

**ÓXIDO NÍTRICO MODULA A MELHORA DA  
MEMÓRIA INDUZIDA POR ESPERMIDINA EM  
RATOS**

---

**Gustavo Petri Guerra**



**UFSM**

**Dissertação de Mestrado**

**ÓXIDO NÍTRICO MODULA A MELHORA DA  
MEMÓRIA INDUZIDA POR ESPERMIDINA EM  
RATOS**

---

**Gustavo Petri Guerra**

**PPGBT**

**SANTA MARIA – RS – BRASIL**

**2006**

**ÓXIDO NÍTRICO MODULA A MELHORA DA  
MEMÓRIA INDUZIDA POR ESPERMIDINA EM  
RATOS**

---

por

**Gustavo Petri Guerra**

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

**PPGBT**

**SANTA MARIA – RS – BRASIL**

**2006**

**Universidade Federal de Santa Maria**  
**Centro de Ciências Naturais e Exatas**  
**Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica**

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

**ÓXIDO NÍTRICO MODULA A MELHORA DA MEMÓRIA  
INDUZIDA POR ESPERMIDINA EM RATOS**

elaborada por

**Gustavo Petri Guerra**

como requisito parcial para obtenção do grau de

**Mestre em Bioquímica Toxicológica**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Maribel Antonello Rubin**

**(Orientadora)**

---

**Marino Bianchin**

---

**Maria Ester Pereira**

**Santa Maria, 06 de dezembro de 2006.**

*Algo só é impossível  
até que alguém duvida  
e acaba provando o contrário.*

*Einstein*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por estar sempre presente e nas horas mais difíceis  
ajudar a escolher o caminho certo.

Agradeço aos meus familiares, em especial minha mãe Maria Elena, por  
ser a base de meus princípios e de minha formação.

Aos meus orientadores, Maribel e Carlos, agradeço pela orientação  
científica, pelos ensinamentos diários, pela amizade, e estejam certos que  
terão sempre meu respeito.

Ao professor Juliano, que estava sempre disposto a contribuir com idéias  
e sugestões para este trabalho.

Aos amigos do Lab., seja de iniciação científica, mestrado ou doutorado,  
pela ajuda, amizade e também pelas inesquecíveis festas.

E a todos que participaram deste trabalho, sem medir esforços para que  
desse certo.

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

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	x
<b>RESUMO</b> .....	xi
<b>ABSTRACT</b> .....	xii
<b>I. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	5
II.1. OBJETIVO GERAL .....	6
II.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	6
<b>III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	7
III.1 – MEMÓRIA .....	8
III.1.1 – A FORMAÇÃO DA MEMÓRIA .....	9
III.1.2 – HIPOCAMPO .....	10
III.2 – RECEPTOR <i>N</i> -METIL-D-ASPARTATO – NMDA .....	13
III.2.1 – RECEPTOR NMDA E MEMÓRIA .....	16
III.3 – POLIAMINAS .....	18
III.3.1 – ESTRUTURA DAS POLIAMINAS .....	18
III.3.2 - METABOLISMO DAS POLIAMINAS .....	20
III.3.2.1 - SÍNTESE .....	20
III.3.2.2 - CATABOLISMO .....	23
III.3.3 – FUNÇÃO DAS POLIAMINAS .....	23
III.4 - ÓXIDO NÍTRICO .....	28
III.4.1 - ÓXIDO NÍTRICO E MEMÓRIA .....	31
<b>IV. RESULTADOS</b> .....	33
IV.1. ARTIGO .....	34
<b>V. DISCUSSÃO</b> .....	43
<b>VI. CONCLUSÕES</b> .....	51
<b>VII. REFERÊNCIAS</b> .....	53

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

L-NAME – N-arginina metil éster

7-NI – 7-Nitroindazol

AMPA – Ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico

AMPc – Adenosina monofosfato cíclica

AP-5 – Ácido D-2-amino-5-fosfonopentanóico

CaMKII – Proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina do tipo II

CPG – Ácido DL-beta-clorofenil glutâmico

CREB – Proteína ligante do elemento responsivo ao AMPc

DAO – Diamina oxidase

GABA – Ácido  $\delta$ -aminobutírico

MgluR – Receptor glutamatérgico metabotrópico

MK-801 – (+)5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,b]-ciclohepteno-5-10-amino

MTA – Metiltioadenosina

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

NMDA – N-metil-D-aspartato

NO – Óxido Nítrico

NOS – Óxido nítrico sintase

ODC – L- ornitina descarboxilase

PAO – Poliamina oxidase

PKC – Proteína quinase dependente de cálcio

SAM – S-adenosil-metionina

SAM-D – S-adenosil-metionina descarboxilada

SAMDC – S-adenosil-metionina descarboxilase

SNC – Sistema Nervoso Central

SPD – Espermidina

SSAT – Espermidina/espermina acetiltransferase



**LISTA DE FIGURAS**

**Revisão Bibliográfica**

**Figura III.1** – Representação esquemática do hipocampo e seus microcircuitos .....12

**Figura III.2** – Representação esquemática do receptor NMDA .....15

**Figura III.3** – Estrutura química das poliaminas.....19

**Figura III.4** – Biossíntese e ciclo de interconversão das poliaminas .....22

**Figura III.5** – Esquema de ações modulatórias da espermidina sobre o receptor NMDA.....26

**Fig. III.6** – Ativação da óxido nítrico sintase no cérebro.....28

**Figura III.7** – Reação de formação do óxido nítrico .....30

**Resultados**

**Figura 1** – a) Drawing adapted from Paxinos and Watson (1986) showing the area (black) where the infusions were considered correctly placed. b) Micrograph (40x) showing the lesion caused by the cannula and injection needle in the dorsal hippocampus.....35

**Figura 2** – Co-administration of L-NAME (0.1 nmol, intrahippocampus) immediately after training prevents the memory improvement induced by spermidine (0.2 nmol) .....37

**Figura 3** – 7-NI (30 mg/kg, i.p. 30 min before training) impairs memory.....38

**Figura 4** – Coadministration of L-NAME (0.1 nmol, intrahippocampus) immediately after training prevents the increase of NOX levels induced by spermidine (0.2 nmol).....39

**Figura 5** – 7-NI (30 mg/kg, i.p.) does not alter spermidine (0.2 nmol) induced increase of NOX levels in the hippocampus.....39

## **LISTA DE TABELAS**

### **Resultados**

- Tabela 1** – Effect of intrahippocampal L-NAME (0.001–0.1 nmol) administered immediately after training on the inhibitory avoidance task performance of rats (measured as the test step-down latency) and on the behavior of rats (number of crossing and rearing responses) in the open field immediately after the inhibitory avoidance testing session.....37
- Tabela 2** – Effect of the immediately after training intrahippocampal coadministration of L-NAME (0.1 nmol) and/or spermidine (SPD, 0.2 nmol) on the behavior of rats in the open field immediately after the inhibitory avoidance testing session.....38
- Tabela 3** – Effect of 7-NI (1–30 mg/kg, i.p.) 30 min before training on the inhibitory avoidance task performance of adult rats (measured as the test step-down latency) and on the behavior of rats (number of crossing and rearing responses) in the open field immediately after the inhibitory avoidance testing session.....38
- Tabela 4** – Effect of 7-NI (30 mg/kg, i.p., 30 min before training) and spermidine (SPD, 0.2 nmol, intrahippocampus, immediately after training) on the behavior of rats in the open field immediately after the inhibitory avoidance testing session.....39

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

### **ÓXIDO NÍTRICO MODULA A MELHORA DA MEMÓRIA INDUZIDA POR ESPERMIDINA EM RATOS**

Autor: Gustavo Petri Guerra  
Orientadora: Maribel Antonello Rubin  
Co-orientador: Carlos Fernando de Mello  
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 06 de dezembro de 2006.

As poliaminas endógenas, putrescina, espermidina e espermina, são aminas alifáticas que estão presentes em altas concentrações no sistema nervoso central (SNC). A ação das poliaminas envolve a modulação de diversos canais iônicos, incluindo o subtipo de receptor glutamatérgico *N*-metil-D-aspartato (NMDA). Os processos mediados pelo receptor NMDA incluem plasticidade sináptica e formação de circuitos neurais. Acredita-se que estas plasticidades ocorrendo em algumas regiões cerebrais específicas, como o hipocampo, são críticas para os processos de aprendizado e memória. Está descrito que espermidina (SPD), assim como o óxido nítrico (NO) estão diretamente envolvidos com processos de formação da memória. Assim nós investigamos o envolvimento do óxido nítrico sobre a melhora da memória induzida por SPD em ratos Wistar machos. Para isso, os ratos foram canulados bilateralmente no hipocampo, após a recuperação cirúrgica, os animais foram treinados no aparelho de esquiva inibitória, injetados bilateralmente no hipocampo e testados no mesmo aparelho. Trinta minutos após a administração das drogas os animais foram decapitados e os níveis de nitrito e nitrato (NO<sub>x</sub>) foram determinados no hipocampo dos ratos. A injeção bilateral de 0,1 nmol de L-NAME, um inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase, SPD (0,2 nmol) ou a associação de SPD e L-NAME, foram realizadas imediatamente após o treino na tarefa de esquiva inibitória. A administração de L-NAME não causou efeito *per se* sobre a memória e reverteu o efeito facilitatório causado pela SPD. Espermidina aumentou os níveis de NO<sub>x</sub> no hipocampo, e a co-injeção de L-NAME preveniu este aumento induzido por SPD. A administração sistêmica de 7-NI (30 mg/kg), um inibidor seletivo da óxido nítrico sintase neuronal, 30 minutos antes do treino da esquiva inibitória piorou a memória e não preveniu o aumento nos níveis de NO<sub>x</sub> induzidos por SPD. Nenhuma das drogas estudadas alterou a atividade motora dos animais. Estes resultados sugerem que o efeito facilitatório da memória induzido por SPD é mediado, pelo menos em parte, pelo aumento da síntese do óxido nítrico.

## ABSTRACT

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

### NITRIC OXIDE MODULATES THE IMPROVEMENT OF THE MEMORY INDUCED BY SPERMIDINE IN RAT

Author: Gustavo Petri Guerra

Advisors: Maribel Antonello Rubin

Carlos Fernando de Mello

Date and place of defense: Santa Maria, december 06, 2006.

