicos

1- Avaliar o efeito do agonista do sítio das poliaminas no rNMDA espermidina, sobre a extinção do medo condicionado contextual.

2- Avaliar o efeito dos antagonistas da subunidade NR2B do rNMDA ifenprodil, traxoprodil e arcaína, sobre a extinção do medo condicionado contextual.

3- Avaliar se a ação da espermidina sobre a extinção do medo condicionado é dependente da subunidade NR2B do rNMDA.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Memória

Memória é o substrato do nosso ser, o portal da nossa existência. Todas nossas vivências e ações são dependentes de nossos aprendizados, experiências e lembranças. Não podemos executar tarefas que não sabemos como fazer, nem mesmo comunicar fatos que desconhecemos.

Uma memória forma-se a partir de uma experiência, adquirida através dos sentidos na maioria das vezes. O perfume de uma flor, andar de bicicleta, aprender uma língua estrangeira são exemplos de experiências que podem ficar armazenadas por minutos, meses ou anos, e que também podem ser adquiridas nesse mesmo período de tempo. Estas experiências, para tornarem-se um fragmento de memória devem passar por três fases: aquisição, consolidação e evocação (Izquierdo, 2002).

Há tantas memórias possíveis como há experiências, por isso, é útil fazer uma classificação dos tipos de memória, de acordo com sua função, conteúdo e duração. A memória para fatos e eventos é denominada memória declarativa, que faz referência não só à possibilidade de evocar conscientemente fatos e eventos, mas sugere também que se possa fazê-lo mediante fala, empregando linguagem complexa, com vocabulário e sintaxe. Estas memórias são frequentemente formadas com facilidade, mas também podem ser facilmente esquecidas. As memórias declarativas podem ser divididas em episódicas, quando se referem a eventos que assistimos ou dos quais participamos, como o cardápio do almoço, ou ainda a janta entre amigos do fim-de-semana, e semânticas, quando se referem a conhecimentos gerais, como a capital do Japão ou o conteúdo de uma aula de história. (Eichenbaum, 2001, Izquierdo, 2002). O processamento das memórias declarativas envolve o hipocampo, o córtex entorrinal e outras áreas corticais. Entre as memórias declarativas, as mais aversivas, emocionais ou alertantes são fortemente moduladas pelos núcleos basal e lateral da amígdala (Izquierdo and McGaugh, 2000).

Existem memórias de capacidades ou habilidades motoras ou sensoriais, o que usualmente chamamos de hábitos, denominadas de memórias não-declarativas ou memórias de procedimentos, como por exemplo, andar de bicicleta, dirigir um

automóvel ou tocar violino. São memórias difíceis de “declarar” e normalmente não são evocadas de maneira consciente. A formação de memórias não-declarativas necessita de repetição e prática durante certo período, mas essas memórias têm menor probabilidade de serem esquecidas. As memórias de procedimentos são processadas pelo neostriatum e pelo cerebelo e sistemas a eles associados (Izquierdo and McGaugh, 2000, Izquierdo, 2002, Robertson et. al., 2004),

A Memória de trabalho é muito breve e fugaz, e serve para gerenciar a realidade, e determinar o contexto em que fatos e acontecimentos ocorrem. Este tipo de informação dura poucos segundos, e assim o cérebro reconhece se a informação que está sendo processada é nova ou não, se é importante, e se requer resposta imediata ou não. Um bom exemplo é quando perguntamos para alguém o número de telefone de um médico, informação esta que dura o tempo suficiente para fazermos a ligação, pois logo após a esquecemos (Izquierdo, 2002, de Fockert, 2005). A memória de trabalho depende da transmissão glutamatérgica no córtex pré-frontal e colinérgica na amígdala (Artiges et. al., 2000, Ashby and O'Brien, 2005).

As memórias também podem ser classificadas de acordo com sua duração, existindo memórias que deixam traços de curta (horas) ou longa duração (dias, décadas). As memórias de curta duração duram pouco tempo (minutos ou 3 a 6 horas) enquanto a memória de longa duração está sendo formada. Se estas memórias durarem muitos meses ou anos costumam ser denominadas de memórias remotas (Kandel, 1997, Izquierdo, 2002). A memória de curta duração faz o processamento mnemônico enquanto a memória de longa duração não foi ainda construída. A fase em que somente possuímos completa a memória de curta duração e a de longa duração não está fixada, é lábil: um traumatismo craniano, um eletrochoque ou intoxicação alcoólica impedem que se fixem memórias que acabam de ser adquiridas (Izquierdo, 2002). As memórias de curta e de longa duração requerem as mesmas estruturas nervosas, mas envolvem mecanismos separados como, por exemplo, ativação de genes e produção de novas proteínas (Izquierdo et. al., 1998, Izquierdo, 2002).

2.2 Mecanismos de Memória

As memórias não são adquiridas imediatamente na sua forma final. A formação de memórias de longa duração envolve uma série de processos metabólicos em distintas estruturas cerebrais que compreendem diversas fases e que requerem entre três a oito horas para serem processadas (Abel and Lattal, 2001). Aquisição é o período em que ocorre o aprendizado de uma nova informação. Denomina-se consolidação o conjunto de processos necessários para passar uma informação recém adquirida de um estado lábil a um estado estável, o que pode durar horas. Durante a fase de consolidação as memórias estão suscetíveis a interferência por outras memórias, por drogas ou outros tratamentos (Izquierdo and McGaugh, 2000). Quando recordamos a informação adquirida, nossa memória passa por um processo de evocação. Evidências sugerem que aquisição e evocação possuem mecanismos bioquímicos distintos e envolvem uma série de eventos moleculares que ocorrem de maneira específica e coordenada em diferentes regiões cerebrais (Abel and Lattal, 2001, Izquierdo et. al., 2006).

A formação de uma nova memória inicia-se em uma cascata de eventos decorrentes da liberação de glutamato (Figura 1), que se liga a receptores específicos na membrana pós-sináptica, são eles ácido amino-hidroxi-metil-isoxazol-propiónico (AMPA), rNMDA e receptor glutamatérgico metabotrópico (mGluR). A despolarização causada pela ativação destes receptores leva a um aumento na concentração de Ca^{2+} intracelular. Este aumento na $[Ca^{2+}]$, somado aos efeitos da ativação de proteínas G pelos receptores glutamatérgicos metabotrópicos, ativa uma série de enzimas, tais como proteínas quinase dependente de cálcio/calmodulina tipo II (CaMKII – atua fosforilando e ativando os receptores AMPA) e proteínas quinase dependentes de GMPc (PKG). Ativação de PKG irá liberar substâncias como óxido nítrico, monóxido de carbono e fator de agregação plaquetária (PAF) as quais aumentam ainda mais a liberação de glutamato. A proteína quinase dependente de cálcio (PKC), também atua neste processo, fosforilando a proteína do terminal axônico, GAP-43, que leva a liberação de mais glutamato. Passadas 3 a 4 horas, são ativadas as proteínas quinase dependentes de AMPc (PKA) e as proteínas ativadas por mitógeno (MAPK). Estas junto com a PKC irão fosforilar fatores de transcrição protéicos no núcleo, denominada proteína ligante do elemento responsivo ao AMPc (CREB), que ativa vários *loci* genéticos e induz a síntese de diversas proteínas, aumentando assim a efetividade de transmissão de

informação entre os neurônios (Bliss and Collingridge, 1993, Izquierdo and Medina, 1995, Izquierdo and Medina, 1997, Izquierdo and McGaugh, 2000, Izquierdo, 2002).

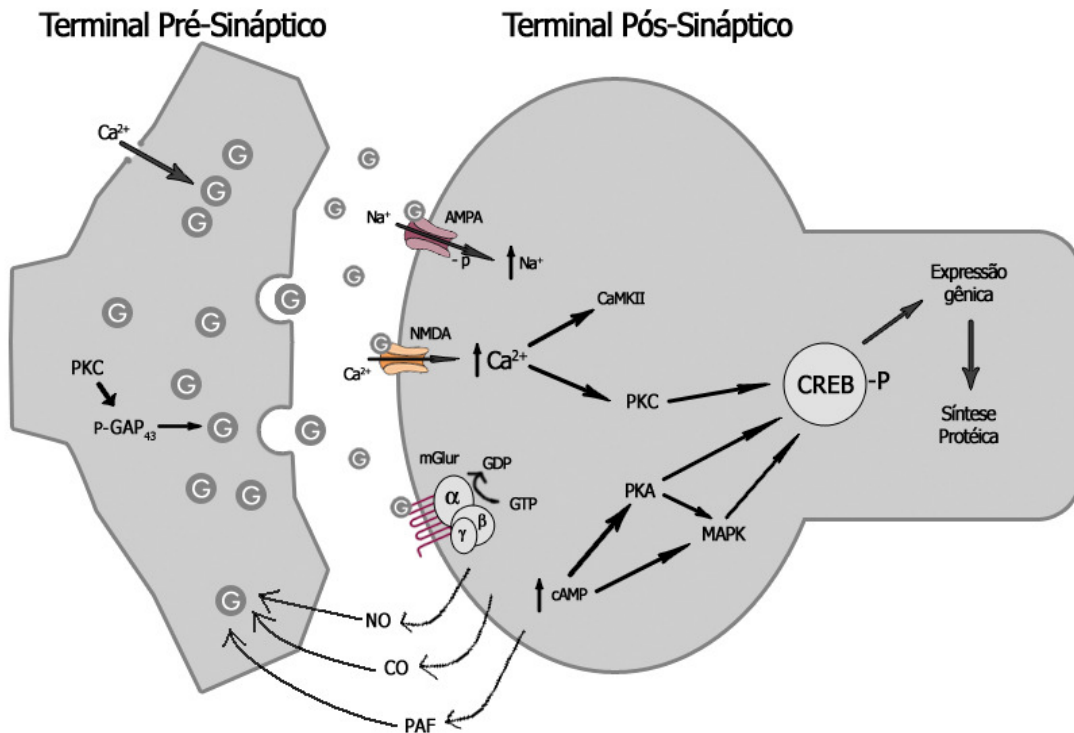


Figura 1: Cascata de eventos que ocasionam a formação de memórias. Legenda: G: Glutamato, PAF: Fator de agregação plaquetária, CO: Monóxido de carbono, NO: Óxido nítrico.

Após seu processamento, as memórias armazenadas eventualmente serão lembradas. A evocação envolve a rápida reativação de memórias que permanecem latentes. Este processo pode ser desencadeado pela rerepresentação de estímulos ou memórias relacionadas, e pelo menos nos seres humanos, pela vontade própria (Cammarota et. al., 2004). Memórias evocadas tornam-se lábeis novamente e podem tomar dois caminhos, a reconsolidação ou extinção (Figura 2) (Quirk and Mueller, 2008). Na reconsolidação ocorre um fortalecimento da informação evocada, mediante exposição ao contexto onde foi adquirida, mantendo assim essa memória permanente (Nader et. al., 2000, Debiec et. al., 2002, Izquierdo and Cammarota, 2004). A extinção envolve a aquisição de uma nova informação, e este novo aprendizado toma lugar da resposta evocada originalmente. O uso terapêutico da extinção permite que uma pessoa aprenda que um estímulo ou situação que uma vez foi perigosa, fique menos perigosa, mas, mantendo sempre um traço de memória da associação original (Izquierdo, 2002, Cammarota et. al., 2005, Quirk and Mueller, 2008).

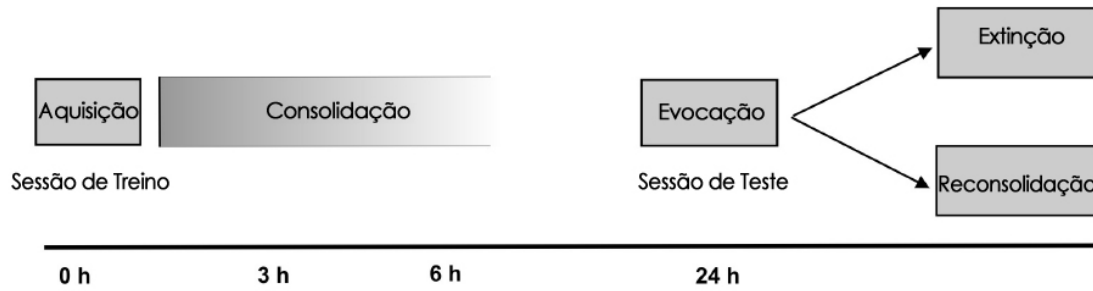


Figura 2: Fases de processamento de memórias, e seu decurso temporal (adaptado de (Bekinschtein et. al., 2008)).

2.3 Extinção da Memória

A extinção da memória refere-se à perda de um comportamento condicionado, quando a associação, que condiciona a resposta, muda ou é retirada do contexto. Por exemplo, no condicionamento Pavloviano, a resposta condicionada (CR = medo) diminui gradativamente a cada exposição ao estímulo condicionado (CS = ambiente, contexto) sem imediata exposição ao estímulo não-condicionado (US = choque), processo denominado extinção (Lovibond, 2004). Acredita-se que a diminuição da resposta condicionada deve-se a formação de um novo aprendizado, que leva a extinção da memória através de processo de consolidação dependente de síntese protéica (Berman and Dudai, 2001, Pedreira and Maldonado, 2003, Power et. al., 2006). Existem três fatores comportamentais que embasam a ideia de que a extinção é um novo aprendizado: a renovação, a recuperação espontânea e a reinstalação. Na renovação, uma resposta previamente extinguida retorna se o CS é apresentado fora do contexto de extinção (Bouton and King, 1983). Com o passar do tempo, a resposta extinta pode se reativar, um fenômeno denominado “recuperação espontânea”. O terceiro fator é a reinstalação, onde uma resposta extinta é parcialmente recuperada se o sujeito é exposto somente ao US após a sessão de extinção (Bouton, 2004). Como resultado, estes três fatores comportamentais nos indicam que o processo de extinção não apaga a associação original (CS-US) (Bouton, 2002).