The endogenous polyamines, putrescine, spermidine and spermine are aliphatic amines that are present in high concentrations in the central nervous system (CNS). The action of the polyamines involves the modulation of several ionic channels, including the subtype of glutamatergic N-methyl-D-aspartate receptor (NMDA). The processes mediated by NMDA receptor include synaptic plasticity and formation of neural circuitry. It is believed that these plasticities happening in some cerebral areas specifies, as the hippocampus, are critical for the learning and memory processes. It is described that spermidine (SPD), as well as the nitric oxide are directly involved with processes of formation of the memory. Therefore, we investigated the involvement of the nitric oxide in the facilitatory effect induced by SPD on the memory of males Wistar rats. For that, the rats were bilaterally cannulated in the hippocampus, after the surgical recovery, the animals were trained in the inhibitory avoidance task, injected bilaterally in the hippocampus and tested in the same task. Thirty minutes after the administration of the drugs the animals were decapitated and the nitrite and nitrate levels ( $\text{NO}_x$ ) they were determined in the hippocampus of the rats. The bilateral injection of 0.1 nmol of L-NAME, a non-selective inhibitor of the nitric oxide synthase, SPD (0.2 nmol) or the association of SPD and L-NAME, were achieved immediately after the training in the inhibitory avoidance task. The administration of L-NAME didn't cause effect *per se* on memory and it reverted the facilitatory effect induced by SPD. Spermidine increased the levels of  $\text{NO}_x$  in the hippocampus, and the co-injection of L-NAME prevented this increase induced by SPD. The systemic administration of 7-NI (30 mg/kg), a selective inhibitor of the nitric oxide synthase neuronal, 30 minutes before the training of it the inhibitory avoidance impaired the memory and didn't prevent the increase in the levels of  $\text{NO}_x$  induced by SPD. None of the drugs studied altered the locomotor activity of the animals. These results suggest that the facilitatory effect of the memory induced by SPD is mediated, at least partly, for the increase of the synthesis of the nitric oxide.

---

## I. INTRODUÇÃO

As poliaminas, espermidina, espermina e putrescina, são um grupo de aminas alifáticas com estrutura policatiônica, que em pH fisiológico possuem uma carga positiva em cada átomo de nitrogênio (Carter, 1994). A ação das poliaminas envolve a modulação do receptor glutamatérgico N-metil-D-aspartato (NMDA) (Williams *et al.*, 1997; Rock & MacDonald, 1995). O papel modulatório das poliaminas no receptor NMDA tem estado bastante descrito (Williams *et al.*, 1991; Rock & MacDonald, 1995). Elas têm uma ação complexa nesse receptor, como demonstrado pelo efeito bifásico da espermina e da espermidina sobre a ligação do [<sup>3</sup>H]MK-801, isto é, baixas doses aumentam a ligação deste no receptor NMDA, enquanto altas doses não têm efeito (Rock & MacDonald, 1995; Johnson, 1996; Williams, 1997). Esta dupla modulação parece, também, existir a nível comportamental, uma vez que a administração intra-hipocampal e intra-amígdala de agonistas para o sítio das poliaminas, em baixas, mas não em altas doses, melhoram o desempenho dos ratos na tarefa de esQUIVA INIBITÓRIA (Rubin *et al.*, 2000, 2001).

O hipocampo é uma estrutura do lobo temporal medial sabidamente envolvido na aquisição/consolidação e ou evocação da memória (Izquierdo & Medina, 1995). Estudos têm demonstrado que a administração intra-hipocampal de espermidina (0,02-2,0 nmol/hipocampo) e intra-amígdala (0,02-20,0 nmol/amígdala) melhora o desempenho dos animais nas tarefas de esQUIVA INIBITÓRIA (Rubin *et al.*, 2000, 2001, Berlese *et al.*, 2005) e de medo condicionado (Rubin *et al.*,

2004). A melhora da memória causada pela espermidina no teste de esQUIVA inibitória ocorre somente nas fases de aquisição e início da consolidação da memória, não ocorrendo nas fases de consolidação tardia e nem na evocação da memória (Berlese *et al.*, 2005).

O óxido nítrico (NO) é sintetizado pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) que catalisa a conversão da L-arginina em L-citrulina produzindo óxido nítrico como co-produto, em uma reação dependente de NADPH (Garthwaite, 1991).

O NO é sintetizado por vários tipos de células, como neurônios, células endoteliais e macrófagos, por uma família de três isoformas da NOS. A enzima óxido nítrico sintase neuronal (*n*-NOS), presente nos neurônios, e a enzima óxido nítrico sintase endotelial (*e*-NOS), presente no endotélio, possuem atividade regulada por íons  $Ca^{2+}$ . Enquanto a óxido nítrico sintase induzível (*i*-NOS) independe destes íons (Alderton *et al.*, 2001).

O NO está descrito como um mensageiro retrógrado, por ser produzido em células pós-sinápticas e atuar em células pré-sinápticas, aumentando a liberação de glutamato (Meyer *et al.* 1998). Nos neurônios, a síntese de NO é estimulada pelo influxo de  $Ca^{2+}$  através da ativação dos receptores glutamatérgicos, preferencialmente receptores NMDA, (Prast & Philippu, 2001). Evidências demonstram que processos mediados pela ativação de receptores NMDA hipocampal possuem um importante papel no aprendizado e memória (Morris, 1989).



Os efeitos da administração sistêmica de inibidores da NOS sobre o aprendizado e memória têm sido estudado em ratos (Estall, *et al.*, 1993).  $N^G$  Nitro-l-arginina-metil éster (L-NAME), um inibidor competitivo da NOS, prejudica a memória em ratos (Calixto *et al.*, 2001) e em camundongos na tarefa de esQUIVA inibitória (Baratti & Kopf, 1996). Estudos sugerem que processos dependentes de NO no hipocampo possam contribuir para o aprendizado espacial. Assim, a administração intra-hipocampal de L-NAME prejudica a memória de trabalho (Ohno *et al.*, 1993).

Estudos farmacológicos têm demonstrado que a isoforma NOS neuronal (n-NOS) está diretamente ligada à plasticidade sináptica e ao aprendizado em ratos. Está descrito que 7-nitroindazol (7-NI), um inibidor seletivo da n-NOS, prejudica o aprendizado no labirinto aquático de Morris (Holscher *et al.*, 1996), no labirinto de 14 braços em T (Meyer, 1998), e na tarefa de medo condicionado em ratos (Vanaja & Ekambaram, 2004). Isto apóia a visão que n-NOS é utilizada para as formas de aprendizado e memória que requerem o hipocampo.

Neste estudo, foi investigado o envolvimento do NO sobre a melhora da memória causada por espermidina na tarefa de esQUIVA inibitória. Para isto, foi avaliado o efeito do L-NAME, um inibidor não seletivo da NOS, e do 7-NI, um inibidor seletivo da n-NOS, na melhora da memória causada por espermidina em ratos na tarefa esQUIVA inibitoria.

---

## **II. OBJETIVOS**

## **II.1. OBJETIVO GERAL**

Avaliar o envolvimento do óxido nítrico na melhora da memória induzida pela administração intra-hipocampal de SPD na tarefa de esQUIVA inibitória em ratos.

## **II.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Investigar o efeito da administração intra-hipocampal de L-NAME e da administração sistêmica de 7-NI sobre a memória na tarefa de esQUIVA inibitória em ratos.
  
- Investigar o efeito da administração intra-hipocampal de L-NAME e da administração sistêmica de 7-NI sobre a melhora da memória induzida por SPD na tarefa de esQUIVA inibitória em ratos.
  
- Avaliar o efeito da administração intra-hipocampal de L-NAME e da administração sistêmica de 7-NI sobre o possível aumento nos níveis de nitrito e nitrato hipocampais induzidos pela administração intra-hipocampal de SPD.

---

### **III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### III.1 – MEMÓRIA

A memória desperta o interesse e a imaginação do homem desde a Antigüidade, contudo os primeiros estudos científicos foram realizados há pouco mais de um século. Hoje, possuímos uma razoável compreensão sobre os mecanismos de sua formação.

Para a formação de uma memória é necessário que ocorra antes um aprendizado, que é a aquisição de novas informações, é a modificação de um comportamento após uma experiência vivida. E a memória nada mais é do que a capacidade de armazenar estas novas informações e recordar aprendizados anteriores (Izquierdo, 2002).

A memória pode ser classificada em dois diferentes tipos, de acordo com seu conteúdo: a memória declarativa e a não declarativa. A memória declarativa é aquela evocada pelo consciente e a qual conseguimos verbalizar, é uma memória para fatos e eventos que ocorreram em nossa vida, como uma viagem ou um casamento. A memória não declarativa, também chamada de memória de procedimento, é aquela evocada pelo inconsciente e que não conseguimos verbalizar, é uma memória relacionada com hábitos, habilidades motoras e comportamentos, como andar de bicicleta ou dirigir um automóvel (Bear *et al.*, 2002).

A memória também pode ser classificada quanto ao seu tempo de duração: como imediata, de curta e de longa duração. A memória imediata, também chamada memória de trabalho, mantém as informações

por apenas alguns segundos, não deixando traços ou produzindo arquivos, como por exemplo, a memória de um número de telefone que consultamos na lista telefônica, e que esquecemos logo após tê-lo digitado. A memória de curta duração, que dura minutos ou poucas horas, e a memória de longa duração, que dura meses ou anos, por sua vez são armazenadas e formam arquivos de memórias. Sendo este período chamado de período de "consolidação" (Izquierdo, 2002; Squire & Kandel, 2003).

### **III.1.1 – A FORMAÇÃO DA MEMÓRIA**

A formação de uma nova memória depende de processos neurais que iniciam com a aquisição de uma informação, seguido por um processo de consolidação (armazenamento da informação) e por fim um processo de evocação, quando a memória está pronta para ser lembrada (Abel & Lattal, 2001).

Acredita-se que um aumento na liberação de neurotransmissores, principalmente glutamato, seja o primeiro passo para a formação da memória (McGaugh, 2000; McGaugh & Izquierdo, 2000). O glutamato liberado se liga aos receptores glutamatérgicos ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA), cainato, *N*-metil-D-aspartato (NMDA) e metabotrópicos (MgluR), provocando a abertura dos canais de cálcio voltagem dependente, e aumentando a concentração de cálcio

intracelular. Como consequência disso, são ativadas enzimas como proteína quinase cálcio-dependente (PKC), proteína quinase cálcio-calmodulina dependente (CaMKII), proteína quinase dependente de AMPc (sigla em inglês: CREB), etc, que por sua vez ativam mecanismos intracelulares que culminam com a síntese protéica, e no aumento da transmissão de informações entre neurônios. Tais alterações entre os neurônios têm sido denominada "plasticidade sináptica" (McGaugh, 2000; McGaugh, 2002; McGaugh & Izquierdo, 2000).

### III.1.2 – HIPOCAMPO

No lobo temporal medial, encontra-se um grupo de estruturas de grande importância para a consolidação memória, e entre elas está o hipocampo.

O hipocampo é uma estrutura em forma de um “cavalo-marinho” formada por duas camadas de neurônios, dobradas uma sobre a outra, sendo uma chamada giro dentado e a outra corno de Amon. O corno de Amon possui quatro divisões, do qual duas são as mais importantes: CA1 e CA3 (CA significa corno de Amon) (Miller & O'Callaghan, 2005).

A grande via de entrada de informações no hipocampo é o córtex entorrinal. O córtex entorrinal envia informações ao hipocampo por meio de um feixe de axônios chamado *via perforante*. Estes axônios estabelecem sinapses em neurônios do giro dentado.

Os neurônios do giro denteado projetam axônios (chamados de fibras musgosas) que estabelecem sinapses em células de CA3, que por sua vez, projetam axônios, que se ramificam. Um ramo deixa o hipocampo pelo fórnix, e o outro ramo, chamado colateral de *Schaffer*, forma sinapses excitatórias em neurônios da CA1 (Fig. III.1). A informação neural é transmitida a partir da região CA1 a outras áreas, constituindo uma saída da informação pré-processada no hipocampo (Bear *et al.*, 2002; Watts & Thomson, 2005)

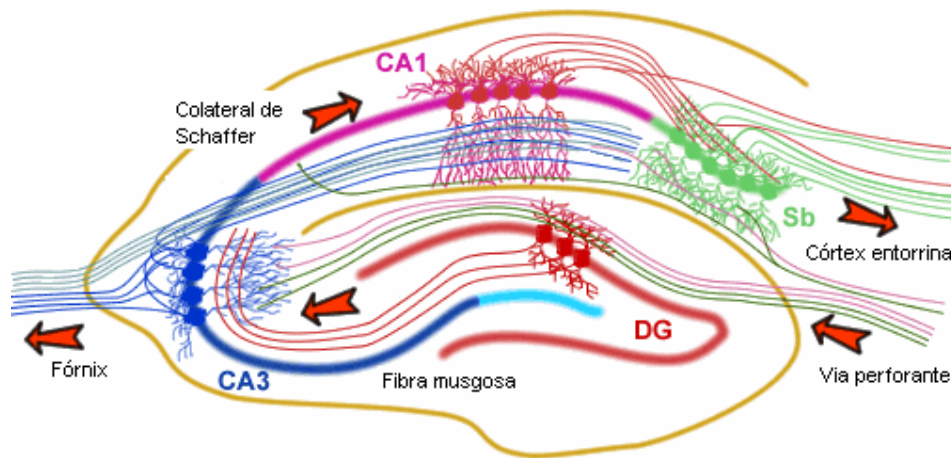
O hipocampo sem dúvida é de grande importância para a formação da memória, uma vez que manipulações farmacológicas e bioquímicas nestas áreas alteram a memória em diferentes tarefas (Berlese *et al.*, 2005; Bernabeu *et al.*, 1996; Chou & Lee, 1995; Izquierdo & Medina, 1995; Morris, 1989; Rubin *et al.*, 2000).

Estudos mostram que administração intra-hipocampal (Jafari-Sabet, 2006) e intra-amígdala (Roesler *et al.*, 2000) imediatamente pós-treino de ácido aminofosfopentanóico (AP5), antagonista competitivo do receptor glutamatérgico NMDA, causa prejuízo de memória na tarefa de esQUIVA INIBITÓRIA. A administração intra-hipocampal de AP5 (1-10 µg/rato) além de causar déficit de memória, diminui o efeito facilitatório sobre a memória induzido por injeção intra-hipocampal de NMDA (10<sup>-2</sup> µg/rato) na tarefa de esQUIVA INIBITÓRIA (Jafari-Sabet, 2006).

Estudos mostram ainda que ratos com lesões no hipocampo apresentam um prejuízo no aprendizado espacial (Broadbent *et al.*, 2004)



Estas evidências indicam que os receptores glutamatergicos hipocampais estão diretamente envolvidos na formação da memória.



**Fig. III.1-** Representação esquemática do hipocampo e seus microcircuitos. (Adaptado de: The University of British Columbia. Disponível em: <[http://www.psych.ubc.ca/.../slide0005\\_image013.gif](http://www.psych.ubc.ca/.../slide0005_image013.gif)>. Acesso em: 8 Nov., 2006.)

### III.2 – RECEPTOR N-METIL-D-ASPARTATO – NMDA

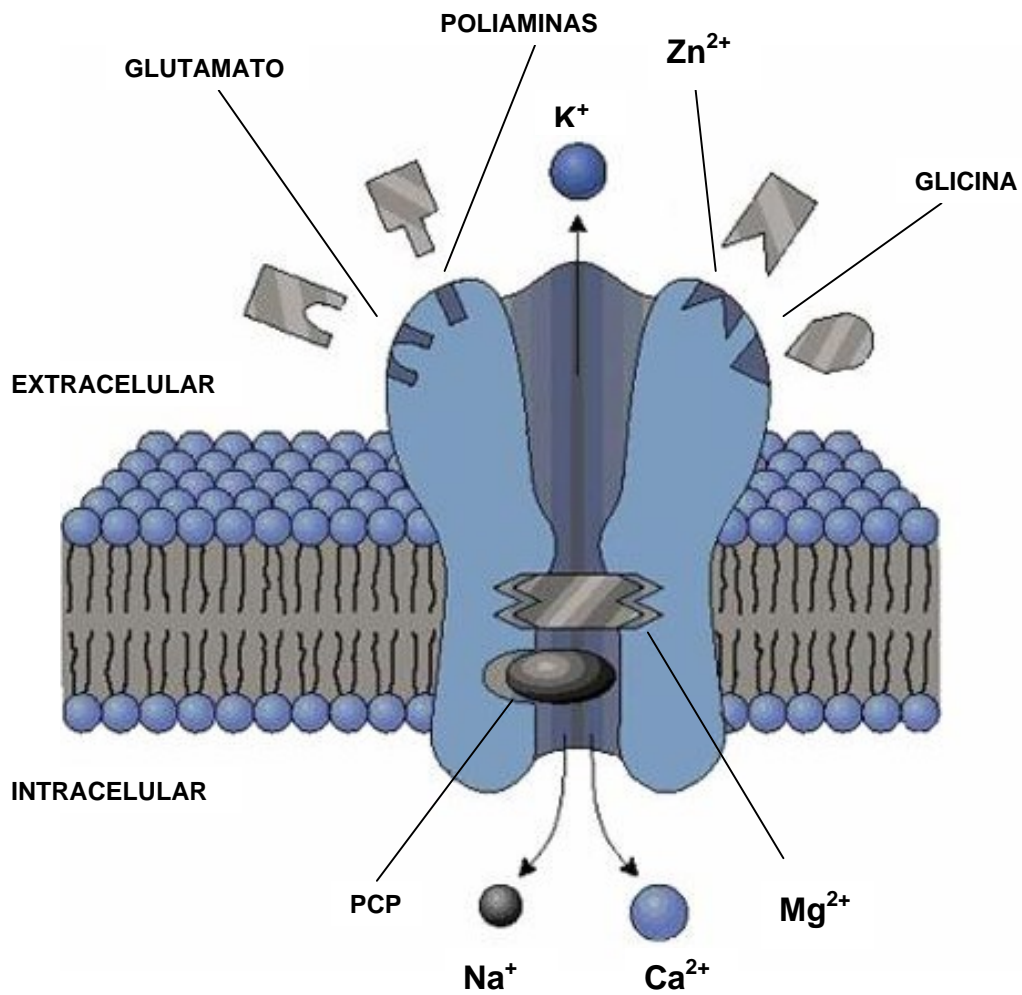
O receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) é um subtipo de receptor glutamatérgico, amplamente distribuído no sistema nervoso central, sendo os níveis mais altos encontrados na região CA1 do hipocampo (Monaghan & Cotman, 1985). O NMDA possui várias subunidades denominadas: NR1 (onde se liga a glicina), NR2 (A-D) (onde se liga o glutamato) e NR3 (A-B) (Prybylowski & Wenthold, 2004; Yamakura & Shimoji, 1999).

Esse receptor é formado por um canal iônico que possui alta permeabilidade aos íons sódio ( $\text{Na}^+$ ), potássio ( $\text{K}^+$ ) e cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (MacDermott *et al.*, 1986; Mayer & Westbrook, 1987a). No potencial de repouso o canal está bloqueado por íons  $\text{Mg}^{2+}$  (Riedel *et al.*, 2003), impedindo a passagem de outros íons. Para o  $\text{Mg}^{2+}$  sair do poro e ocorrer a ativação do receptor NMDA é necessário uma despolarização da membrana neural pós-sináptica. Esta despolarização ocorre com a ativação dos receptores glutamatérgicos pós-sinápticos do tipo AMPA. E por este motivo a entrada de íons através do canal NMDA é considerada dependente de voltagem (Bear *et al.*, 2002).

A despolarização proporciona a liberação de neurotransmissores na fenda sináptica, incluindo o glutamato, e a ativação do receptor NMDA que resulta no influxo de íons  $\text{Na}^+$  e principalmente  $\text{Ca}^{2+}$  e no efluxo de íons  $\text{K}^+$  (Ozawa *et al.*, 1998; Scatton, 1993).

O influxo de cálcio que acompanha a ativação do receptor NMDA é responsável pela ativação de proteínas quinases dependentes de cálcio (PKC) e de proteínas quinases dependentes de cálcio-calmodulina II (CAMKII). Estas são responsáveis por algumas respostas celulares mediadas pelo receptor NMDA, incluindo a plasticidade sináptica (Bliss & Collingridge, 1993; Elgersma & Silva, 1999; Izquierdo & Medina, 1995; McGaugh & Izquierdo, 2000; Teyler, 1999).

O receptor NMDA é um complexo protéico com vários sítios de ligação para agonistas e antagonistas, tais como glutamato/NMDA, sítio onde se liga dizocilpina (MK-801), sítio modulatório para a glicina (co-agonista do receptor NMDA) e zinco, bem como sítios de ligação para poliaminas (Ranson & Stec, 1988; Riedel *et al.*, 2003; Shing *et al.*, 1990; Williams *et al.*, 1991) (Fig. III. 2).



**Fig. III.2** – Representação esquemática do receptor NMDA. (Adaptado de: Anaesthesia UK. Disponível em: <<http://www.frca.co.uk/images/NMDA.jpg>>. Acesso em: 8 Nov., 2006.)

### III.2.1 – RECEPTOR NMDA E MEMÓRIA

Muitas evidências demonstram que o receptor glutamatérgico NMDA é fundamental para os processos de plasticidade sináptica e formação de memória para diferentes tarefas (Castelano *et al.*, 2001; Riedel *et al.*, 2003). Estudos com manipulações farmacológicas e genéticas mostram que o receptor NMDA está diretamente envolvido na formação de memórias aversivas (Fanselow & Kim 1994; Izquierdo *et al.*, 1992; Miserendino *et al.*, 1990; Roesler *et al.*, 1998) e espaciais (Ahlander *et al.*, 1999; Bolhuis & Reid, 1992; Caramanos & Shapiro 1994; Morris *et al.*, 1986; Shapiro & O'Connor, 1992; Shapiro & Eichenbaum, 1999).