A extinção do medo condicionado depende de alguns eventos moleculares, como: expressão gênica, síntese protéica e ativação do rNMDA (Lin et. al., 2003, Vianna et. al., 2003, Cammarota et. al., 2004). De fato, tem sido mostrado que a manipulação farmacológica do rNMDA em diferentes estruturas cerebrais, como amígdala e hipocampo, modula a extinção. A infusão de antagonistas do rNMDA na

amígdala ou hipocampo impede a extinção da memória tanto na tarefa de medo pontencializado pelo susto como na esQUIVA inibitória (Falls et. al., 1992, Szapiro et. al., 2003). Ainda, a subunidade NR2B do rNMDA exerce papel fundamental na modulação da extinção do medo. Sotres-Bayon e colaboradores, utilizando ifenprodil, um antagonista específico desta subunidade, mostraram que a aquisição da extinção do medo depende da subunidade NR2B do rNMDA da amígdala lateral (Sotres-Bayon et. al., 2007). A administração de ifenprodil no córtex prefrontal ou sistemicamente, imediatamente após o treino da extinção, piora a consolidação da extinção (Sotres-Bayon et. al., 2009). Já a administração de agonistas do rNMDA, como a D-cicloserina, facilita a extinção da memória em tarefas comportamentais como medo condicionado Pavloviano e labirinto vertical (Gabriele and Packard, 2007, Langton and Richardson, 2008, Yamamoto et. al., 2008). Estes dados mostram o papel crucial do rNMDA, e sua subunidade NR2B, na modulação da extinção de memórias.

A extinção da memória não se dá em uma estrutura específica do cérebro, pelo contrário, ocorre através de uma rede de estruturas, onde cada uma desempenha um papel específico. Por exemplo, ativação da amígdala pode servir para inibir a expressão do medo, enquanto que a ativação do hipocampo ou córtex prefrontal está envolvida na modulação contextual da extinção (Figura 3) (Bruchey et. al., 2007, Quirk and Mueller, 2008). A importância do hipocampo na modulação contextual da extinção é extensivamente estudada através de abordagens cirúrgicas e farmacológicas. Corcoran e Maren demonstraram que a administração de muscimol (1µg/µl), um agonista GABA_A, no hipocampo piorou a expressão da extinção do medo contextual. Ainda, lesões excitotóxicas na região CA1 do hipocampo comprometem a aquisição da extinção (Dillon et. al., 2008). Além disso, a inativação da região dorsal do hipocampo antes do treino da extinção atenua o aprendizado da extinção e piora a codificação contextual da extinção da memória (Corcoran et. al., 2005).

A manipulação de distintos sistemas de neurotransmissores, como colinérgico, canabinóide, GABAérgico e glutamatérgico causa impacto sobre a extinção de memórias traumáticas. Boccia e colaboradores revelaram que a infusão intra-amígdala de oxotremorina, um agonista muscarínico, facilita a extinção do medo contextual, mas somente quando administrado imediatamente pós-treino (Boccia et. al., 2009). A administração intraperitoneal do agonista canabinóide WIN 55,212-22 facilita a extinção do medo condicionado contextual, enquanto que a administração intrahipocampal de AM251, um agonista inverso do receptor canabinóide CB1, bloqueia a extinção do medo condicionado contextual (Pamplona et. al., 2006, de

Oliveira Alvares et. al., 2008). Ainda, um aumento na transmissão GABAérgica parece ter efeito facilitatório sobre a extinção. Muscimol, quando administrado na amígdala basolateral, antes do treino da extinção, foi capaz de facilitar a extinção, sugerindo que a neurotransmissão via GABA_A atua na consolidação da extinção do medo (Akirav et. al., 2006). Além disso, a modulação do sistema glutamatérgico pode alterar a aquisição e consolidação da extinção. A administração sistêmica ou intra-amígdala de D-cicloserina, um agonista parcial do rNMDA, melhora a extinção do medo condicionado quando injetado imediatamente pós-treino (Ledgerwood et. al., 2003). A ação da D-cicloserina também foi testada em humanos, onde esta mostrou-se capaz de melhorar a extinção do medo quando administrada logo após o aprendizado (Kalisch et. al., 2009).

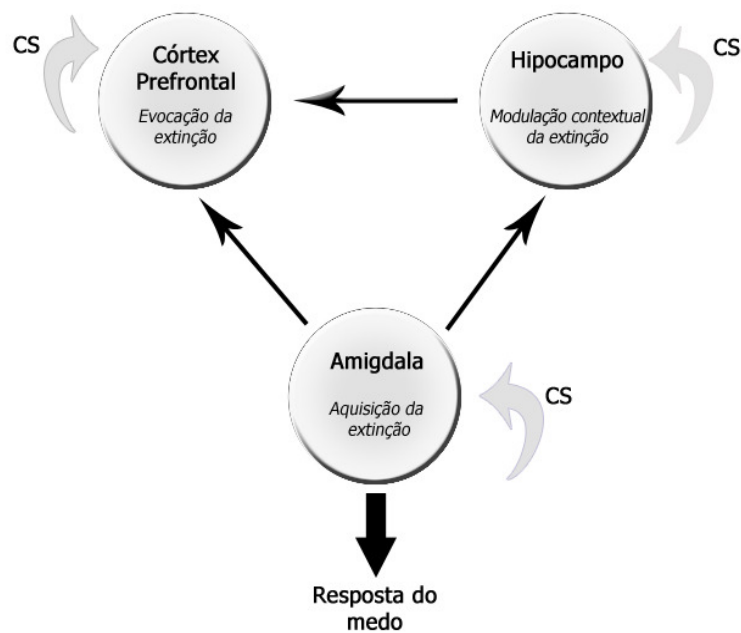


Figura 3: Estruturas cerebrais envolvidas no processamento da extinção do medo. CS: Estímulo condicionado. (Adaptado de (Quirk and Mueller, 2008).

2.4 Poliaminas

As poliaminas putrescina, espermidina e espermina, são um grupo de aminas alifáticas presentes em quase todas as células, incluindo células do sistema nervoso central. Também são constituintes de muitos compostos encontrados em plantas e insetos. Seus nomes triviais, putrescina, espermidina e espermina provem da fonte de onde foram primariamente isoladas, carne em putrefação e líquido seminal (Coffino, 2001). Desde o seu descobrimento, por Antoni van Leeuwenhoek em 1678, até o recente desenvolvimento de camundongos transgênicos expressando enzimas que alteram os níveis de poliaminas de maneira tecido-específica, o estudo de poliaminas aprofundou o conhecimento de diversos processos fisiológicos e patológicos.

A caracterização da estrutura química das poliaminas mostra que a putrescina é uma di-amina primária (1,4 – diaminobutano), espermidina é uma tri-amina (mono-*N*-3-aminopropil-1,4-diaminobutano) e a espermina é uma tetra-amina (bis-*N*-3-aminopropil-1,4-diaminobutano) (Figura 4) (Teti et. al., 2002). Em concentrações fisiológicas, as poliaminas estão envolvidas em distintos processos, como: replicação de DNA, expressão gênica, síntese protéica e funcionamento de canais iônicos e receptores de membrana (Coffino, 2001, Wang et. al., 2003, Gugliucci, 2004). De fato, sua importância na proliferação celular é tamanha que somente duas espécies – *Methanobacteriales* e *Halobacteriales*, parecem crescer na ausência de níveis detectáveis de poliaminas (Marton and Pegg, 1995)

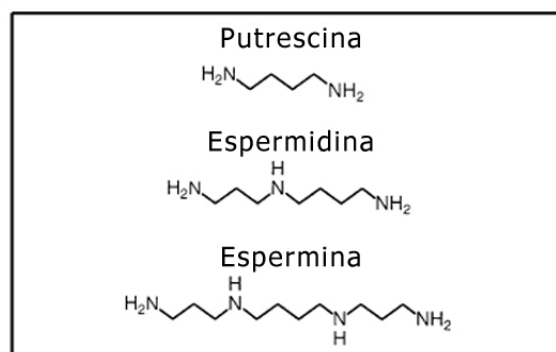


Figura 4: Estrutura química das três poliaminas endógenas.

2.5 Biosíntese das poliaminas

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

Espermina e espermidina podem ser recicladas em espermidina e putrescina respectivamente, na rota de interconversão. Estas reações dependem da formação de intermediários N-acetilados, N1-acetilespermina e N1-acetilespermidina, por ação das enzimas espermidina/espermina N¹-acetiltransferase. Subsequentemente, a enzima poliamina oxidase rompe as ligações C-N entre os resíduos aminopropil e os grupos amino secundário para formar espermidina e putrescina respectivamente. Estas reações de acetilação fornecem uma maneira para célula diminuir a interação das poliaminas com diferentes poliânions, pela redução das cargas positivas que carregam. Um aumento na excreção de poliaminas acetiladas é um dos mecanismos de controle das concentrações intracelulares de poliaminas (Morgan, 1999, Moinard et. al., 2005).

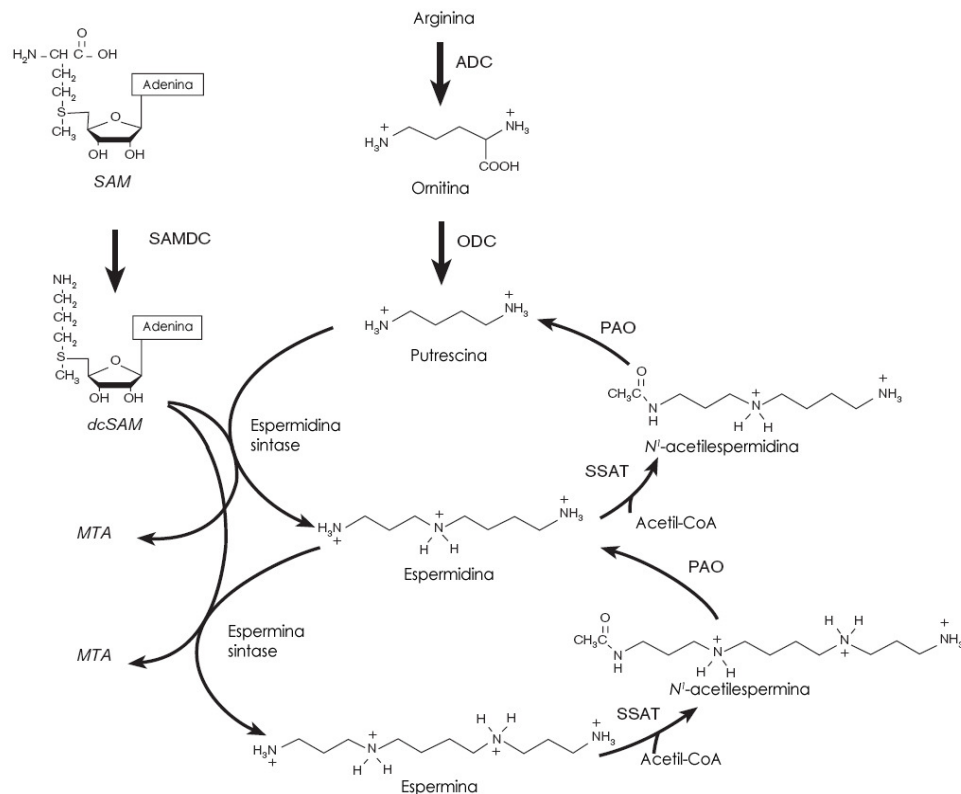


Figura 5: Rotas de metabolismo e interconversão das poliaminas. ADC: Arginina descarboxilase; ODC: Ornitina descarboxilase; SAM: S-adenosilmetionina; SAMDC: S-adenosilmetionina descarboxilase; SSAT: espermidina/espermina acetiltransferase; PAO: Poliamina oxidase; MTA: Metionina. (adaptado de (Urdiales et. al., 2001).

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

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

2.6 Poliaminas e o receptor NMDA

As poliaminas possuem a característica de serem importantes moduladores de alguns canais iônicos, podendo interagir com subtipos específicos de canais de potássio e receptores glutamatérgicos, entre eles o NMDA (Carter, 1994, Williams, 1997a).

Ranson e Stec (1988) mostraram que espermidina e espermina aumentam a afinidade do rNMDA pelo [³H]MK-801, efeito constatado na presença ou ausência de concentrações saturantes de glutamato e glicina, mostrando que o efeito estimulatório das poliaminas deve-se a sua ligação com o rNMDA (Ranson and Stec, 1988). Altas concentrações de espermidina e espermina não são efetivas em aumentar a ligação do MK-801, já baixas concentrações aumentam a afinidade do rNMDA pelo ligante, levando a uma curva de concentração-resposta bifásica (Williams et. al., 1989, Rock and Macdonald, 1995). Estudos de eletrofisiologia, juntamente com o uso de receptores recombinantes, demonstram que as poliaminas não ativam diretamente o rNMDA, mas sim atuam potencializando ou inibindo respostas mediadas pelo glutamato (Johnson, 1996). De fato, espermina pode ter tanto um efeito estimulatório como inibitório sobre o rNMDA (Figura 6). O efeito estimulatório da espermina sobre o rNMDA pode ser subdividido em: “Estimulação independente de glicina”, onde a espermina potencializa correntes de íons pelo rNMDA na presença de concentrações saturantes de glicina; “Estimulação dependente de glicina”, com espermina aumentando a afinidade do rNMDA por glicina. E os efeitos inibitórios da espermina sobre o rNMDA podem ser subdivididos em: “Diminuição da afinidade pelo glutamato”, na presença de espermina, ocorre um aumento na taxa de dissociação entre glutamato e o receptor; “Inibição voltagem-dependente”, devido a um rápido bloqueio do canal, semelhante ao realizado pelo Mg²⁺ (Williams, 1997b). Ainda, a combinação de distintas subunidades do rNMDA bem como sua expressão, podem influenciar no efeito das poliaminas neste receptor (Johnson, 1996, Williams, 1997b).

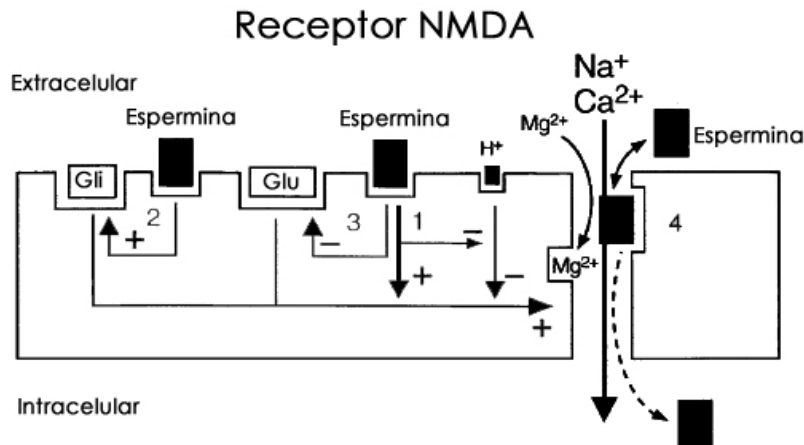


Figura 6: Distintas ações da espermina sobre o rNMDA. (Adaptado de (Williams, 1997a).

2.7 Interação Poliaminas, receptor NMDA e memória

A ativação do rNMDA está associada com diferentes formas de plasticidade sináptica, como Potencialização de Longa Duração (LTP) e aprendizado e memória (Lee and Silva, 2009). Existem vários relatos demonstrando o envolvimento das poliaminas em processos de aprendizado e memória, tanto melhorando a memória de ratos em distintas tarefas, como atenuando o déficit de memória induzido por diferentes agentes amnésicos (Shimada et. al., 1994, Kishi et. al., 1998, Meyer et. al., 1998, Rubin et. al., 2000, Rubin et. al., 2001, Mikolajczak et. al., 2002, Rubin et. al., 2004, Tadano et. al., 2004, Berlese et. al., 2005, Camera et. al., 2007).

Estudo realizado por Conway (1998) mostrou que doses diárias de espermina bloqueiam o aprendizado no labirinto aquático de Morris. Esta dose também produz morte neuronal (Conway, 1998). Já na tarefa do labirinto em T com 14 braços, espermidina (80mg/kg) administrada intraperitonealmente potencializa o déficit de memória produzido por dizocilpina (Shimada et. al., 1994). (Halonen et. al., 1993, Rock and Macdonald, 1995).

Nos últimos anos foi demonstrado que a administração sistêmica, intrahipocampal e intraamígdala de espermidina (SPD) melhora o desempenho de ratos nas tarefas de esQUIVA inibitória (Rubin et. al., 2000, Rubin et. al., 2001, Guerra et. al., 2006) e de medo condicionado (Rubin et. al., 2004, Camera et. al., 2007). O efeito da SPD no teste de esQUIVA inibitória ocorre somente nas fases de aquisição e início da consolidação da memória, não ocorrendo nas fases de consolidação final e nem na evocação da memória (Berlese et. al., 2005). A administração sistêmica e intra-amígdala

de arcaína, antagonista do sítio das poliaminas no rNMDA, piora a performance dos animais no teste de esquiva inibitória (Rubin et. al., 2000, Rubin et. al., 2001) e de medo condicionado (Rubin et. al., 2004, Camera et. al., 2007). Este efeito facilitador da memória induzido por SPD parece envolver o rNMDA, uma vez que a administração de MK-801, antagonista do rNMDA, e de arcaína revertem a melhora da memória induzida por SPD (Rubin et. al., 2000, Rubin et. al., 2001, Rubin et. al., 2004, Camera et. al., 2007). Em adição, Meyer e colaboradores demonstraram que a co-administração sistêmica de espermina e D-cicloserina reverte o déficit cognitivo induzido pelo antagonista do rNMDA ácido (\pm)-3-(2-carboxipiperazina-4-il)-propil-1-fosfônico (CPP). Além disso, o efeito da SPD parece depender da atividade da enzima óxido nítrico sintase hipocampal e da produção de óxido nítrico, uma vez que a administração intra-hipocampal de metil éster de N^G-Nitro-L-arginina (L-NAME), um inibidor não específico da enzima óxido nítrico sintase, imediatamente depois do treino previne a melhora da memória causada por SPD na tarefa de esquiva inibitória (Guerra et. al., 2006). A SPD aumenta os níveis de nitratos e nitritos, e a co-administração de L-NAME previne este efeito (Guerra et. al., 2006).

Apesar do já descrito efeito das poliaminas sobre a formação e consolidação da memória, ainda não se tem relatos do efeito destas substâncias sobre a extinção do medo condicionado contextual. Levando-se em consideração o envolvimento do rNMDA e do hipocampo na extinção do medo condicionado, o presente trabalho irá avaliar o efeito da administração intra-hipocampal de espermidina e distintos antagonistas do rNMDA na extinção do medo condicionado contextual.

3. MANUSCRITO

3. Manuscrito

Polyaminergic agents modulate contextual fear extinction in rats

Guilherme Monteiro Gomes^a, Carlos Fernando Mello^b, Michelle Melgarejo da Rosa^a,
Guilherme Vargas Bochi^a, Juliano Ferreira^a, Susan Barron^c, Maribel Antonello Rubin^{a*}

^aDepartment of Chemistry, Center of Exact and Natural Sciences,
Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 97105-900 RS, Brazil.

*Corresponding author. Fax: + 55 55 3220 8978

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

^bDepartment of Physiology and Pharmacology, Center of Health Sciences,
Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 97105-900 RS, Brazil.

^cDepartment of Psychology, University of Kentucky, Lexington, Kentucky 40506,
USA.

Abstract

Polyamines, such as spermidine and spermine, have been reported to improve memory retention through the activation of N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAr). However whether polyamine agonists and antagonists alter extinction remains unclear. In the current study, we investigated whether spermidine and polyamine antagonists that selectively block the NR2B subunit at the NMDAr alter the extinction of contextual conditioned fear in male Wistar rats. While the bilateral intrahippocampal administration of exogenous spermidine (2 nmol/site) facilitated the extinction of fear conditioning, the injection of the antagonists arcaine (0.2 nmol/site), ifenprodil (20 nmol/site) and traxoprodil (0.2 nmol/site), disrupted fear extinction. NMDAr antagonists, at doses that had no effect per se, reversed the facilitatory effect of spermidine on fear extinction. These results suggest that exogenous and endogenous polyamines facilitate the extinction of contextual conditioned fear through activation of NR2B subunit-containing NMDAr in the hippocampus. Since extinction-based exposure therapy is widely used as treatment for a number of anxiety-related disorders, including phobias and post-traumatic stress, the currently reported facilitation of extinction by polyaminergic agents suggest these compounds as putative candidates for drug development.

Keywords Fear extinction, Polyamine, Memory, Spermidine, Ifenprodil, Traxoprodil, Arcaine

Introduction

Pavlovian fear conditioning and its extinction are the most extensively studied models that provide the laboratory the tools to understand the neural mechanisms of fear and anxiety disorders in humans (Kim & Jung, 2006; Myers & Davis, 2002). Fear conditioning is a form of associative learning in which an animal (typically a rat) is exposed to the pairing of a neutral conditional stimulus (CS), such as a context, tone or light, with an aversive unconditioned stimulus (US), such as a footshock. This procedure yields a conditioned fear response to the CS, such as freezing (Lovibond, 2004). When the CS is successively presented in the absence of the US, fear is extinguished. Fear extinction is a new learning and requires activation of brain structures known to be crucial for learning, including ventromedial prefrontal cortex, basolateral amygdala, entorhinal cortex and hippocampus (Bevilaqua, Bonini, Rossato, Izquierdo, Cammarota & Izquierdo, 2006; Cammarota, Bevilaqua, Rossato, Ramirez, Medina & Izquierdo, 2005; Laurent, Marchand & Westbrook, 2008; Lebron, Milad & Quirk, 2004; Szapiro, Vianna, McGaugh, Medina & Izquierdo, 2003). Some studies have also suggested an important role for the hippocampus in extinction of contextual fear conditioning (Corcoran & Maren, 2001; Frohardt, Guarraci & Bouton, 2000). A growing body of evidence suggests that the hippocampus not only plays a role in contextual encoding and retrieval of fear extinction memories, but also interacts with other brain structures to regulate the context-specificity of fear extinction (Corcoran, Desmond Frey & Maren, 2005; Maren & Hobin, 2007).

Extinction depends on specific molecular events: gene expression, protein synthesis and activation of the N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAr) (Cammarota et al., 2005; Lin, Yeh, Lu & Gean, 2003; Vianna, Igaz, Coitinho, Medina & Izquierdo, 2003). For instance, the administration of D-cycloserine, an agonist of the NMDAr, facilitates fear extinction in distinct memory tasks (Gabriele & Packard, 2007; Langton & Richardson, 2008; Yamamoto, Morinobu, Fuchikami, Kurata, Kozuru & Yamawaki, 2008). Moreover, the administration of NMDAr antagonists, like CPP and ifenprodil, disrupt the acquisition or consolidation of fear extinction (Burgos-Robles, Vidal-Gonzalez, Santini & Quirk, 2007; Sotres-Bayon, Bush & LeDoux, 2007).

Spermidine and spermine are naturally occurring polyamines required for cell growth and differentiation, which are present at high concentrations in the brain (Johnson, 1996; Shimada, Spangler, London & Ingram, 1994; Williams, 1997; Williams, Romano, Dichter & Molinoff, 1991). Polyamines modulate some ion channels, among them the NMDAr (Ransom & Stec, 1988; Rock & Macdonald, 1995; Williams, 1997; Williams et al., 1991). The systemic, intra-hippocampal and intra-amygdalar administration of spermidine improves memory in distinct memory tasks (Berlese, Sauzem, Carati, Guerra, Stiegemeier, Mello & Rubin, 2005; Camera, Mello, Ceretta & Rubin, 2007; Guerra, Mello, Sauzem, Berlese, Furian, Tabarelli & Rubin, 2006; Rubin, Berlese, Stiegemeier, Volkweis, Oliveira, dos Santos, Fenili & Mello, 2004; Rubin, Boemo, Jurach, Rojas, Zanolla, Obregon, Souza & Mello, 2000; Rubin, Stiegemeier, Volkweis, Oliveira, Fenili, Boemo, Jurach & Mello, 2001; Shimada et al., 1994). Moreover, the intrastriatal administration of spermine reverses the deficits induced by quinolinic acid on an object recognition task (Velloso, Dalmolin, Gomes, Rubin, Canas, Cunha & Mello, 2009). The facilitatory effect of polyamines on memory appear to depend on NMDAr and nitric oxide synthase (NOS) activation (Camera et al., 2007; Guerra et al., 2006; Rubin et al., 2001).

Since the facilitatory effects of spermidine on memory are blocked by minute amounts of arcaine, an antagonist of the polyamine binding site on the NMDAr (Reynolds & Miller, 1990), the involvement of this receptor in the memory improvement induced by spermidine (Camera et al., 2007; Rubin et al., 2004; Rubin et al., 2000; Rubin et al., 2001) has been suggested. In line with this view, the noncompetitive NMDAr antagonist, MK-801, reverses the facilitatory effect of spermidine on the memory of fear (Camera et al., 2007) and the systemic and intra-amygdalar administration of arcaine, at doses higher than those required to block the facilitatory effects of spermidine, impairs the memory of inhibitory avoidance and fear conditioning tasks (Camera et al., 2007; Ceretta, Camera, Mello & Rubin, 2008; Rubin et al., 2004; Rubin et al., 2001).

Since polyaminergic binding site ligands at the NMDAr alter acquisition and consolidation of fear memories, they could also modulate the extinction of fear memories. Therefore, in this study we investigated whether the intrahippocampal infusion of spermidine could modulate the extinction of contextual fear memory in rats and if the effect of spermidine could involve the NR2B subunit of NMDAr.

Methods

Animals

Male Wistar rats (3 month old), housed in plastic cages (four to six per cage) and maintained on a 12 h light/dark cycle (lights on at 07:00 a.m.), in a temperature and humidity controlled environment were used. Food and water were available *ad libitum* (Guabi, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil). Behavioral tests were conducted during the light phase of the cycle (between 9:00 A.M. and 5:00 P.M.) using independent experimental groups of rats. All animal experimentation reported in this study was 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 0206).

Surgery

Rats were implanted, under Equithesin anesthesia (1% Phenobarbital, 2% magnesium sulphate, 4% chloral hydrate, 42% propylene glycol, 11% ethanol; 3 mL/kg, i.p.) with two guide cannulae (27-gauge) stereotaxically aimed 1 mm above the CA1 region of the hippocampus, in accordance with coordinates (A -4.0mm; L 3.0mm; V 2.0 mm) taken from the atlas of (Paxinos & Watson, 1986).