Administração sistêmica ou intracerebral de bloqueadores do canal do receptor NMDA causam prejuízo no desempenho de ratos em uma grande variedade de tarefas de memória (Izquierdo & Medina, 1995).

De Lima e colaboradores (2005), demonstraram que a administração sistêmica de 0,1 mg/kg de (+)5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,b]-ciclohepteno-5-10-amino (MK-801), um antagonista não-competitivo do receptor NMDA, 20 minutos antes ou imediatamente depois do treino na tarefa de reconhecimento de objetos prejudica a memória de curta e longa duração. Roesler e colaboradores (2000), também demonstraram prejuízo da memória na tarefa de esquiva inibitória devido a administração pré ou pós-treino intra-amígdala de 5 µg de ácido-D-2-amino-5-fosfonopentanóico (AP5), um antagonista competitivo do receptor NMDA. Enquanto que a administração de AP5 pré-teste não

afetou a memória para a mesma tarefa. Efeito similar ainda foi demonstrado para administração intra-hipocampal deste composto, na tarefa de esquiva inibitória (Jafari-Sabet, 2006) e na tarefa do labirinto aquático de Morris (Morris, 1989).

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

Além disso, estudos demonstram que o número de receptores NMDA está reduzido no sistema nervoso central de pacientes com doença de Alzheimer (Sze *et al.*, 2001).

Todas estas evidências farmacológicas estão de acordo com estudos envolvendo camundongos transgênicos, onde é demonstrado que a super-expressão de receptores NMDA produz um melhor desempenho destes animais em tarefas de memória (Tang *et al.*, 1999).

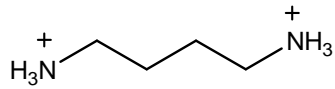
### **III.3 – POLIAMINAS**

#### **III.3.1 – ESTRUTURA DAS POLIAMINAS**

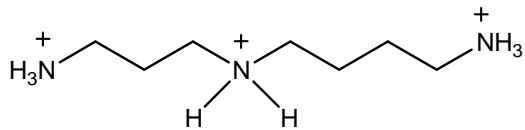
As poliaminas, putrescina, espermidina (SPD) e espermina, são aminas alifáticas simples constituídas por uma, duas ou três cadeias de carbono, respectivamente (fig III.3). Elas são solúveis em água, possuem baixo peso molecular, caráter fortemente básico, devido aos grupamentos amino, e em pH fisiológico encontram-se completamente protonadas (Carter, 1994; Dawson *et al.*, 1986; Seiler *et al.*, 1996).

A interação das poliaminas com ácidos nucleicos e proteínas é essencial para manter a regulação do crescimento e desenvolvimento celular (Marton & Morris, 1987; Seiler *et al.*, 1996). Além disso, as poliaminas parecem modular a atividade de receptores e canais iônicos (Seiler *et al.*, 1996).

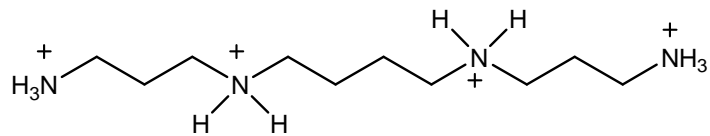
Os níveis intracelulares de poliaminas são mantidos dentro de um limite muito estreito, e a diminuição nos níveis de poliaminas interfere no crescimento celular, enquanto um excesso pode ser tóxico (Davis, 1990).



Putrescina



Espermidina



Espermina

**Fig. III.3** - Estrutura química das poliaminas (adaptado de Teti *et al.*, 2002).



### III.3.2 – METABOLISMO DAS POLIAMINAS

#### III.3.2.1 – SÍNTESE

O aminoácido ornitina é o principal precursor das poliaminas endógenas. No cérebro, a ornitina é formada a partir da clivagem hidrolítica do aminoácido arginina em uma reação catalisada pela arginase (Fig. III.4) (Carter, 1994; Seiler, 1981; Seiler, 1994).

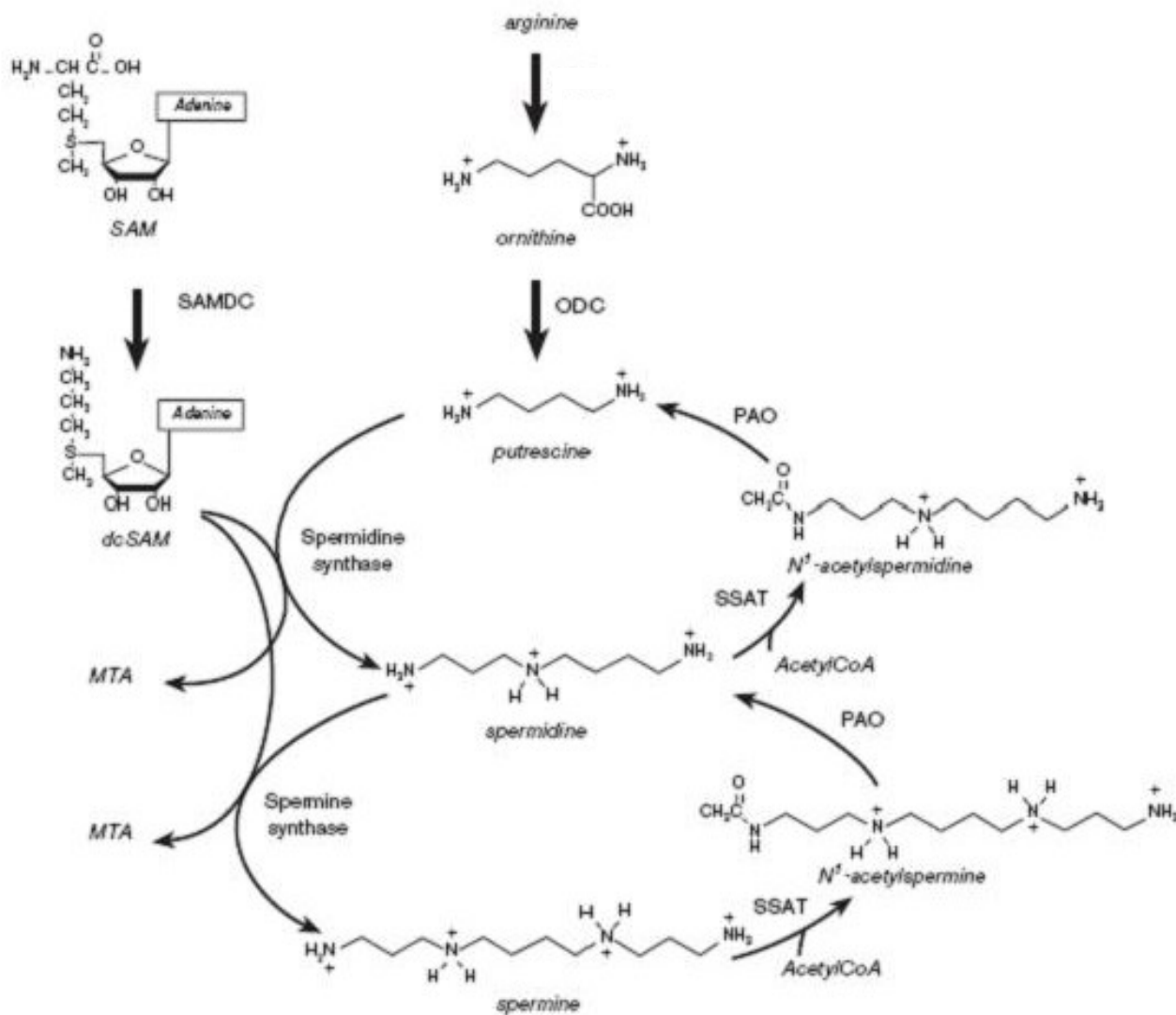
A putrescina é sintetizada pela descarboxilação da ornitina, uma reação catalisada pela enzima ornitina descarboxilase (ODC). A putrescina formada serve como precursor imediato da síntese de espermidina e espermina. Esta síntese requer o grupo aminopropil que é fornecido pela ação de duas enzimas: a S-adenosilmetionina descarboxilase (SAMDC), que descarboxila a S-adenosilmetionina (SAM), e a espermidina sintase, uma enzima transferase que catalisa a transferência do grupamento aminopropil da SAM para a putrescina ou espermina sintase que catalisa a transferência de um segundo grupamento aminopropil para a SPD, formando SPD e espermina respectivamente (Jeevanandam & Petersen 2001; Tabor & Tabor, 1984; Urdiales *et al.*, 2001;).

Esta rota de síntese de poliaminas é reversível, ou seja, a espermina pode ser convertida em SPD e esta em putrescina. O primeiro passo desta interconversão é a acetilação da espermina ou SPD na posição N<sup>1</sup>, catalisada pela enzima espermidina/espermina acetiltransferase (SSAT).

Após este passo, a poliamina acetilada sofre quebra oxidativa, por ação da enzima poliamina oxidase (PAO), liberando os grupos aminopropil provenientes da S-adenosilmetionina descarboxilada (SAM-D) para formar SPD e putrescina. O produto destas reações permanece no ciclo e pode ser reutilizado na síntese das poliaminas (Seiler, 1994; Urdiales *et al.*, 2001).

Estudos com a inibição da poliamina oxidase têm demonstrado que a rota de interconversão de poliaminas, no encéfalo de ratos, é responsável por 70% da putrescina formada a partir da SPD, enquanto somente 30% da putrescina é formada pela descarboxilação da ornitina (Carter, 1994; Seiler *et al.*, 1985).

Assim as enzimas chave na regulação da síntese de poliaminas são ornitina descarboxilase, S-adenosilmetionina descarboxilase e espermidina/espermina acetiltransferase (Urdiales *et al.*, 2001).



**Fig. III.4** - Biossíntese e ciclo de interconversão das poliaminas. S-adenosilmetionina (SAM); S-adenosilmetionina descarboxilada (SAM-D); metiltioadenosina (MTA) (Urdiales *et al.*, 2001).

### III.3.2.2 – CATABOLISMO

O catabolismo das poliaminas, consiste na desaminação oxidativa de seus grupos amino primários, sendo a reação catalisada por amino oxidases dependentes de cobre, como a diamina oxidase (DAO). Através desta desaminação cada intermediário do ciclo da interconversão pode ser transformado em um aldeído, que é posteriormente oxidado em um aminoácido (Rokkas *et al.*, 1990), e apenas a putrescina pode ser convertida em ácido aminobutírico (GABA) (Raul *et al.*, 1995).