Behavioral Procedures

Conditioning, extinction training and extinction test sessions were conducted in a 25x25x30 cm test chamber. The front and ceiling walls of the chamber were made of clear acrylic plastic, whereas the lateral and rear walls were made of opaque plastic and the floor consisted of 32 stainless steel rods wired to a shock generator.

Six days after surgery, rats were submitted to fear conditioning according to Pamplona and collaborators (2006), with some modifications. Briefly, the animals were placed in the chamber (CS), and after a habituation period (3 min) they received three 2 sec, 0.6 mA scrambled footshocks (US). The shocks were 50 sec apart. After the last foot shock, the animals were left in the chamber for an additional 60 sec and were then returned to their home cages.

Twenty four hours post conditioning, animals began extinction training, which consisted of placing the animal in the same chamber for 6 min, with no shock delivered. On the next four consecutive days, rats were tested for extinction. Again they were placed in the chamber for 6 min and no shock was given (Figure 1). Freezing, defined as a stereotypic crouching position with complete immobility (except for respiratory movements), was used as a memory index during the extinction procedure (Blanchard & Blanchard, 1969). Every 4 sec throughout the test period, a time-sampling procedure was used to assess whether the animal was moving or freezing. The data was then converted into a percentage of the number of observations in which the animal displayed freezing behavior (Rubin et al., 2004). The behavior was scored by an experienced observer blind to treatment condition.

After the last test session, cannula placement was verified. All animals were infused with 0.5 µl of 4% methylene blue through the cannula. Only data from the animals with correct cannula placement were analyzed.

Drugs and treatment

Spermidine (N-[3-aminopropyl]-1,4-butanediamine trihydrochloride; Sigma) and arcaine (1,4-diguanidinobutane sulfate; Sigma St. Louis, MO) were dissolved in 50 mM phosphate buffer solution (PBS), pH 7.4. Traxoprodil (CP-101,606; Pfizer) and ifenprodil (alpha-(4-Hydroxyphenyl)-beta-methyl-4-benzyl-1-piperidineethanol tartrate salt; Sigma) were dissolved in 0.3% Tween 80 in saline solution.

In a first set of experiments dose-effect curves for spermidine and NMDAr antagonists were performed to characterize the facilitatory effect of spermidine on fear extinction and determine the doses of the antagonists that had no effect on their own. To this end, the animals received bilateral 0.5 µL injections into the hippocampi of PBS, spermidine (0.02-2 nmol), ifenprodil (0.2-20 nmol), traxoprodil (0.02-2 nmol) or arcaine (0.02-0.2

nmol). immediately after the extinction training over 1 min. The injections were performed using a Hamilton syringe and a 30-gauge needle fitted into the guide cannula, with the tip of the infusion needle protruding 1.0 mm beyond the guide cannula, aimed at the CA1 region of the hippocampus. The Hamilton syringe was driven by an automated syringe pump (Insight, Brazil) at a rate of 0.5 μ l/min. After infusions were completed, the injector needles were left in place for an additional 60 sec, to avoid backflow. Immediately following the infusions, the animals were returned to their home cages.

In a second set of experiments, it was determined whether NMDAr antagonists, at doses that had no effect per se, reverse the facilitatory effect of spermidine on fear extinction. To this end, the animals received bilateral 0.5 μ L injections into the hippocampi of PBS, spermidine (2 nmol) plus ifenprodil (2 nmol), spermidine (2 nmol) plus traxoprodil (0.02 nmol) or spermidine (2 nmol) plus arcaine (0.02 nmol), as described above.

Statistical Analysis

Statistical analyses were carried out using one-, two- or three-way analysis of variance (ANOVA) with the “sessions” factor treated as within-subject factor, followed by the Student–Newman-Keuls (SNK) Test, depending on the experiment. A $p < 0.05$ was considered significant.

Results

Repeated exposure of the CS without the US caused extinction of the original memory. Statistical analysis (one-way ANOVA) revealed that the 5-day extinction protocol decreased the freezing time of the vehicle group across successive reexposures to the conditioning chamber ($p < 0.05$, Figures 2-4).

Fig. 2 shows the effect of intrahippocampal administration of spermidine (0.02 – 2 nmol) on the extinction of conditioned fear. Statistical analysis (two-way ANOVA) revealed significant effects of pharmacological treatment ($F_{3,18} = 7.6$, $p < 0.05$) and sessions ($F_{3,54} = 137.9$, $p < 0.05$). Post hoc comparisons (Student-Newman-Keuls test)

showed that spermidine at the dose of 2 nmol/site, facilitated contextual fear extinction, as indicated by a decrease in freezing scores on Extinction tests 1 and 2, compared with the vehicle control group.

Fig. 3A shows the effects of intrahippocampal administration of the NR2B antagonist ifenprodil (0.2 – 20 nmol) on the extinction of conditioned fear. Statistical analysis (two-way ANOVA) revealed a significant effect of pharmacological treatment ($F_{3,18} = 5.15, p < 0.05$) and sessions ($F_{3,54} = 67.84, p < 0.001$) but no interaction. Post hoc analysis (Student-Newman-Keuls test) revealed that ifenprodil (at the dose of 20 nmol) impaired the extinction of contextual fear memory on Extinction tests 1, 2 and 3.

Fig. 3B shows the effects of intrahippocampal administration of the NR2B antagonist traxoprodil (0.02 – 2 nmol), on the extinction of conditioned fear. Statistical analysis (two-way ANOVA) revealed a significant interaction between traxoprodil treatment and extinction tests ($F_{12,76} = 2.85, p < 0.01$). Post hoc analysis (Student-Newman-Keuls test) revealed that 0.2 nmol of traxoprodil impaired the extinction of contextual fear memory through all the extinction tests.

The effects of intrahippocampal administration of arcaine (0.02 – 0.2 nmol), a competitive antagonist of the NMDAr polyamine-binding site, on the extinction of conditioned fear are shown in Fig. 3C. Statistical analysis (two-way ANOVA) revealed a significant effect of arcaine treatment ($F_{2,15} = 6.57, p < 0.01$) and extinction tests ($F_{3,45} = 14.2, p < 0.001$) but no treatment by extinction test interactions. Post hoc analyses (Student-Newman-Keuls test) revealed that 0.2 nmol of arcaine impaired the extinction of contextual fear memory on test 1.

The intrahippocampal coadministration of ifenprodil, at a dose that had no effect alone (2 nmol), when administered in combination with spermidine (2 nmol) reversed the facilitatory effect of spermidine alone on extinction of conditioned fear [significant NR2B agonist treatment (spermidine or PBS) X NR2B antagonist treatment (ifenprodil or saline) interaction: $F_{1,36} = 13.28, p = 0.001$, Fig. 4A]. The coadministration of traxoprodil, again at a dose that had no effect alone (0.02 nmol), when administered in combination with spermidine (2 nmol) reversed the facilitatory effect of spermidine on extinction of conditioned fear [significant NR2B agonist treatment (spermidine or PBS) X NR2B antagonist treatment (traxoprodil or saline) interaction: $F_{1,33} = 9.48, p = 0.004$, Fig. 4B]. Data from these experiments (Fig. 4A and 4B) suggest that the facilitatory effect of spermidine is a consequence of its effects on the NR2B subunit of the hippocampal NMDAr.

The coadministration of arcaine, at a dose that had no effect alone (0.02 nmol), in combination with spermidine (2 nmol) also reversed the facilitatory effect of spermidine on extinction of conditioned fear [significant NR2B agonist (spermidine or PBS) X NR2B antagonist (arcaine or saline) interaction: $F_{1,33} = 11.06$, $p=0.002$, Fig. 4C, suggesting that the facilitatory effect of spermidine may involve the polyamine-binding site on hippocampal NMDARs.

Discussion

In the present study, we showed that intrahippocampal administration of spermidine facilitated the extinction of conditioned fear (Fig. 2) in adult male Wistar rats. We also showed that intrahippocampal infusion of the antagonists of the polyamine binding site on the NR2B subunit of the NMDAR arcaine, traxoprodil or ifenprodil, immediately after the first extinction session, impaired the extinction of conditioned fear (Fig. 3). These findings suggest that endogenous polyamines modulate contextual conditioned fear extinction in the hippocampus. Furthermore, the coadministration of these NR2B antagonists, at doses that had no effect on their own, reversed the improvement of fear extinction induced by spermidine, suggesting that the effect of spermidine on extinction of conditioned fear involves NR2B-containing NMDAR. To our knowledge, this is the first study to demonstrate that a polyamine facilitates conditioned fear extinction in the hippocampus.

Previous studies have demonstrated that spermidine can modulate fear memories. Systemic, intrahippocampal and intra-amygdalar injections of spermidine improve the memory of inhibitory avoidance and fear conditioning tasks (Camera et al., 2007; Rubin et al., 2004; Rubin et al., 2000; Rubin et al., 2001). This effect on memory appears to depend 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, the effect of spermidine seems to involve the NMDAR, since administration of MK-801 or arcaine, both antagonists of the NMDAR, eliminate the facilitatory effect of spermidine on memory (Camera et al., 2007; Rubin et al., 2001). While it is well established that fear extinction depends on NMDAR activation (Myers & Davis, 2002), only recently has a role for NR2B subunit-containing NMDA receptors in fear extinction been proposed. For instance Sotres-Bayon and coworkers have shown

that both systemic and intra-amygdala injection of the NR2B antagonist ifenprodil, before extinction training, impairs the initial acquisition and subsequent retrieval of fear extinction. In addition, systemic or cortical administration of ifenprodil, immediately after extinction training disrupts extinction consolidation (Sotres-Bayon, Diaz-Mataix, Bush & LeDoux, 2009), suggesting that NR2B subunit-containing NMDA receptors are essential for both acquisition and consolidation of fear extinction. The currently described impairment of contextual fear extinction by the intrahippocampal injection of ifenprodil not only is in full agreement with the previous studies that have implicated the hippocampus (Corcoran & Maren, 2001; Corcoran & Quirk, 2007; Ji & Maren, 2007) and NR2B-containing NMDA receptors (Sotres-Bayon et al., 2007) in fear memory extinction, but also suggest a role for endogenous polyamines in fear extinction in the hippocampus. It is also remarkable that spermidine administration improved fear extinction, and that the administration of the three NR2B antagonists used in this study, at doses that had no effect on their own on memory, prevented the facilitatory effect of spermidine (Fig. 4A-C).

From a pharmacological perspective, it is particularly interesting that while the intrahippocampal injection of 0.2 nmol of traxoprodil impaired contextual fear extinction, the injection of 2 nmol of this compound, did not alter memory extinction. This biphasic effect of traxoprodil is similar to that previously described for arcaine in the amygdala (Rubin et al., 2004) and mirrors the dose-effect curve obtained for the intrahippocampal injection of spermidine, obtained in a previous study (Berlese et al., 2005). Therefore, it is reasonable that traxoprodil does not differ from other compounds that bind to and modulate NR2B-containing NMDAr, which also present inverted-U shaped dose-effect curves. It also does not mean that arcaine and ifenprodil behave differently from traxoprodil, since a biphasic effect for these compounds might have been found if more doses were tested, as has been shown previously (Rubin et al., 2004). Therefore, this interesting biphasic effect may be one of the reasons for the conflicting results of traxoprodil on memory, which includes lack of effect (Guscott, Clarke, Murray, Grimwood, Bristow & Hutson, 2003), impairment (Walker & Davis, 2008) and even improvement (Higgins, Ballard, Enderlin, Haman & Kemp, 2005). It is evident, however, that further studies are needed to further elucidate this paradox, particularly the traxoprodil-induced memory improvement.

In summary, the findings from the current study showed that while spermidine facilitated fear extinction, NMDAr antagonists disrupted this fear extinction and reversed the facilitatory effect of spermidine on fear extinction. Since extinction-based

exposure therapy is widely used as treatment for a number of anxiety-related disorders, including phobias and post-traumatic stress (Hellstrom & Ost, 1995; Powers, Smits & Telch, 2004) the current findings showing facilitation of extinction by polyaminergic agents suggest a possible role for these compounds as putative candidates for drug development. In addition, the development of modulators of the NMDAr, such as polyaminergic agents, that act on the memory of fear may be particularly interesting from a clinical perspective. More classic NMDAr blockers, such as MK-801 work via channel blockade (and demonstrates little receptor subtype specificity). The consequences of this are wide-ranging effects including neurotoxicity and abuse/psychomimetic potential (Grant, Knisely, Tabakoff, Barrett & Balster, 1991; Ikonomidou, Bosch, Miksa, Bittigau, Vockler, Dikranian, Tenkova, Stefovaska, Turski & Olney, 1999; Klein, Calderon & Hayes, 1999). In contrast, modulators of the NMDAr (such as drugs polyaminergic agents) could be effective without obstructing critical NMDAR functions, making these drugs also candidates for pharmacological interventions.

Acknowledgements:

This study was supported by CNPq (504363/2007-7, 301558/2007-8, 477836/2007-0, 563222/2008-5). G.M. Gomes, C.F. Mello, G. V. Bochi, J. Ferreira, M.M. Rosa and M.A. Rubin are recipients of CNPq fellowships. All the experiments comply with the current laws of Brazil.

References

- Berlese D. B., Sauzem P. D., Carati M. C., Guerra G. P., Stiegemeier J. A., Mello C. F. & Rubin M. A. (2005). Time-dependent modulation of inhibitory avoidance memory by spermidine in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 83, 48-53.
- Bevilaqua L. R., Bonini J. S., Rossato J. I., Izquierdo L. A., Cammarota M. & Izquierdo I. (2006). The entorhinal cortex plays a role in extinction. *Neurobiology of Learning and Memory*, 85, 192-7.
- Blanchard R. J. & Blanchard D. C. (1969). Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 68, 129-35.
- Burgos-Robles A., Vidal-Gonzalez I., Santini E. & Quirk G. J. (2007). Consolidation of fear extinction requires NMDA receptor-dependent bursting in the ventromedial prefrontal cortex. *Neuron*, 53, 871-80.
- Camera K., Mello C. F., Ceretta A. P. & Rubin M. A. (2007). Systemic administration of polyaminergic agents modulate fear conditioning in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 192, 457-64.
- Cammarota M., Bevilaqua L. R., Rossato J. I., Ramirez M., Medina J. H. & Izquierdo I. (2005). Relationship between short- and long-term memory and short- and long-term extinction. *Neurobiology of Learning and Memory*, 84, 25-32.
- Ceretta A. P., Camera K., Mello C. F. & Rubin M. A. (2008). Arcaine and MK-801 make recall state-dependent in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 201, 405-11.
- Corcoran K. A., Desmond T. J., Frey K. A. & Maren S. (2005). Hippocampal inactivation disrupts the acquisition and contextual encoding of fear extinction. *Journal of Neuroscience*, 25, 8978-87.
- Corcoran K. A. & Maren S. (2001). Hippocampal inactivation disrupts contextual retrieval of fear memory after extinction. *Journal of Neuroscience*, 21, 1720-6.
- Corcoran K. A. & Quirk G. J. (2007). Recalling safety: cooperative functions of the ventromedial prefrontal cortex and the hippocampus in extinction. *CNS Spectrums*, 12, 200-6.
- Frohardt R. J., Guarraci F. A. & Bouton M. E. (2000). The effects of neurotoxic hippocampal lesions on two effects of context after fear extinction. *Behavioral Neuroscience*, 114, 227-40.
- Gabriele A. & Packard M. G. (2007). D-Cycloserine enhances memory consolidation of hippocampus-dependent latent extinction. *Learning & Memory*, 14, 468-71.
- Grant K. A., Knisely J. S., Tabakoff B., Barrett J. E. & Balster R. L. (1991). Ethanol-like discriminative stimulus effects of non-competitive n-methyl-d-aspartate antagonists. *Behav Pharmacol*, 2, 87-95.
- Guerra G. P., Mello C. F., Sauzem P. D., Berlese D. B., Furian A. F., Tabarelli Z. & Rubin M. A. (2006). Nitric oxide is involved in the memory facilitation induced by spermidine in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 186, 150-8.
- Guscott M. R., Clarke H. F., Murray F., Grimwood S., Bristow L. J. & Hutson P. H. (2003). The effect of (+/-)-CP-101,606, an NMDA receptor NR2B subunit selective antagonist, in the Morris watermaze. *European Journal of Pharmacology*, 476, 193-9.
- Hellstrom K. & Ost L. G. (1995). One-session therapist directed exposure vs two forms of manual directed self-exposure in the treatment of spider phobia. *Behaviour Research and Therapy*, 33, 959-65.

- Higgins G. A., Ballard T. M., Enderlin M., Haman M. & Kemp J. A. (2005). Evidence for improved performance in cognitive tasks following selective NR2B NMDA receptor antagonist pre-treatment in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*, 179, 85-98.
- Ikonomidou C., Bosch F., Miksa M., Bittigau P., Vockler J., Dikranian K., Tenkova T. I., Stefovskaja V., Turski L. & Olney J. W. (1999). Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science*, 283, 70-4.
- Ji J. & Maren S. (2007). Hippocampal involvement in contextual modulation of fear extinction. *Hippocampus*, 17, 749-58.
- Johnson T. D. (1996). Modulation of channel function by polyamines. *Trends in Pharmacological Science*, 17, 22-7.
- Kim J. J. & Jung M. W. (2006). Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: a critical review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 30, 188-202.
- Klein M., Calderon S. & Hayes B. (1999). Abuse liability assessment of neuroprotectants. *Ann N Y Acad Sci*, 890, 515-25.
- Langton J. M. & Richardson R. (2008). D-Cycloserine Facilitates Extinction the First Time but not the Second Time: An Examination of the Role of NMDA Across the Course of Repeated Extinction Sessions. *Neuropsychopharmacology*,
- Laurent V., Marchand A. R. & Westbrook R. F. (2008). The basolateral amygdala is necessary for learning but not relearning extinction of context conditioned fear. *Learning & Memory*, 15, 304-14.
- Lebron K., Milad M. R. & Quirk G. J. (2004). Delayed recall of fear extinction in rats with lesions of ventral medial prefrontal cortex. *Learning & Memory*, 11, 544-8.
- Lin C. H., Yeh S. H., Lu H. Y. & Gean P. W. (2003). The similarities and diversities of signal pathways leading to consolidation of conditioning and consolidation of extinction of fear memory. *Journal of Neuroscience*, 23, 8310-7.
- Maren S. & Hobin J. A. (2007). Hippocampal regulation of context-dependent neuronal activity in the lateral amygdala. *Learning & Memory*, 14, 318-24.
- Myers K. M. & Davis M. (2002). Behavioral and neural analysis of extinction. *Neuron*, 36, 567-84.
- Pavlov I. P. (1927). *Conditioned Reflexes*. Oxford UP: London
- Paxinos G. & Watson C. (1986). *The Rat Brain in stereotaxic coordinates*. Academic: San Diego
- Powers M. B., Smits J. A. & Telch M. J. (2004). Disentangling the effects of safety-behavior utilization and safety-behavior availability during exposure-based treatment: a placebo-controlled trial. *Journal of Consulting and Clinical Psychology*, 72, 448-54.
- Ransom R. W. & Stec N. L. (1988). Cooperative modulation of [3H]MK-801 binding to the N-methyl-D-aspartate receptor-ion channel complex by L-glutamate, glycine, and polyamines. *Journal of Neurochemistry*, 51, 830-6.
- Reynolds I. J. & Miller R. J. (1990). Allosteric modulation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Advances in Pharmacology*, 21, 101-26.
- Rock D. M. & Macdonald R. L. (1995). Polyamine regulation of N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 35, 463-82.
- Rubin M. A., Berlese D. B., Stiegemeier J. A., Volkweis M. A., Oliveira D. M., dos Santos T. L., Fenili A. C. & Mello C. F. (2004). Intra-amygdala administration of polyamines modulates fear conditioning in rats. *Journal of Neuroscience*, 24, 2328-34.
- Rubin M. A., Boemo R. L., Jurach A., Rojas D. B., Zanolla G. R., Obregon A. D., Souza D. O. & Mello C. F. (2000). Intrahippocampal spermidine administration

- improves inhibitory avoidance performance in rats. *Behavioral Pharmacology*, 11, 57-61.
- Rubin M. A., Stiegemeier J. A., Volkweis M. A., Oliveira D. M., Fenili A. C., Boemo R. L., Jurach A. & Mello C. F. (2001). Intra-amygdala spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. *European Journal of Pharmacology*, 423, 35-9.
- Shimada A., Spangler E. L., London E. D. & Ingram D. K. (1994). Spermidine potentiates dizocilpine-induced impairment of learning performance by rats in a 14-unit T-maze. *European Journal of Pharmacology*, 263, 293-300.
- Sotres-Bayon F., Bush D. E. & LeDoux J. E. (2007). Acquisition of fear extinction requires activation of NR2B-containing NMDA receptors in the lateral amygdala. *Neuropsychopharmacology*, 32, 1929-40.
- Sotres-Bayon F., Diaz-Mataix L., Bush D. E. & LeDoux J. E. (2009). Dissociable roles for the ventromedial prefrontal cortex and amygdala in fear extinction: NR2B contribution. *Cerebral Cortex*, 19, 474-82.
- Szapiro G., Vianna M. R., McGaugh J. L., Medina J. H. & Izquierdo I. (2003). The role of NMDA glutamate receptors, PKA, MAPK, and CAMKII in the hippocampus in extinction of conditioned fear. *Hippocampus*, 13, 53-8.
- Velloso N. A., Dalmolin G. D., Gomes G. M., Rubin M. A., Canas P. M., Cunha R. A. & Mello C. F. (2009). Spermine improves recognition memory deficit in a rodent model of Huntington's disease. *Neurobiology of Learning and Memory*,
- Vianna M. R., Igaz L. M., Coitinho A. S., Medina J. H. & Izquierdo I. (2003). Memory extinction requires gene expression in rat hippocampus. *Neurobiology of Learning and Memory*, 79, 199-203.
- Walker D. L. & Davis M. (2008). Amygdala infusions of an NR2B-selective or an NR2A-preferring NMDA receptor antagonist differentially influence fear conditioning and expression in the fear-potentiated startle test. *Learning & Memory*, 15, 67-74.
- Williams K. (1997). Interactions of polyamines with ion channels. *Biochemical Journal*, 325 (Pt 2), 289-97.
- Williams K., Romano C., Dichter M. A. & Molinoff P. B. (1991). Modulation of the NMDA receptor by polyamines. *Life Science*, 48, 469-98.
- Yamamoto S., Morinobu S., Fuchikami M., Kurata A., Kozuru T. & Yamawaki S. (2008). Effects of single prolonged stress and D-cycloserine on contextual fear extinction and hippocampal NMDA receptor expression in a rat model of PTSD. *Neuropsychopharmacology*, 33, 2108-16.

Figures

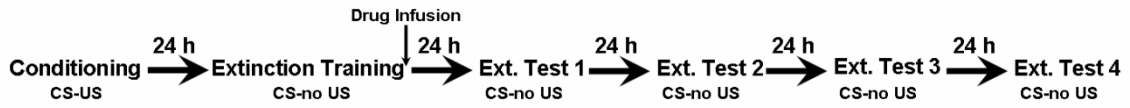


Fig. 1. Schematic representation of the behavioral procedure.

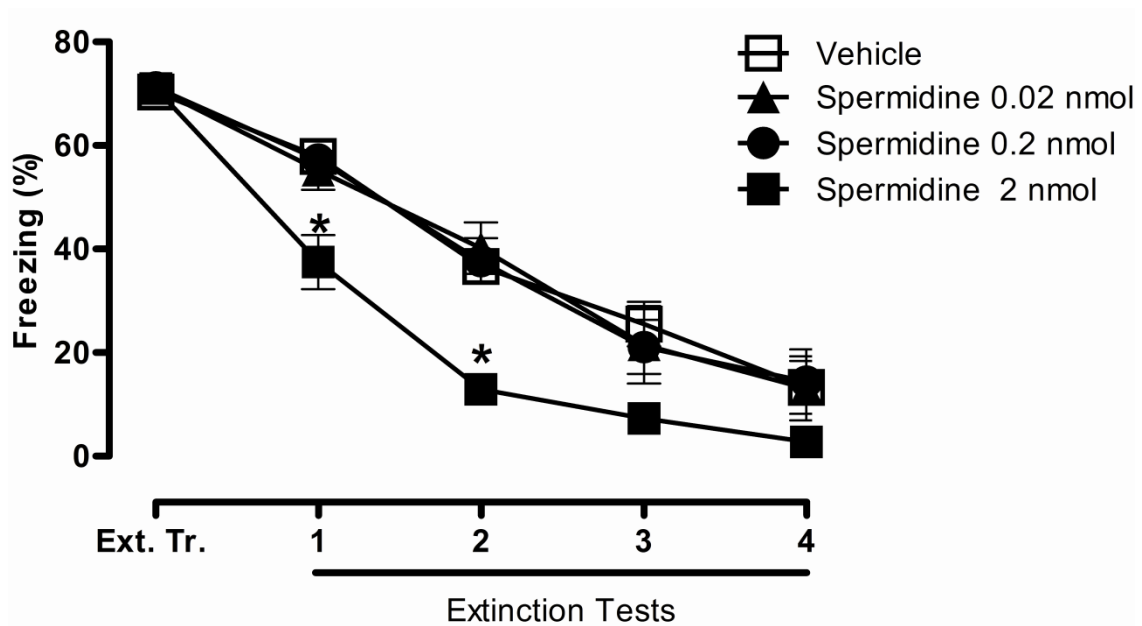


Fig. 2. Effect of intrahippocampal spermidine administration on extinction of conditioned fear. Each group received bilateral 0.5 μ l infusions of either vehicle (PBS) or spermidine (0.2 - 2 nmol) immediately after extinction training (Ext. Tr.). * $p < 0.05$ compared with the vehicle by Student-Newman-Keuls test. Data are the means + SEM percentage of freezing across all extinction training and test sessions ($n = 5-6$ animals in each group).