Os produtos finais do catabolismo das poliaminas, bem como as poliaminas acetiladas, podem então ser excretados na urina (Carter, 1994; Gugliucci, 2004; Teti *et al.*, 2002).

### III.3.3 – FUNÇÃO DAS POLIAMINAS

As poliaminas estão amplamente distribuídas no sistema nervoso central. São encontradas principalmente em regiões do encéfalo como hipotálamo, bulbo, hipocampo e cerebelo, sendo a mais alta concentração de SPD, seguida por espemina e por fim putrescina, que possui uma concentração muito pequena em comparação as outras duas (Seiler & Schmitd-Glenewinkel, 1975).

Estudos demonstram que as poliaminas também estão envolvidas nos processos de crescimento e diferenciação celular por ativação da

síntese do RNA e da síntese protéica (Campbel *et al.*, 1978; Celano *et al.*, 1989; Tabor & Tabor, 1984, Thomas & Thomas, 2001) e que suas concentrações estão aumentadas em casos de tumores cerebrais (Ernestus *et al.*, 1993; Rohn *et al.*, 2001; Seiler, 1981). O bloqueio da enzima ornitina descarboxilase, o qual reduz o nível de poliaminas intracelulares, tem sido testado em estudos clínicos para o tratamento do câncer (Kubo *et al.*, 1998; Messing *et al.*, 2006; Tabor & Tabor, 1984) e tem mostrado eficácia em alguns modelos de neurodegeneração (Kish, 1991; Rock & Macdonald, 1995).

Vários estudos apontam que o efeito das poliaminas no SNC deve-se a uma ação como neurotransmissores e neuromoduladores (Alexander *et al.*, 1992; Carter, 1994; Williams *et al.*, 1991), uma vez que: 1) as poliaminas são armazenadas em vesículas sinápticas; 2) são liberadas de maneira cálcio-dependente, seguindo um estímulo químico ou elétrico; 3) existe um sistema de recaptção de alta afinidade para as poliaminas, que regula o nível extracelular e o tempo de efeito (Carter, 1994; Harman & Shaw, 1981; Seiler, 1994; Williams *et al.*, 1989, 1991; Williams, 1997).

O principal foco de estudo das poliaminas deve-se a interação com o receptor NMDA, especialmente com a subunidade NR2B (Coughenour & Barr, 2001).

Espermina e espermidina atuam sobre o receptor NMDA de maneira bifásica, sugerindo dois efeitos distintos das poliaminas. A espermina, em altas concentrações não potencializa a ligação do [<sup>3</sup>H]MK-801, enquanto

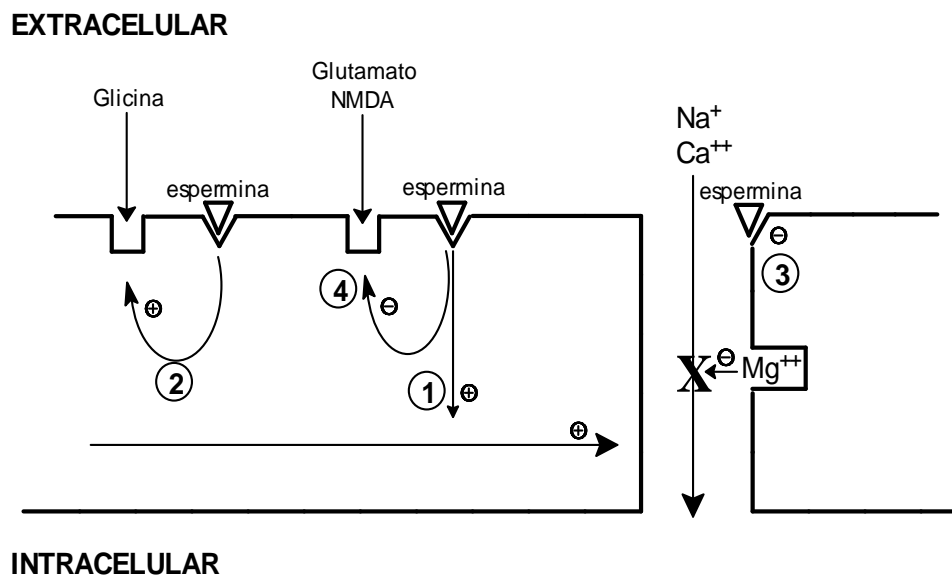
que em baixas concentrações aumenta a condutância do receptor NMDA, por aumentar a frequência de abertura do canal (Johnson, 1996; Rock & MacDonald, 1995; Williams, 1997). Esta ação complexa das poliaminas sobre o receptor NMDA sugere que possa haver mais de um sítio de ligação de poliaminas associado a este receptor (Johnson, 1996; Shing *et al.*, 1990; Worthen *et al.*, 2001; Yoneda & Ogita, 1991).

A figura III.5 apresenta o esquema das possíveis ações modulatórias da espermina sobre o receptor NMDA (Johnson, 1996).

- 1) as poliaminas aumentam as correntes induzidas por glutamato na presença de concentrações saturantes de glicina;
- 2) estimulação glicina-dependente: as poliaminas aumentam a afinidade do receptor pela glicina;
- 3) uma inibição voltagem dependente, ou por diminuição da condutância do canal, ou como resultado de seu caráter catiônico na entrada do poro, ou por um bloqueio do canal aberto em um sítio dentro do poro como faz o magnésio;
- 4) inibição da afinidade do receptor pelo glutamato.

Esta resposta bifásica parece também existir a nível comportamental. A administração intra-hipocampal de SPD imediatamente após o treino, melhora o desempenho de ratos na tarefa de esquiva inibitória em baixas doses, efeito que não é observado com altas doses (Berlese *et al.*, 2005; Rubin *et al.*, 2000). Este efeito também é

demonstrado pela administração intra-amígdala de SPD na tarefa de medo condicionado (Rubin *et al.*, 2004).



**Fig. III.5** - Esquema de ações modulatórias da espermina sobre o receptor NMDA (adaptado de Johnson, 1996). (+) Ação estimulatória das poliaminas; (-) ação inibitória das poliaminas.

Existem estudos que demonstram o envolvimento das poliaminas na modulação da memória (Khish *et al.*, 1998a; Khish *et al.*, 1998 b; Meyer *et al.*, 1998; Rubin *et al.*, 2000; 2001; 2004; Shimada *et al.*, 1994). Altas doses de espermina (125-250 nmol), administradas por via intracerebroventricular, causam dano hipocampal e déficit de aprendizado em ratos na tarefa do labirinto aquático de Morris (Conway, 1998). E administração intra-peritoneal de poliaminas potencializa a diminuição do aprendizado induzido por dizocilpina no labirinto em T de 14 braços (Shimada *et al.*, 1994).

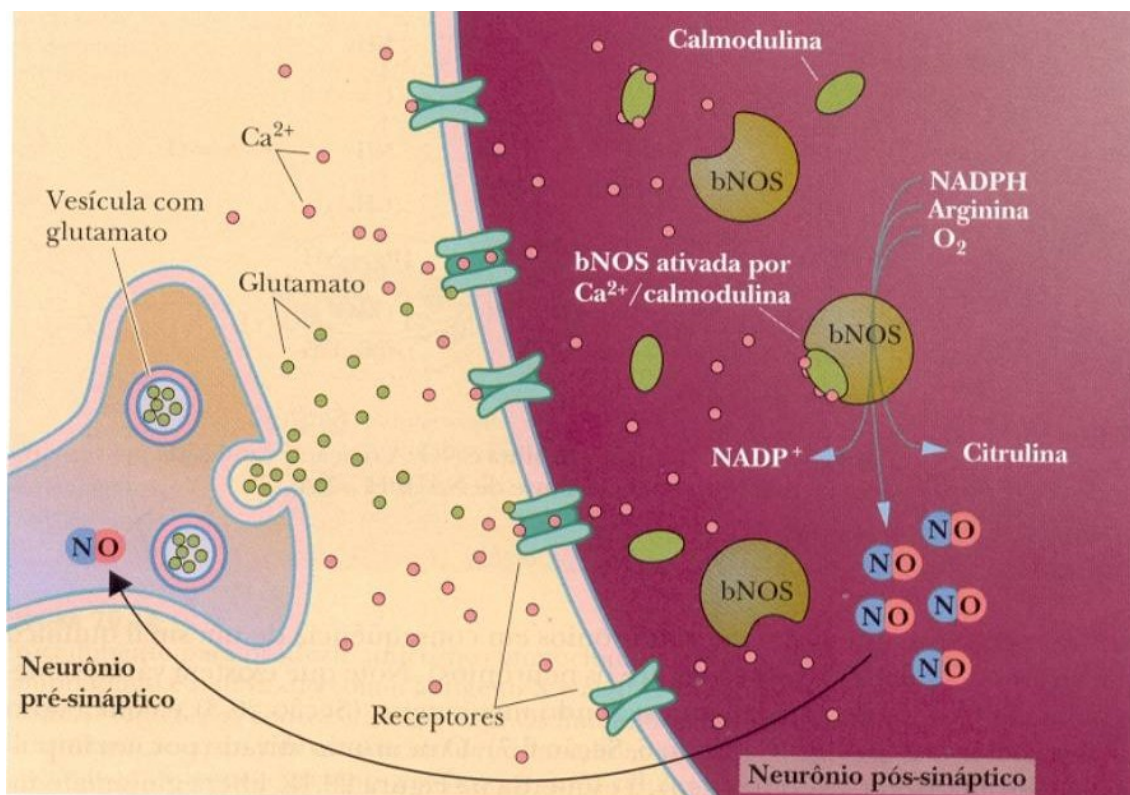
Por outro lado, a administração intra-hipocampal de SPD (10 µg/hipocampo) é capaz de atenuar, o número de erros para memória de trabalho induzidos por administração intra-hipocampal tanto de MK-801, um antagonista não-competitivo do receptor NMDA (Kishi *et al.*, 1998a), quanto por escopolamina (3,2 µg/hipocampo), antagonista do receptor muscarínico (Khish *et al.*, 1998 b). E administração intra-peritoneal de espermina atenua, de maneira dose dependente, o prejuízo no aprendizado induzido por CPP, um antagonista competitivo do receptor NMDA, no labirinto em T de 14 braços (Meyer *et al.*, 1998).

Além disso, também é demonstrado que a administração sistêmica de SPD melhora a memória de curta duração em ratos (Mikolajczak *et al.*, 2002), administração intra-amígdala (Rubin *et al.*, 2001) e intra-hipocampal (Berlese *et al.*, 2005; Rubin *et al.*, 2000) melhora a memória na tarefa de esQUIVA inibitória e medo condicionado (Rubin *et al.*, 2004).



### III.4 – ÓXIDO NÍTRICO

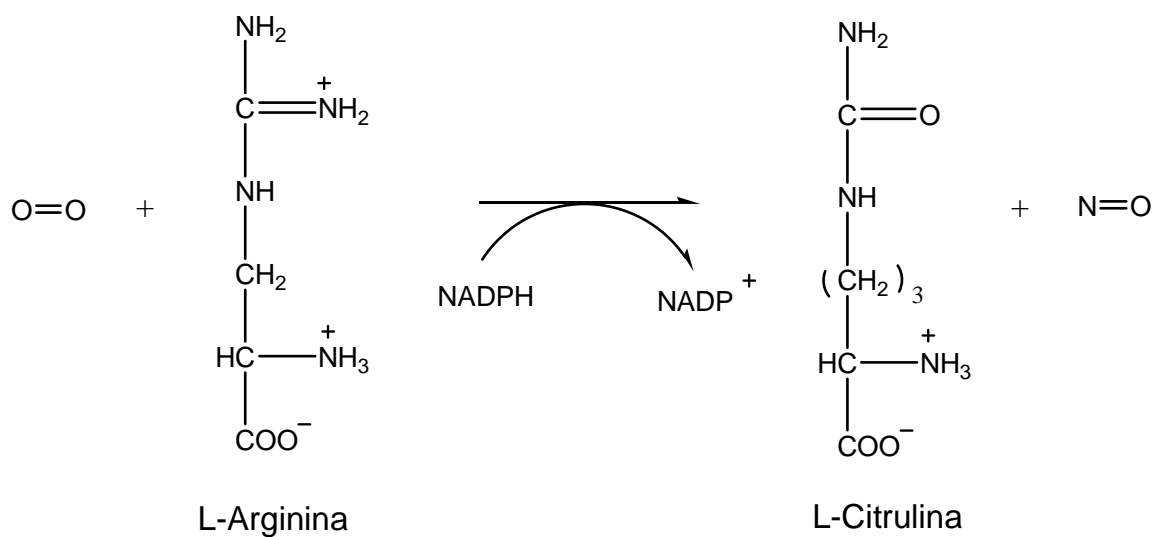
O óxido nítrico (NO), um gás é neuromodulador das funções do sistema nervoso central (SNC), ele atua como um mensageiro retrógrado, uma vez que, é produzido enzimaticamente em células pós-sinápticas e difunde-se para atuar em células pré-sinápticas (Garthwaite, 1991; O'Dell *et al.*, 1991). Nos neurônios, a síntese de NO é estimulada pelo influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  através da ativação dos receptores glutamatérgicos, preferencialmente receptores NMDA (fig. III. 6) (Prast & Philippu, 2001).



**Fig. III.6** – Ativação da óxido nítrico sintase no cérebro (Campbell, 2000).

O NO é sintetizado pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) que catalisa a conversão da L-arginina em L-citrulina produzindo óxido nítrico como co-produto, em uma reação dependente de NADPH (fig. III. 7) (Garthwaite,1991).

O NO é sintetizado por vários tipos de células, como neurônios, células endoteliais e macrófagos, por uma família de três isoenzimas da NOS: enzima óxido nítrico sintase neuronal (*n*-NOS ou NOS-I), presente nos neurônios, a enzima óxido nítrico sintase induzível (*i*-NOS ou NOS-II), presente em macrófagos, e a enzima óxido nítrico sintase endotelial (*e*-NOS ou NOS-III), presente no endotélio. Ambas as isoformas *n*-NOS e *e*-NOS são denominadas constitutivas e ativadas pelo aumento dos íons  $Ca^{2+}$ , e conseqüente aumento da cálcio-calmodulina. Enquanto que a atividade da forma induzível é expressa em resposta a estímulos patológicos, como microrganismos invasores e é independente da concentração de  $Ca^{2+}$  (Alderton *et al.*, 2001; Mayer & Andrew, 1998).



**Fig. III.7** – Reação de formação do óxido nítrico. A arginina reage com o oxigênio produzindo citrulina e NO. A reação é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase.

### III.4.1 – ÓXIDO NÍTRICO E MEMÓRIA

Muitas evidências demonstram que a síntese de óxido nítrico é fundamental para os processos de plasticidade sináptica (Schuman & Madison, 1991) e formação da memória (Böhme *et al.*, 1993; Ohno *et al.*, 1993; Yamada *et al.*, 1995).

O NO parece modular a liberação de neurotransmissores no cérebro (Prast & Philippu, 2001). Estudos demonstram que a atividade da NOS hipocampal encontra-se aumentada imediatamente depois do aprendizado na esQUIVA inibitória, sugerindo que processos dependentes da NO hipocampal possam contribuir para o aprendizado espacial (Bernabeu *et al.*, 1995).

Existem basicamente cinco linhas de evidências que demonstram o importante papel do NO sobre o aprendizado e memória: Primeiro: a administração de inibidores da NOS, nos estágios de aquisição ou no início da consolidação da memória, produz um déficit no aprendizado de ratos em diferentes tarefas (Baratti & Kopf, 1996; Bernabeu *et al.*, 1995; Calixto *et al.*, 2001; da Cunha *et al.*, 2005; Estall *et al.*, 1993; Fin *et al.*, 1995; Huang & Lee 1995; Kopf *et al.*, 2001; Ohno *et al.*, 1993; Yamada *et al.*, 1995; Zou *et al.*, 1998;); Segundo: o prejuízo de memória induzido por inibidores da NOS é prevenido por injeções de L-arginina (substrato da NOS) em doses que não possuem efeito *per se* sobre a memória (Baratti & Kopf 1996; da Cunha *et al.*, 2005; Huang & Lee 1995; Kopf *et al.*, 2001; Ohno *et al.*, 1993;) ou por doadores de NO (Meyer *et al.*, 1998); Terceiro:

doadores de NO, incluindo L-arginina, facilitam a formação da memória (Fin *et al.*, 1995; Khavandgar *et al.*, 2003; Plech *et al.*, 2003; Zou *et al.*, 1998); Quarto: um ativador da guanilato ciclase-óxido nítrico melhora a memória e antagoniza o prejuízo no aprendizado induzido por escopolamina (Chien *et al.*, 2005); Quinto: ratos desprovidos do gene para *n*-NOS, mas não para *e*-NOS, demonstram prejuízo no desempenho cognitivo (Dere *et al.*, 2001; Kirchner *et al.*, 2004; Weitzdoerfer *et al.*, 2004).

Apesar de estar descrito que receptores NMDA hipocampais, poliaminas e NO isoladamente estão envolvidos nos processos de formação da memória, é pouco conhecida a relação existente entre estes fatores sobre a memória.

---

#### **IV. RESULTADOS**

**Psychopharmacology, 186 (2): 150-8, 2006**

Gustavo Petri Guerra · Carlos Fernando Mello ·  
Patricia Dutra Sauzem · Daiane Bolzan Berlese ·  
Ana Flávia Furian · Zuleica Tabarelli ·  
Maribel Antonello Rubin

## Nitric oxide is involved in the memory facilitation induced by spermidine in rats

Received: 27 July 2005 / Accepted: 26 February 2006  
© Springer-Verlag 2006

**Abstract** *Rationale:* Spermidine (SPD) is an endogenous polyamine that modulates *N*-methyl-D-aspartate receptor functions, which has been reported to facilitate memory formation. *Objectives:* In the current study, we investigated the involvement of nitric oxide in the facilitatory effect of SPD on the memory of adult male Wistar rats in the inhibitory avoidance task. *Results:* The coadministration of the nonspecific NOS inhibitor *N*<sup>G</sup> nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) (0.1 nmol, intrahippocampus) with spermidine (0.2 nmol), immediately after training, prevented the memory improvement caused by spermidine in the avoidance inhibitory task. Spermidine increased nitrite and nitrate levels (NO<sub>x</sub>) in the hippocampus 30 min after its administration, and L-NAME coinjection prevented the stimulatory effect of spermidine on NO<sub>x</sub> levels. The systemic injection of 7-nitroindazole (30 mg/kg, i.p.), 30 min before training, impaired memory and did not prevent spermidine-induced increase of NO<sub>x</sub> levels in the hippocampus. *Conclusions:* These results suggest that memory enhancement by spermidine is prevented by the nonspecific nitric oxide synthase inhibitor L-NAME.

**Keywords** Nitric oxide · Memory · L-NAME · 7-NI · Inhibitory avoidance · Spermidine · Polyamines

### Introduction

Polyamines are a group of aliphatic amines with a polycationic structure, carrying a positive charge on each nitrogen atom at physiological pH, which are present at high concentrations in the brain (Carter 1994). Electrophysiological and neurochemical evidence suggests that polyamines modulate *N*-methyl-D-aspartate (NMDAR) (Ransom and Stec 1988; Williams et al. 1991; Rock and MacDonald 1995; Williams 1997) and  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate receptors (Pellegrini-Giampietro 2003), but pharmacological evidence indicates that modulation of NMDA receptor functions by polyamines is particularly relevant (Cebere et al. 2002; Gibson et al. 2002; Mayer et al. 2002; Gibson et al. 2003; Mikolajczak 2003; Ran et al. 2003; Tadano et al. 2004).

It has been suggested that polyamines, in fact, modulate learning and memory by interacting with the polyamine binding site at the NMDA receptor (Shimada et al. 1994; Izquierdo and Medina 1997; Kishi et al. 1998a,b; Rubin et al. 2000, 2001, 2004). Spermidine (SPD 0.02–20 nmol) improves memory of the inhibitory avoidance (Rubin et al. 2000, 2001; Berlese et al. 2005) and fear conditioning (Rubin et al. 2004) tasks when injected into the hippocampus and basolateral amygdala, respectively. Accordingly, the NMDAR polyamine site antagonist, arcaine (Reynolds 1990; Araneda et al. 1999) impairs memory and prevents the facilitatory effect of spermidine on memory (Rubin et al. 2000, 2001, 2004). It has also been shown that the facilitatory effect of spermidine on memory is restricted to the acquisition and early consolidation phases of memory because late consolidation and retrieval are not affected by SPD (Berlese et al. 2005). Because the time dependency of the effects of SPD on memory is quite similar to that of NMDA antagonists (Berlese et al. 2005) and there is neurochemical (Sharma and Reynolds 1999) and electrophysiological (Rock and Macdonald 1992) evidence implying the NMDAR as a putative site of action for polyamines, it is rather possible that SPD improves memory by activating cellular mechanisms downstream from the

G. P. Guerra · P. D. Sauzem · D. B. Berlese · M. A. Rubin (✉)  
Departamento de Química,  
Centro de Ciências Naturais e Exatas,  
Laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia,  
Universidade Federal de Santa Maria,  
Santa Maria, RS, Brazil  
e-mail: marubin@mail.ufsm.br  
Tel.: +55-55-32208053  
Fax: +55-55-32208031

C. F. Mello · A. F. Furian · Z. Tabarelli  
Departamento de Fisiologia, Centro de Ciências da Saúde,  
Laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia,  
Universidade Federal de Santa Maria,  
Santa Maria, RS, Brazil

NMDAR, such as nitric oxide (NO) generation (Aarts et al. 2002).