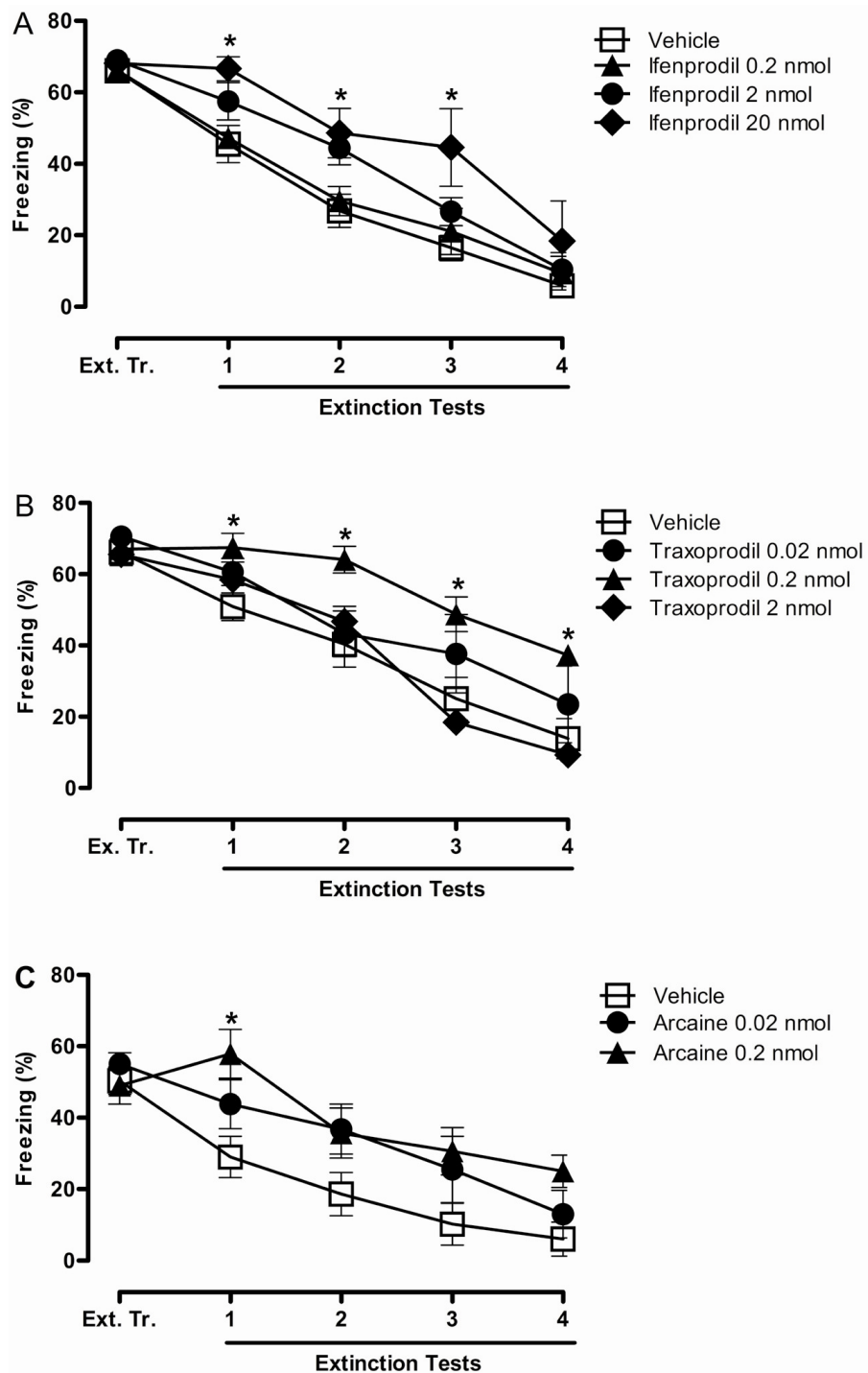


Fig. 3. Effect of intrahippocampal administration of different antagonists of the NMDAR on extinction of conditioned fear. Each group received bilateral 0.5 μ l infusions of either (A) vehicle (saline) or ifenprodil (0.2 – 20 nmol), (B) vehicle (saline) or traxoprodil (0.02 – 2 nmol), (C) vehicle (PBS) or arcaine (0.02 – 0.2 nmol) immediately after extinction training (Ext. Tr.). * $p < 0.05$ compared with the vehicle by Student-Newman-Keuls test. Data are the means + SEM percentage of freezing across all extinction training and test sessions ($n = 5-6$ animals in each group).

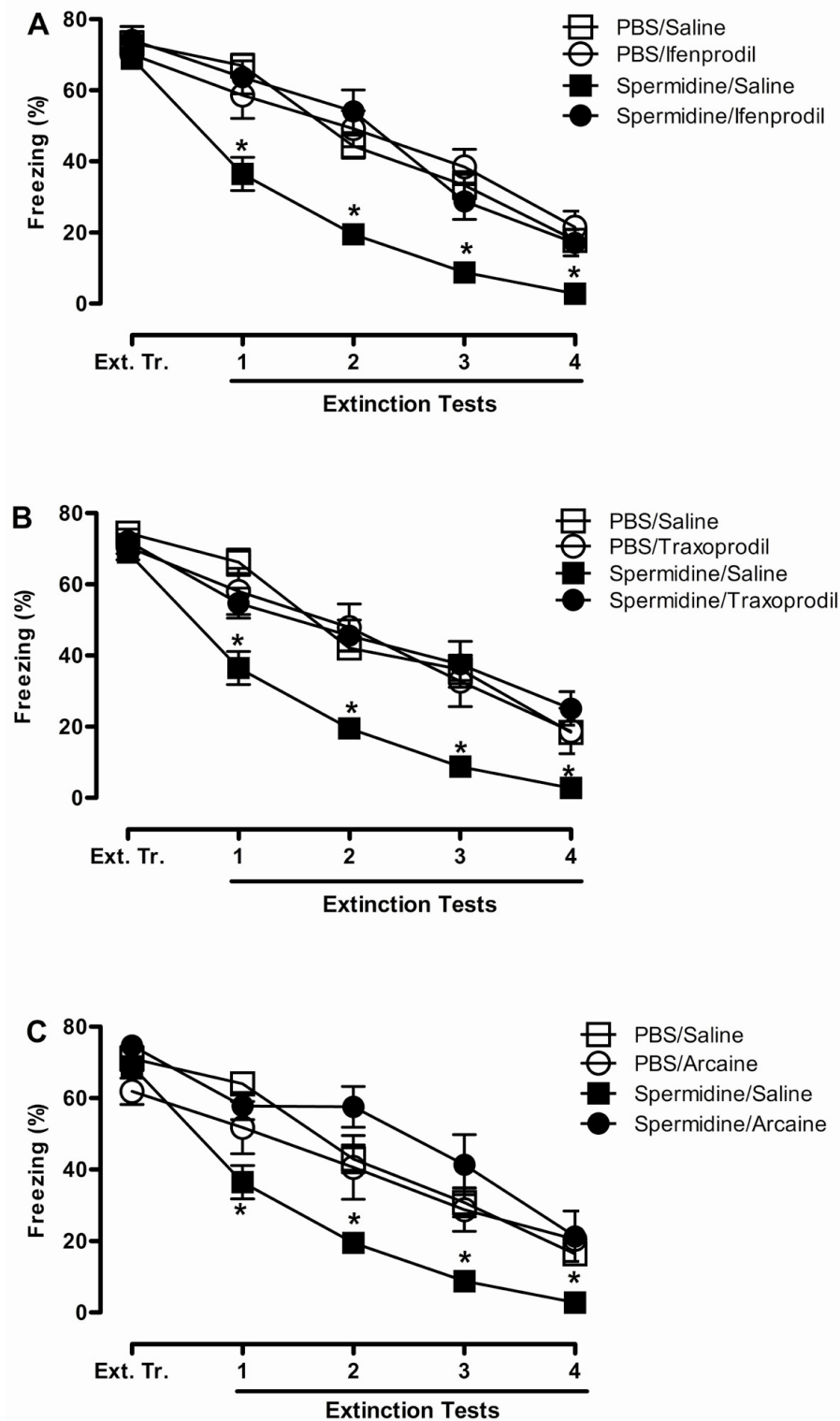


Fig. 4. Effect of the intrahippocampal coadministration of spermidine (2 nmol) and (A) ifenprodil (2 nmol), (B) traxoprodil (0.02 nmol) or (C) arcaine (0.02 nmol) on the extinction of conditioned fear. Infusions were performed immediately after extinction training (Ext. Tr.). * $p < 0.05$ compared with vehicle by the Student-Newman-Keuls test. Data are the means + SEM percentage of freezing across all extinction training and test sessions ($n = 9-12$ animals in each group).

4. DISCUSSÃO

4. Discussão

O presente estudo teve como propósito pesquisar o efeito de agentes poliaminérgicos sobre a extinção do medo condicionado contextual em ratos Wistar machos.

Os resultados encontrados demonstraram que a administração intrahipocampal de espermidina, imediatamente após o treino da extinção, facilitou a extinção do medo condicionado contextual em ratos. Ainda, demonstrou-se que a infusão dos antagonistas da subunidade NR2B do rNMDA arcaína, ifenprodil e traxprodil pioraram a extinção do medo condicionado contextual, quando injetados imediatamente após o treino da extinção. Sabendo que as poliaminas melhoram a memória em ratos, via ativação do rNMDA (Rubin et. al., 2000, Rubin et. al., 2001, Rubin et. al., 2004, Berlese et. al., 2005), foi verificado se o efeito da espermidina em facilitar a extinção do medo condicionado dependia da ativação do rNMDA. De fato, a coadministração de espermidina e de antagonistas da subunidade NR2B em doses sem efeito *per se*, reverteu à facilitação da extinção promovida pela espermidina. Estes resultados sugerem que agentes poliaminérgicos modulam a extinção do medo condicionado, quando injetados no hipocampo de ratos, e que este efeito é dependente da subunidade NR2B do rNMDA hipocampal.

Estudos prévios mostram que a espermidina possui grande potencial no que diz respeito à melhora do desempenho cognitivo. Visto que sua administração sistêmica, intrahipocampal ou intraamígdala melhora o desempenho de ratos em tarefas de memória como medo condicionado e esQUIVA INIBITÓRIA (Rubin et. al., 2000, Rubin et. al., 2001, Berlese et. al., 2005). Este efeito da espermidina sobre a memória parece depender basicamente de dois mecanismos: atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS) e ativação do rNMDA. Estudo realizado por Guerra e colaboradores mostrou que a administração de N(G)-nitro L-arginina metil Ester (L-NAME), um inibidor inespecífico da enzima NOS, previne a melhora de memória induzida pela espermidina na tarefa de esQUIVA INIBITÓRIA. No que se refere ao rNMDA, foi demonstrado que a administração de MK-801 ou arcaína, ambos antagonistas do rNMDA, suprimem o efeito da espermidina sobre a memória (Rubin et. al., 2001, Camera et. al., 2007).

A extinção do medo é um processo ativo, que depende do rNMDA (Myers and Davis, 2002). Recentemente demonstrou-se o papel da subunidade NR2B no processo de extinção. Sotres-Bayon e colaboradores demonstraram que a administração tanto sistêmica como intraamigdala de ifenprodil, antes do treino da extinção, bloqueia a aquisição e evocação da extinção do medo. Ainda, ifenprodil quando administrado imediatamente após treino da extinção, impede que ocorra consolidação da mesma (Sotres-Bayon et. al., 2009). Estes resultados sugerem que o rNMDA contendo a subunidade NR2B são cruciais para o processamento da extinção do medo. Ainda, resultados apresentados neste trabalho corroboram com estudos prévios que mostram a importância do hipocampo e da subunidade NR2B do rNMDA na extinção do medo (Corcoran and Maren, 2001, Corcoran and Quirk, 2007, Ji and Maren, 2007, Sotres-Bayon et. al., 2007).

O papel do hipocampo na modulação contextual da extinção pode ser avaliado através de abordagens cirúrgicas e farmacológicas (para revisão ver Ji & Maren, 2007). Lesões excitotóxicas realizadas na região CA1 do hipocampo impedem a aquisição da extinção, enquanto que a administração intrahipocampal de muscimol bloqueia a expressão da extinção (Corcoran and Maren, 2001, Dillon et. al., 2008). Nossos resultados sugerem um papel para poliaminas hipocampais sobre a extinção do medo condicionado. É importante notar que a administração intrahipocampal de espermidina facilitou a extinção, e que a administração dos três antagonistas da subunidade NR2B, em doses sem efeito sobre a memória, preveniu o efeito facilitatório da espermidina.

No presente trabalho, traxoprodil na dose de 0,2 nmol/sítio bloqueou a extinção do medo condicionado, mas a maior dose testada, 2 nmol/sítio, não apresentou efeito sobre a memória. Este efeito bifásico é semelhante ao relatado com arcaína, quando administrada intraamigdala (Rubin 2004) e também é semelhante com a curva dose-resposta apresentada pela espermidina em trabalhos anteriores (Berlese et. al., 2005). Portanto, é plausível que a maneira que o traxoprodil interage com o rNMDA seja semelhante a de outros compostos que ligam-se na subunidade NR2B do rNMDA, os quais apresentam curvas dose-resposta em U-invertido. O mesmo padrão de resposta não foi encontrado com arcaína ou ifenprodil, mas isso não significa que estes compostos interajam com o receptor de maneira diferente, já que um efeito bifásico poderia ter sido encontrado se mais doses destes compostos tivessem sido testadas. O efeito do traxoprodil sobre a memória parece conflitante, e trabalhos já relataram que este composto não possui efeito (Guscott et. al., 2003), piora (Myers and Davis, 2002),

ou até melhora a memória (Higgins et. al., 2005), sendo o efeito bifásico deste composto um dos possíveis motivos para seus diferentes efeitos sobre a memória.

A facilitação da extinção do pode ser obtida através da manipulação de distintos sistemas, como o colinérgico, canabinóide, GABAérgico e glutamatérgico. A infusão intraamigdala do agonista muscarínico oxotremorina facilita a extinção do medo condicionado contextual (Boccia et. al., 2009). Adicionalmente, a administração intraperitoneal de WIN 55,212-2, um agonista canabinóide, facilita a extinção do medo condicionado contextual (Pamplona et. al., 2006). Ainda, a administração de muscimol, um agonista GABA_A, antes do treino da extinção, facilita a extinção (Akirav et. al., 2006). Além disso, o sistema glutamatérgico parece desempenhar um importante papel na modulação da extinção. D-cicloserina, um agonista parcial do rNMDA, facilita a extinção do medo condicionado quando injetado tanto sistemicamente quanto intraamigdala imediatamente após o treino da extinção (Ledgerwood et. al., 2003). Resultados apresentados neste trabalho corroboram com o trabalhos prévios (Ledgerwood et. al., 2003, Ledgerwood et. al., 2004, Richardson et. al., 2004, Yamamoto et. al., 2008), demonstrando que a ativação do rNMDA resulta em melhora da retenção da extinção.