NO is a neurotransmitter gas which is synthesized by the enzyme NO synthase (NOS) in response to NMDAR-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  currents (Prast and Philippu 2001) or PSD-95 activation in the central nervous system (Aarts et al. 2002). NOS catalyzes the conversion of L-arginine to L-citulline, producing NO as a coproduct (Garthwaite 1991) in neurons, endothelial cells, and macrophages by a family of three isoenzymes: a neuronal nitric oxide synthase (*n*-NOS), which is constitutively expressed in neurons and is regulated by  $\text{Ca}^{2+}$ ; a constitutive and  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent type of NOS, which is present in the endothelial cells (*e*-NOS) of the vasculature; and an inducible  $\text{Ca}^{2+}$ -independent NOS (*i*-NOS), which is expressed upon induction by cytokines in macrophages (Mayer and Andrew 1998). The hippocampus expresses both *e*-NOS and *n*-NOS, but data regarding the expression of *i*-NOS in nonpathological situations in the hippocampus are conflicting (Liu et al. 2003). Increased *n*-NOS and *e*-NOS expression has been associated to hippocampal function improvement by estrogens (Grohe et al. 2004), and hippocampal NOS activity increases immediately after inhibitory avoidance learning (Bernabeu et al. 1995). These findings are in agreement with the view that NO modulates neurotransmitter release in the brain (Prast and Philippu 2001) and may also underlie activity-dependent changes during synaptic strength, which have been implicated in learning and memory (Izquierdo and Medina 1995; Hölscher 1997; Susswein et al. 2004).

There are basically five lines of evidence supporting a role for NO in learning and memory. First, NOS inhibitors administration before acquisition or at the early, but not at late stages of memory consolidation, impairs the memory of various tasks in rodents (Estall et al. 1993; Ohno et al. 1993; Bernabeu et al. 1995; Fin et al. 1995; Huang and Lee 1995; Yamada et al. 1995; Baratti and Kopf 1996; Zou et al. 1998; Kopf et al. 2001; Calixto et al. 2001; da Cunha et al. 2005). Second, the cognitive impairment induced by NOS inhibitors is prevented by the injection of L-arginine, the NOS substrate, at doses that have no effect on memory per se (Ohno et al. 1993; Huang and Lee 1995; Baratti and Kopf 1996; Kopf et al. 2001; da Cunha et al. 2005) or by NO donors (Meyer et al. 1998). Because the NOS inhibitors used in these studies are competitive, the reversal

of their deleterious effect on memory by the NOS substrate is particularly elegant, from the biochemical point of view (but see Roehrs et al. 2004). Third, NO donors, including L-arginine, facilitate memory formation (Fin et al. 1995; Zou et al. 1998; Khavandgar et al. 2003; Plech et al. 2003) and antagonize age-related memory deficits (Pitsikas et al. 2005). It is interesting to note that memory facilitation induced by L-arginine is prevented by L-NAME, a nonspecific NOS inhibitor (Plech et al. 2003). Fourth, a nitric oxide-guanylate cyclase activator enhances learning behavior and antagonizes scopolamine-induced learning impairment (Chien et al. 2005). Fifth, mice, lacking the gene for *n*-NOS but not for *e*-NOS, show impaired cognitive performance (Dere et al. 2001; Kirchner et al. 2004; Weitzdoerfer et al. 2004). Although the polyamine's effects on memory seem to be linked to the NMDAR, up to now, no study has addressed if these effects involve NO production. Therefore, in this study, we investigated whether NOS inhibitors alter memory facilitation caused by intrahippocampal spermidine in rats.

## Materials and methods

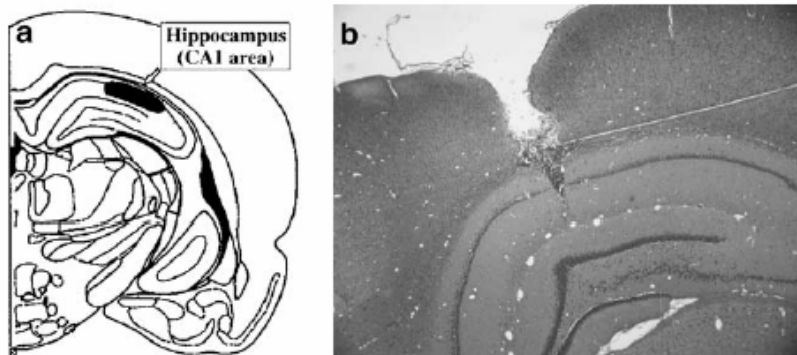
### Animals

A total of 298 experimentally naive male Wistar rats (230–250 g), from the animal house of the Federal University of Santa Maria, housed five to a cage on a natural day/night cycle at a temperature of 21°C with free access to water and standard laboratory chow (Guabi, Santa Maria, RS, Brazil) ad libitum were used. 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).

### Experiment 1

To define the highest dose of L-NAME (intrahippocampus) that would not impair memory per se but that could be able to prevent the facilitatory effect of spermidine on subsequent experiments, a dose–effect determination

**Fig. 1** **a** Drawing adapted from Paxinos and Watson (1986) showing the area (*black*) where the infusions were considered correctly placed. **b** Micrograph (40×) showing the lesion caused by the cannula and injection needle in the dorsal hippocampus. Note that infusions were bilateral





curve for L-NAME was performed. L-NAME doses (0.001–0.1 nmol) were selected based on previous studies (Royes et al. 2005).

Rats were implanted under thiopentobarbital anesthesia (30 mg/kg, i.p.) with two 27-gauge guide cannulae which were aimed 1 mm above the CA1 region of the dorsal hippocampus (Fig. 1) at the A, 4 mm; L, 3.0 mm; V, 2.0 mm coordinates of the Atlas of Paxinos and Watson (1986). Immediately after the surgical procedure, stylets were introduced into the cannulae to prevent bacterial contamination and maintain their patency.

One week after surgery, the animals were subjected to a single training session in a step-down inhibitory avoidance apparatus, which consisted of a 25×25×35-cm box with a grid floor whose left portion was covered by a 7×25-cm platform, 2.5 cm high. The rat was placed gently on the platform facing the rear left corner, and when the rat stepped down with all four paws on the grid, a 3-s 0.4-mA shock was applied to the grid. Immediately after training, a 0.5 µl/side over 1 min of vehicle [100 nmol phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4] or *N*<sup>G</sup> Nitro-L-arginine-methyl ester (L-NAME; Sigma, Saint Louis, MO) (0.001–0.1 nmol/hippocampus) was bilaterally injected into the hippocampus of the animals.

The animals were not previously adapted to the microinjection procedure. The injections were performed using a 30-gauge needle that fitted into the guide cannula, with the tip of the infusion needle protruding 1.0 mm beyond that of the guide cannula and, therefore, aimed at CA1 in the dorsal hippocampus. After the infusions were completed, the injector needles were left in place for an additional 30 s. After the injections, they were returned to their home cage and tested for retention 24 h later.

Test step-down latency was taken as a measure of retention, and a cut-off time of 300 s was established. Immediately after the inhibitory avoidance test session, the animals were transferred to an open-field measuring 56×40×30 cm, with the floor divided into 12 squares measuring 12×12 cm each. The open-field session lasted for 5 min and during this time, an observer, who was not aware of the pharmacological treatments, recorded the number of crossing responses and rearing responses manually. This test was carried out to identify motor disabilities, which might influence inhibitory avoidance performance at testing. Injection placements were histologically verified, as described elsewhere (Rubin et al. 1997). Only data from the animals with correct cannula placement were analyzed.

Statistical analysis of test step down latencies was carried out by Kruskal–Wallis test. Crossing and rearing responses were analyzed by one-way ANOVA. Differences were considered significant when  $p < 0.05$ .

## Experiment 2

Once determined that L-NAME at the dose of 0.1 nmol (intra-hippocampus) did not alter memory per se, we tested whether this dose of L-NAME reverted the facilitatory

effects of spermidine (0.2 nmol, intrahippocampus). The experimental protocol used was the same described above, except that immediately after training, the animals received a single bilateral injection of vehicle [100 nmol phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4], L-NAME (0.1 nmol/hippocampus), *N*-[3-aminopropyl]-1,4-butanediamine trihydrochloride (spermidine; Sigma, Saint Louis, MO, USA) (0.2 nmol/hippocampus), or L-NAME (0.1 nmol/hippocampus) plus spermidine (0.2 nmol/hippocampus). The dose of spermidine of 0.2 nmol/hippocampus was selected because it improves memory of the inhibitory avoidance task (Rubin et al. 2000).

The test session was carried out 24 h after training and, immediately after the test, the animals were subjected to the open field test and histological examination, as described above. Statistical analysis of test step-down latencies was carried out by the Scheirer–Ray–Hare extension of the Kruskal–Wallis test (nonparametric two-way ANOVA). Differences were considered significant when  $p < 0.05$ .

## Experiment 3

To test the involvement of *n*-NOS in the memory facilitation induced by spermidine, we decided to test whether the specific *n*-NOS inhibitor 7-nitroindazole 7-NI; Sigma, Saint Louis, MO, USA) prevented spermidine effects. First, a dose–effect determination curve for 7-NI was performed to find out the highest dose of the *n*-NOS inhibitor that had no effect on memory per se.

The animals were injected with 7-NI (1–30 mg/kg, i.p.) or vehicle (sunflower oil), 30 min before training. The drug dose and administration parameters were selected because they block spatial learning (Hölscher et al. 1996) and produce 85% inhibition of *n*-NOS activity (Mackenzie et al. 1994). In addition 7-NI doses higher than 30 mg/kg cause antinociception (Moore et al. 1993).

The test session was carried out 24 h after training and, immediately after the test, the animals were subjected to the open-field test and histological examination, as described above. Statistical analysis of test step-down latencies was carried out by one-way ANOVA. Differences between means were considered significant when  $p < 0.05$ .

## Experiment 4

The involvement of *n*-NOS in the facilitatory effects of spermidine on memory was tested by administrating vehicle (sunflower oil) or 7-NI (30 mg/kg, i.p.) 30 min before training and, immediately after training, with 0.5 µl of vehicle [100 nmol phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4] or spermidine (0.2 nmol/hippocampus). The test session was carried out 24 h after training and, immediately after the test, the animals were subjected to the open-field test and histological examination, as described above. Statistical analysis of test step-down latencies was carried out by the Scheirer–Ray–Hare extension of the Kruskal–

Wallis test (nonparametric two-way ANOVA). Differences were considered significant when  $p < 0.05$ .