Resumidamente, os resultados apresentados no presente trabalho demonstram que, enquanto a espermidina facilitou a extinção do medo condicionado, antagonistas da subunidade NR2B do rNMDA arcaína, ifenprodil e traxoprodil, bloquearam e reverteram o efeito da espermidina sobre a extinção. Sabendo que a terapia de exposição é um método amplamente utilizado no tratamento de distúrbios de ansiedade, como fobias e estresse pós-traumático (Hellstrom and Ost, 1995, Powers et. al., 2004), os resultados deste trabalho mostrando uma facilitação da extinção pela espermidina, colocam os compostos poliaminérgicos como possíveis protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento destes distúrbios. Ainda, de um ponto de vista clínico, mostra-se interessante o desenvolvimento de moduladores do rNMDA que atuam sobre memórias de medo. Bloqueadores clássicos do rNMDA, como MK-801, atuam bloqueando o poro do receptor, assim apresentando pouca ou nenhuma especificidade por subtipos de receptores. A consequência disso é uma ampla gama de efeitos adversos, como neurotoxicidade e potencial abusivo (Grant et. al., 1991, Ikonomidou et. al., 1999, Klein et. al., 1999). Em contraste, moduladores do rNMDA (como os agentes poliaminérgicos), poderiam ser efetivos sem afetar funções vitais do rNMDA, dando a essas drogas possível uso em intervenções farmacológicas.

5. CONCLUSÃO

5. Conclusão

Através da análise dos resultados obtidos no presente trabalho, podemos concluir que:

- A administração intrahipocampal de espermidina na dose de 2 nmol/sítio, imediatamente após o treino da extinção, facilitou a extinção do medo condicionado contextual em ratos, sugerindo que o rNMDA está envolvido na extinção do medo condicionado;
- A administração intrahipocampal dos diferentes antagonistas da subunidade NR2B do rNMDA, arcaína (0,2 nmol/sítio), traxoprodil (0,2 nmol/sítio) e ifenprodil (20 nmol/sítio), imediatamente após o treino da extinção, bloqueou a extinção do medo condicionado contextual em ratos. Isto sugere que a subunidade NR2B do rNMDA está envolvida na extinção do medo condicionado;
- A coadministração dos antagonistas da subunidade NR2B do rNMDA, em doses sem efeito *per se*, reverteram a facilitação da extinção do medo condicionado provocada pela espermidina. Isto sugere o envolvimento da subunidade NR2B do rNMDA no efeito da espermidina.

6. Referências Bibliográficas

- Abel, T. and Lattal, K. M., 2001. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Curr Opin Neurobiol.* 11, 180-187.
- Akirav, I., Raizel, H. and Maroun, M., 2006. Enhancement of conditioned fear extinction by infusion of the GABA(A) agonist muscimol into the rat prefrontal cortex and amygdala. *European Journal of Neuroscience.* 23, 758-764.
- Artiges, E., Salame, P., Recasens, C., Poline, J. B., Attar-Levy, D., De La Raillere, A., Paillere-Martinot, M. L., Danion, J. M. and Martinot, J. L., 2000. Working memory control in patients with schizophrenia: a PET study during a random number generation task. *Am J Psychiatry.* 157, 1517-1519.
- Ashby, F. G. and O'Brien, J. B., 2005. Category learning and multiple memory systems. *Trends Cogn Sci.* 9, 83-89.
- Bekinschtein, P., Cammarota, M., Izquierdo, I. and Medina, J. H., 2008. BDNF and memory formation and storage. *Neuroscientist.* 14, 147-156.
- Berlese, D. B., Sauzem, P. D., Carati, M. C., Guerra, G. P., Stiegemeier, J. A., Mello, C. F. and Rubin, M. A., 2005. Time-dependent modulation of inhibitory avoidance memory by spermidine in rats. *Neurobiology of Learning and Memory.* 83, 48-53.
- Berman, D. E. and Dudai, Y., 2001. Memory extinction, learning anew, and learning the new: dissociations in the molecular machinery of learning in cortex. *Science.* 291, 2417-2419.
- Bevilaqua, L. R., Bonini, J. S., Rossato, J. I., Izquierdo, L. A., Cammarota, M. and Izquierdo, I., 2006. The entorhinal cortex plays a role in extinction. *Neurobiology of Learning and Memory.* 85, 192-197.
- Bliss, T. V. and Collingridge, G. L., 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature.* 361, 31-39.
- Boccia, M. M., Blake, M. G., Baratti, C. M. and McGaugh, J. L., 2009. Involvement of the basolateral amygdala in muscarinic cholinergic modulation of extinction memory consolidation. *Neurobiology of Learning and Memory.* 91, 93-97.
- Bouton, M. E., 2002. Context, ambiguity, and unlearning: sources of relapse after behavioral extinction. *Biol Psychiatry.* 52, 976-986.
- Bouton, M. E., 2004. Context and behavioral processes in extinction. *Learn Mem.* 11, 485-494.
- Bouton, M. E. and King, D. A., 1983. Contextual control of the extinction of conditioned fear: tests for the associative value of the context. *J Exp Psychol Anim Behav Process.* 9, 248-265.
- Bruchey, A. K., Shumake, J. and Gonzalez-Lima, F., 2007. Network model of fear extinction and renewal functional pathways. *Neuroscience.* 145, 423-437.
- Camera, K., Mello, C. F., Ceretta, A. P. and Rubin, M. A., 2007. Systemic administration of polyaminergic agents modulate fear conditioning in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 192, 457-464.

- Cammarota, M., Barros, D. M., Vianna, M. R., Bevilaqua, L. R., Coitinho, A., Szapiro, G., Izquierdo, L. A., Medina, J. H. and Izquierdo, I., 2004. The transition from memory retrieval to extinction. *An Acad Bras Cienc.* 76, 573-582.
- Cammarota, M., Bevilaqua, L. R., Barros, D. M., Vianna, M. R., Izquierdo, L. A., Medina, J. H. and Izquierdo, I., 2005. Retrieval and the extinction of memory. *Cell Mol Neurobiol.* 25, 465-474.
- Carter, C., 1994. *The neuropharmacology of polyamines*, London.
- Coffino, P., 2001. Regulation of cellular polyamines by antizyme. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2, 188-194.
- Conway, E. L., 1998. Brain lesions and delayed water maze learning deficits after intracerebroventricular spermine. *Brain Res.* 800, 10-20.
- Corcoran, K. A., Desmond, T. J., Frey, K. A. and Maren, S., 2005. Hippocampal inactivation disrupts the acquisition and contextual encoding of fear extinction. *Journal of Neuroscience.* 25, 8978-8987.
- Corcoran, K. A. and Maren, S., 2001. Hippocampal inactivation disrupts contextual retrieval of fear memory after extinction. *Journal of Neuroscience.* 21, 1720-1726.
- Corcoran, K. A. and Quirk, G. J., 2007. Recalling safety: cooperative functions of the ventromedial prefrontal cortex and the hippocampus in extinction. *CNS Spectrums.* 12, 200-206.
- de Fockert, J. W., 2005. Keeping priorities: the role of working memory and selective attention in cognitive aging. *Sci Aging Knowledge Environ.* 2005, pe34.
- de Oliveira Alvares, L., Pasqualini Genro, B., Diehl, F., Molina, V. A. and Quillfeldt, J. A., 2008. Opposite action of hippocampal CB1 receptors in memory reconsolidation and extinction. *Neuroscience.* 154, 1648-1655.
- Debiec, J., LeDoux, J. E. and Nader, K., 2002. Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. *Neuron.* 36, 527-538.
- Dillon, G. M., Qu, X., Marcus, J. N. and Dodart, J. C., 2008. Excitotoxic lesions restricted to the dorsal CA1 field of the hippocampus impair spatial memory and extinction learning in C57BL/6 mice. *Neurobiology of Learning and Memory.* 90, 426-433.
- Eichenbaum, H., 2001. The hippocampus and declarative memory: cognitive mechanisms and neural codes. *Behav Brain Res.* 127, 199-207.
- Falls, W. A., Miserendino, M. J. and Davis, M., 1992. Extinction of fear-potentiated startle: blockade by infusion of an NMDA antagonist into the amygdala. *J Neurosci.* 12, 854-863.
- Gabriele, A. and Packard, M. G., 2007. D-Cycloserine enhances memory consolidation of hippocampus-dependent latent extinction. *Learning & Memory.* 14, 468-471.
- Grant, K. A., Knisely, J. S., Tabakoff, B., Barrett, J. E. and Balster, R. L., 1991. Ethanol-like discriminative stimulus effects of non-competitive n-methyl-D-aspartate antagonists. *Behav Pharmacol.* 2, 87-95.
- Guerra, G. P., Mello, C. F., Sauzem, P. D., Berlese, D. B., Furian, A. F., Tabarelli, Z. and Rubin, M. A., 2006. Nitric oxide is involved in the memory facilitation induced by spermidine in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 186, 150-158.
- Gugliucci, A., 2004. Polyamines as clinical laboratory tools. *Clin Chim Acta.* 344, 23-35.
- Guscott, M. R., Clarke, H. F., Murray, F., Grimwood, S., Bristow, L. J. and Hutson, P. H., 2003. The effect of (+/-)-CP-101,606, an NMDA receptor NR2B subunit selective antagonist, in the Morris watermaze. *European Journal of Pharmacology.* 476, 193-199.

- Halonen, T., Sivenius, J., Miettinen, R., Halmekyto, M., Kauppinen, R., Sinervirta, R., Alakuijala, L., Alhonen, L., MacDonald, E., Janne, J. and et al., 1993. Elevated seizure threshold and impaired spatial learning in transgenic mice with putrescine overproduction in the brain. *Eur J Neurosci.* 5, 1233-1239.
- Hellstrom, K. and Ost, L. G., 1995. One-session therapist directed exposure vs two forms of manual directed self-exposure in the treatment of spider phobia. *Behaviour Research and Therapy.* 33, 959-965.
- Higgins, G. A., Ballard, T. M., Enderlin, M., Haman, M. and Kemp, J. A., 2005. Evidence for improved performance in cognitive tasks following selective NR2B NMDA receptor antagonist pre-treatment in the rat. *Psychopharmacology (Berl).* 179, 85-98.
- Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vockler, J., Dikranian, K., Tenkova, T. I., Stefovskaja, V., Turski, L. and Olney, J. W., 1999. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science.* 283, 70-74.
- Izquierdo, I., 2002. *Memória*, Porto Alegre.
- Izquierdo, I., Bevilaqua, L. R., Rossato, J. I., Bonini, J. S., Medina, J. H. and Cammarota, M., 2006. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends Neurosci.* 29, 496-505.
- Izquierdo, I. and Cammarota, M., 2004. Neuroscience. Zif and the survival of memory. *Science.* 304, 829-830.
- Izquierdo, I., Izquierdo, L. A., Barros, D. M., Mello e Souza, T., de Souza, M. M., Quevedo, J., Rodrigues, C., Sant'Anna, M. K., Madruga, M. and Medina, J. H., 1998. Differential involvement of cortical receptor mechanisms in working, short-term and long-term memory. *Behav Pharmacol.* 9, 421-427.
- Izquierdo, I. and McGaugh, J. L., 2000. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. *Behav Pharmacol.* 11, 517-534.
- Izquierdo, I. and Medina, J. H., 1995. Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. *Neurobiol Learn Mem.* 63, 19-32.
- Izquierdo, I. and Medina, J. H., 1997. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem.* 68, 285-316.
- Ji, J. and Maren, S., 2007. Hippocampal involvement in contextual modulation of fear extinction. *Hippocampus.* 17, 749-758.
- Johnson, T. D., 1996. Modulation of channel function by polyamines. *Trends in Pharmacological Science.* 17, 22-27.
- Kalisch, R., Holt, B., Petrovic, P., De Martino, B., Kloppel, S., Buchel, C. and Dolan, R. J., 2009. The NMDA agonist D-cycloserine facilitates fear memory consolidation in humans. *Cereb Cortex.* 19, 187-196.
- Kandel, E. R., 1997. Genes, synapses, and long-term memory. *J Cell Physiol.* 173, 124-125.
- Kishi, A., Ohno, M. and Watanabe, S., 1998. Spermidine, a polyamine site agonist, attenuates working memory deficits caused by blockade of hippocampal muscarinic receptors and mGluRs in rats. *Brain Res.* 793, 311-314.
- Klein, M., Calderon, S. and Hayes, B., 1999. Abuse liability assessment of neuroprotectants. *Ann N Y Acad Sci.* 890, 515-525.
- Langton, J. M. and Richardson, R., 2008. D-cycloserine facilitates extinction the first time but not the second time: an examination of the role of NMDA across the

- course of repeated extinction sessions. *Neuropsychopharmacology*. 33, 3096-3102.
- Lebron, K., Milad, M. R. and Quirk, G. J., 2004. Delayed recall of fear extinction in rats with lesions of ventral medial prefrontal cortex. *Learning & Memory*. 11, 544-548.
- Ledgerwood, L., Richardson, R. and Cranney, J., 2003. Effects of D-cycloserine on extinction of conditioned freezing. *Behavioral Neuroscience*. 117, 341-349.
- Ledgerwood, L., Richardson, R. and Cranney, J., 2004. D-cycloserine and the facilitation of extinction of conditioned fear: consequences for reinstatement. *Behav Neurosci*. 118, 505-513.
- Lee, Y. S. and Silva, A. J., 2009. The molecular and cellular biology of enhanced cognition. *Nat Rev Neurosci*. 10, 126-140.
- Lin, C. H., Yeh, S. H., Lu, H. Y. and Gean, P. W., 2003. The similarities and diversities of signal pathways leading to consolidation of conditioning and consolidation of extinction of fear memory. *Journal of Neuroscience*. 23, 8310-8317.
- Lovibond, P. F., 2004. Cognitive processes in extinction. *Learning & Memory*. 11, 495-500.
- Marton, L. J. and Pegg, A. E., 1995. Polyamines as targets for therapeutic intervention. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 35, 55-91.
- Meyer, R. C., Knox, J., Purwin, D. A., Spangler, E. L. and Ingram, D. K., 1998. Combined stimulation of the glycine and polyamine sites of the NMDA receptor attenuates NMDA blockade-induced learning deficits of rats in a 14-unit T-maze. *Psychopharmacology (Berl)*. 135, 290-295.
- Mikolajczak, P., Okulicz-Kozaryn, I., Kaminska, E., Niedopad, L., Polanska, A. and Gebka, J., 2002. Effects of acamprosate and some polyamine site ligands of NMDA receptor on short-term memory in rats. *Eur J Pharmacol*. 444, 83-96.
- Moinard, C., Cynober, L. and de Bandt, J. P., 2005. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clin Nutr*. 24, 184-197.
- Morgan, D. M., 1999. Polyamines. An overview. *Mol Biotechnol*. 11, 229-250.
- Myers, K. M. and Davis, M., 2002. Behavioral and neural analysis of extinction. *Neuron*. 36, 567-584.
- Nader, K., Schafe, G. E. and Le Doux, J. E., 2000. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*. 406, 722-726.
- Pamplona, F. A., Prediger, R. D., Pandolfo, P. and Takahashi, R. N., 2006. The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 facilitates the extinction of contextual fear memory and spatial memory in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 188, 641-649.
- Pedreira, M. E. and Maldonado, H., 2003. Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. *Neuron*. 38, 863-869.
- Pegg, A. E. and McCann, P. P., 1982. Polyamine metabolism and function. *Am J Physiol*. 243, C212-221.
- Power, A. E., Berlau, D. J., McGaugh, J. L. and Steward, O., 2006. Anisomycin infused into the hippocampus fails to block "reconsolidation" but impairs extinction: the role of re-exposure duration. *Learn Mem*. 13, 27-34.
- Powers, M. B., Smits, J. A. and Telch, M. J., 2004. Disentangling the effects of safety-behavior utilization and safety-behavior availability during exposure-based treatment: a placebo-controlled trial. *Journal of Consulting and Clinical Psychology*. 72, 448-454.

- Quirk, G. J. and Mueller, D., 2008. Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology*. 33, 56-72.
- Ransom, R. W. and Stec, N. L., 1988. Cooperative modulation of [3H]MK-801 binding to the N-methyl-D-aspartate receptor-ion channel complex by L-glutamate, glycine, and polyamines. *Journal of Neurochemistry*. 51, 830-836.
- Richardson, R., Ledgerwood, L. and Cranney, J., 2004. Facilitation of fear extinction by D-cycloserine: theoretical and clinical implications. *Learn Mem*. 11, 510-516.
- Robertson, E. M., Pascual-Leone, A. and Miall, R. C., 2004. Current concepts in procedural consolidation. *Nat Rev Neurosci*. 5, 576-582.
- Rock, D. M. and Macdonald, R. L., 1995. Polyamine regulation of N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 35, 463-482.
- Rubin, M. A., Berlese, D. B., Stiegemeier, J. A., Volkweis, M. A., Oliveira, D. M., dos Santos, T. L., Fenili, A. C. and Mello, C. F., 2004. Intra-amygdala administration of polyamines modulates fear conditioning in rats. *Journal of Neuroscience*. 24, 2328-2334.
- Rubin, M. A., Boemo, R. L., Jurach, A., Rojas, D. B., Zanolla, G. R., Obregon, A. D., Souza, D. O. and Mello, C. F., 2000. Intrahippocampal spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. *Behavioral Pharmacology*. 11, 57-61.
- Rubin, M. A., Stiegemeier, J. A., Volkweis, M. A., Oliveira, D. M., Fenili, A. C., Boemo, R. L., Jurach, A. and Mello, C. F., 2001. Intra-amygdala spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. *European Journal of Pharmacology*. 423, 35-39.
- Seiler, N., 2004. Catabolism of polyamines. *Amino Acids*. 26, 217-233.
- Shimada, A., Spangler, E. L., London, E. D. and Ingram, D. K., 1994. Spermidine potentiates dizocilpine-induced impairment of learning performance by rats in a 14-unit T-maze. *European Journal of Pharmacology*. 263, 293-300.
- Sotres-Bayon, F., Bush, D. E. and LeDoux, J. E., 2007. Acquisition of fear extinction requires activation of NR2B-containing NMDA receptors in the lateral amygdala. *Neuropsychopharmacology*. 32, 1929-1940.
- Sotres-Bayon, F., Diaz-Mataix, L., Bush, D. E. and LeDoux, J. E., 2009. Dissociable roles for the ventromedial prefrontal cortex and amygdala in fear extinction: NR2B contribution. *Cerebral Cortex*. 19, 474-482.
- Szapiro, G., Vianna, M. R., McGaugh, J. L., Medina, J. H. and Izquierdo, I., 2003. The role of NMDA glutamate receptors, PKA, MAPK, and CAMKII in the hippocampus in extinction of conditioned fear. *Hippocampus*. 13, 53-58.
- Tadano, T., Hozumi, S., Yamadera, F., Murata, A., Nijima, F., Tan-No, K., Nakagawasai, O. and Kisara, K., 2004. Effects of NMDA receptor-related agonists on learning and memory impairment in olfactory bulbectomized mice. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 26, 93-97.
- Teti, D., Visalli, M. and McNair, H., 2002. Analysis of polyamines as markers of (patho)physiological conditions. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 781, 107-149.
- Urdiales, J. L., Medina, M. A. and Sanchez-Jimenez, F., 2001. Polyamine metabolism revisited. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 13, 1015-1019.
- Vianna, M. R., Igaz, L. M., Coitinho, A. S., Medina, J. H. and Izquierdo, I., 2003. Memory extinction requires gene expression in rat hippocampus. *Neurobiology of Learning and Memory*. 79, 199-203.

- Wang, C., Delcros, J. G., Cannon, L., Konate, F., Carias, H., Biggerstaff, J., Gardner, R. A. and Phanstiel, I. V. O. t., 2003. Defining the molecular requirements for the selective delivery of polyamine conjugates into cells containing active polyamine transporters. *J Med Chem.* 46, 5129-5138.
- Williams, K., 1997a. Interactions of polyamines with ion channels. *Biochem J.* 325 (Pt 2), 289-297.
- Williams, K., 1997b. Modulation and block of ion channels: a new biology of polyamines. *Cell Signal.* 9, 1-13.
- Williams, K., Romano, C. and Molinoff, P. B., 1989. Effects of polyamines on the binding of [3H]MK-801 to the N-methyl-D-aspartate receptor: pharmacological evidence for the existence of a polyamine recognition site. *Mol Pharmacol.* 36, 575-581.
- Yamamoto, S., Morinobu, S., Fuchikami, M., Kurata, A., Kozuru, T. and Yamawaki, S., 2008. Effects of single prolonged stress and D-cycloserine on contextual fear extinction and hippocampal NMDA receptor expression in a rat model of PTSD. *Neuropsychopharmacology.* 33, 2108-2116.

7. Anexo

Em anexo carta de resposta dos revisores do periódico *Neurobiology of Learning and memory*, com parecer sobre manuscrito “Polyaminergic agents modulate contextual fear extinction in rats”:

Ms. No.: NLM-09-161

Title: Polyaminergic agents modulate contextual fear extinction in rats

Corresponding Author: Dr maribel Antonello rubin

Authors: Guilherme M Gomes, Msc; Carlos F Mello, PhD; Michelle M da Rosa, Undergraduating; Guilherme V Bochi, Undergraduating; Juliano Ferreira, PhD; Susan Barron, PhD;

Dear Dr rubin,

Thank you for submitting your manuscript to *Neurobiology of Learning and Memory*. Without significant modifications, this manuscript will not be acceptable for publication. We encourage you to consider these comments and make appropriate revision of your manuscript. Upon receipt, the manuscript will be re-reviewed promptly. The reviewers' comments are below. In particular, please note the request from both referees for "no-extinction, drug controls" to be included in the experimental design.

Please submit your revision online within 90 days by logging onto the Elsevier Editorial System for *Neurobiology of Learning and Memory*:

When submitting your revised paper, please include a separate document uploaded as "Response to Reviews" that carefully addresses the issues raised in the below comments, point by point. You should also include a suitable rebuttal to any specific request for change that has not been made.

To facilitate the electronic publication of your manuscript (should it be accepted), we request that your manuscript text, tables and figure legend be submitted in an editable format (Word, WordPerfect, or LaTeX only), and all figures uploaded individually as

TIF or EPS files.

Thank you, and we look forward to receiving your revised manuscript.

With kind regards,

Paul E. Gold, Editor

Wickliffe C. Abraham, Associate Editor

Eric Klann, Associate Editor

Neurobiology of Learning and Memory

Neurobiology of Learning and Memory, Editorial Office

Elsevier

Email: nlm@elsevier.com

Reviewers' comments:

Reviewer #1: The manuscript examines the effects of hippocampal infusions of polyaminergic agents on the extinction of context fear conditioning in rats. The procedures and results are straight forward. Rats are subjected to contextual fear conditioning on day 1. On day 2 rats receive extinction training which involves 6 min non-reinforced exposure to the context. Rats received hippocampal infusions immediately after this extinction training. The next 4 days were extinction test days and were identical to extinction training with the exception that rats received no infusions. The results showed that post-extinction training hippocampal infusions of spermidine apparently facilitated extinction whereas ifenprodil, taxoprodil, and arcaïne all impaired extinction. Interestingly, combined infusions of spermidine plus each of the antagonists blocked the facilitatory effects of spermidine and this was achieved at doses of the antagonists which themselves had no effect on extinction learning. The authors conclude that exogenous and endogenous polyamines facilitate fear extinction via actions at NR2B-subunit containing hippocampal NMDA receptors. The manuscript is generally well written (with the exceptions described below) and the pharmacology is sound. However, I am less enthusiastic than the authors regarding these results and their interpretation. I have the following major comments on the manuscript.

1. The key claim of the manuscript is that polyamines act at hippocampal NMDA receptors to modulate contextual fear extinction. This finding is potentially interesting but is also not secured by the data. In particular, there was no evidence presented that the effects of hippocampal infusions actually depended on prior extinction training. That is, the experiments could have benefited immensely from control groups which received conditioning, no initial extinction training but do receive infusion, then 4 days of test. This would show that the effects of infusions in these experiments depended upon extinction training. An equally important control would be to match the PBS/saline and drug groups on hippocampal infusions of the drug so that, for example, 6 hr after initial extinction training the groups received the opposite infusions. Both of these controls would strengthen considerably the claim that the hippocampal infusions were actually affecting extinction learning or memory. This is important because hippocampal manipulations can affect a variety of processes other than extinction such as locomotor activity, contextual configural/conjunctive processing etc and the effects of these infusions can be quite long-lived. Moreover, it is important because, in contrast to the author's assertion, the available evidence suggests that hippocampus is important for regulating where and when extinction learning is expressed but is not important for extinction learning per se. This is the key conclusion from the papers by Corcoran, Maren, and Bouton cited in the manuscript.

2. The manuscript could also be improved by addressing why the effects of a single infusion after extinction training were still observed across the four days of testing. Which specific process do the authors think could produce this long-term effect?

3. Related to this, I think the authors need a much stronger rationale in their introduction for why they studied hippocampal contributions to contextual fear extinction learning. After all, fear extinction can survive hippocampal lesions and inactivation (see the papers cited in the manuscript).

4. The neuroanatomical specificity of these manipulations is unclear. What happens when these substances are infused into the cortex dorsal to the hippocampus?

5. Finally, although Izquierdo and colleagues have made important contributions to

the neurobiology of learning and memory it would be appropriate to cite the primary empirical work of others in the introduction when discussing the neural substrates for extinction learning in the first paragraph of the introduction.

Other points

1. The procedure is simple and straightforward. I am not sure readers will require Figure 1 to understand it.
2. p. 5 "minute amounts" could be re-phrased.
3. p. 7, freezing is a fear-indicant behaviour not a "memory index"
4. More details on histology would be helpful, including some indication of where microinjection tips were actually located.

Reviewer #2: This paper reports that spermidine, which evidently binds to the NR2b subunit, can enhance contextual fear extinction when it is injected into the dorsal hippocampus. The claim that it acts on the NR2B subunit is based on the additional finding that several NR2B antagonist when co-administer with spermidine, prevent enhanced extinction when administered a doses that themselves have no effect on extinction.

Spermidine has previously been reported to have memory enhancing effects however, this might be the first reported that it enhances the retention of an fear extinction experience.

The paper itself was very well written. The only worthwhile comment I have is that there is no control in the first experiment that would determine that the effect of the drug depended on extinction training. It probably does but the authors have no drug only control.

The authors might want to replace their reference to Pavlov, 1927. The current placement might mislead one to infer that Pavlov studied conditioned fear.