### Experiment 5

Nitrite and nitrate ( $\text{NO}_x$ ) levels, that are the end products of NO conversion, were measured in the hippocampi of animals subjected to the protocol of injection of NOS inhibitors and spermidine described above. The experimental protocol used was essentially the same as described in “Experiment 2” and “Experiment 4”, except that the animals were killed 30 min after the injections. Rats were killed by decapitation, and the hippocampi were rapidly dissected on ice and homogenized in 500  $\mu\text{l}$  of 200 mM  $\text{ZnSO}_4$  plus 500  $\mu\text{l}$  of 96% acetonitrile. The samples were centrifuged at  $3,000 \times g$  at  $4^\circ\text{C}$  for 30 min and the supernatants were used for the assays. The resulting pellet was suspended in NaOH (3 M) for protein determination according to the method of Bradford (1976) with bovine serum albumin as the standard.  $\text{NO}_x$  content in the supernatant was estimated in a medium containing 400  $\mu\text{l}$  of 2%  $\text{VCl}_3$  (in 5% HCl), 200  $\mu\text{l}$  of 0.1% *N*-(1-naphthyl) ethylene-diamine dihydrochloride, 200  $\mu\text{l}$  of 2% sulfanilamide (in 5% HCl). After incubating at  $37^\circ\text{C}$  for 60 min, nitrite levels were determined spectrophotometrically at 540 nm, based on the reduction of nitrate to nitrite by  $\text{VCl}_3$  (Miranda et al. 2001). Tissue nitrite and nitrate levels were expressed as nanomole of  $\text{NO}_x$ /milligram of protein. Statistical analysis of  $\text{NO}_x$  content was carried out by a two-way ( $2 \times 2$ ) ANOVA. Differences between means were considered significant when  $p < 0.05$ .

## Results

### Experiment 1

Table 1 shows the effect of the intrahippocampal injection of L-NAME (0.001–0.1 nmol) immediately after training on test step-down latencies. Statistical analysis (Kruskal–Wallis test) revealed that L-NAME did not alter step-down latencies at testing ( $H$  value shown in the table). Table 1 also shows the effect of L-NAME on the exploratory behavior in an open field, immediately after the inhibitory avoidance testing session. Statistical analysis of open-field data (one-way ANOVA) revealed that L-NAME injection did not alter the number of crossing or rearing responses in a subsequent open-field testing session ( $F$  values shown in the table), suggesting that its injection, immediately after training, did not cause gross motor disabilities at testing. The dose of L-NAME to be used in the subsequent experiments (0.1 nmol) was chosen based on its lack of effect on memory per se in this experiment, and because this dose of L-NAME prevented the convulsions and oxidative damage induced by methylmalonic acid, a neurotoxic organic acid whose mechanism of action involves NMDAR activation (Royes et al. 2005).

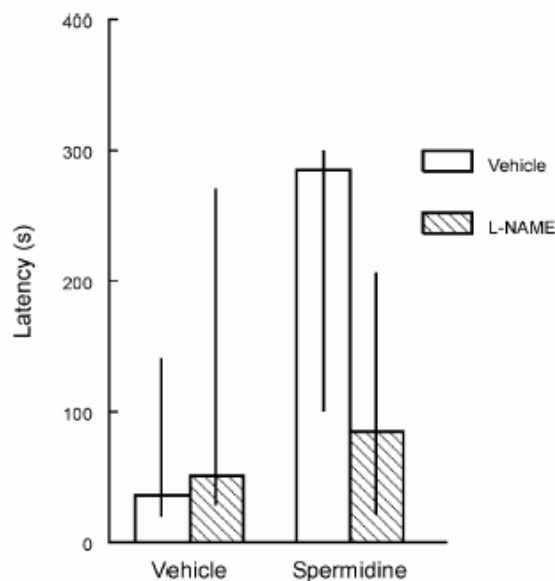
**Table 1** Effect of intrahippocampal L-NAME (0.001–0.1 nmol) administered immediately after training on the inhibitory avoidance task performance of rats (measured as the test step-down latency) and on the behavior of rats (number of crossing and rearing responses) in the open field immediately after the inhibitory avoidance testing session

Group	Step down latency (s)	Crossing	Rearing	<i>N</i>
PBS (100 nmol)	85 (15–300)	23.3±6.0	6.7±2.4	10
L-NAME (0.001 nmol)	126 (15–298)	13.2±4.6	4.0±1.6	8
L-NAME (0.01 nmol)	40 (15–253)	14.1±5.0	5.7±1.5	8
L-NAME (0.1 nmol)	116 (31–300)	12.5±4.1	4.5±1.1	9
Statistical analysis	$H(3)=1.05$ , $p > 0.05$	$F_{3,31}=0.93$ , $p > 0.05$	$F_{3,31}=0.45$ , $p > 0.05$	

Data are median (interquartile ranges) or means±SEM  
*N* number of animals in each group

### Experiment 2

Figure 2 shows the effect of the intrahippocampal administration of L-NAME (0.1 nmol), spermidine (0.2 nmol), and their coadministration immediately after training on step-down latencies at testing. Statistical analysis (nonparametric two-way ANOVA) showed a significant spermidine or PBS vs L-NAME or PBS interaction [ $H(1)=4.56$ ;  $p < 0.05$ ], revealing that the coinjection of the nonspecific NOS inhibitor prevented the memory facilitation induced by spermidine. These results suggest that memory improvement induced by spermidine



**Fig. 2** Coadministration of L-NAME (0.1 nmol, intrahippocampus) immediately after training prevents the memory improvement induced by spermidine (0.2 nmol). Phosphate-buffered saline (200 mM), pH 7.4 was used as vehicle. Data are median+interquartile ranges for 15–18 animals in each group

**Table 2** Effect of the immediately after training intrahippocampal coadministration of L-NAME (0.1 nmol) and/or spermidine (SPD, 0.2 nmol) on the behavior of rats in the open field immediately after the inhibitory avoidance testing session

Group	Crossing	Rearing	N
PBS/PBS	27.6±3.4	6.4±1.3	15
PBS/SPD	29.2±3.8	9.2±1.2	18
L-NAME/PBS	29.4±3.5	7.0±1.4	16
L-NAME/SPD	21.2±3.4	5.3±1.0	17
Statistical analysis			
Interaction	$F_{1,62}=1.84, p>0.05$	$F_{1,62}=3.26, p>0.05$	
Polyamine factor	$F_{1,62}=0.37, p>0.05$	$F_{1,62}=0.19, p>0.05$	
NOS inhibitor factor	$F_{1,62}=0.72, p>0.05$	$F_{1,62}=1.63, p>0.05$	

Data are means±SEM  
N number of animals in each group

depends on NO formation. Table 2 shows the effect of L-NAME, spermidine, and of their coadministration on the exploratory behavior in an open field immediately after the inhibitory avoidance testing session. Statistical analysis of open-field data (two-way ANOVA) revealed that pharmacological treatment did not alter the number of crossing or rearing responses in a subsequent open-field testing session ( $F$  values shown in the table), suggesting that none of the compounds tested caused gross motor disabilities at testing.

### Experiment 3

Table 3 shows the effect of the systemic administration of 7-NI (1–30 mg/kg, i.p.) or vehicle (sunflower oil), 30 min before training, on the test step-down latencies. Statistical analysis (Kruskal–Wallis test) revealed that 7-NI did not modify test step-down latencies ( $H$  value shown in the table). Table 3 also shows that 7-NI did not alter the exploratory behavior in an open field, a test performed immediately after the inhibitory avoidance testing session ( $F$  values shown in the table). These results suggest that 7-NI injection, 30 min before training, did not cause gross motor disabilities at testing.

### Experiment 4

The effect of the before training administration of 7-NI (30 mg/kg, i.p.) on the promnesic effect of spermidine is shown in Fig. 3. Statistical analysis (nonparametric two-way ANOVA) showed only a significant effect of pretreatment [oil or 7-NI,  $H(1)=4.95; p<0.05$ ], revealing that 7-NI impaired memory per se in this experiment. Table 4 shows the effect of 7-NI, spermidine and of their association on the exploratory behavior in an open field immediately after the inhibitory avoidance testing session. Statistical analysis of open-field data (two-way ANOVA) revealed that neither the compounds alone, nor their association altered the number of crossing or rearing

**Table 3** Effect of 7-NI (1–30 mg/kg, i.p.) 30 min before training on the inhibitory avoidance task performance of adult rats (measured as the test step-down latency) and on the behavior of rats (number of crossing and rearing responses) in the open field immediately after the inhibitory avoidance testing session

Group	Latency (s)	Crossing	Rearing	N
OIL	94 (16–300)	24.4±3.1	7.6±1.7	15
7-NI (1 mg/kg)	32 (9–300)	25.0±4.0	12.0±1.6	15
7-NI (10 mg/kg)	17 (11–300)	23.1±3.3	8.4±1.3	15
7-NI (30 mg/kg)	29 (15–300)	20.3±2.9	7.0±1.2	15
Statistical analysis	$H(3)=1.46, p>0.05$	$F_{3,56}=0.38, p>0.05$	$F_{3,56}=2.20, p>0.05$	

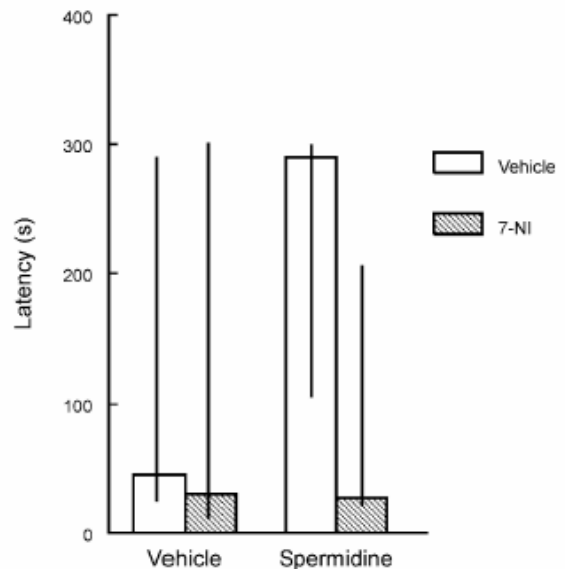
Data are median (interquartile ranges) or means±SEM  
N number of animals in each group

responses in a subsequent open-field testing session ( $F$  values shown in the table).

### Experiment 5

Figure 4 shows the hippocampal levels of  $\text{NO}_x$  after the intrahippocampal administration of L-NAME (0.1 nmol) plus spermidine (0.2 nmol) immediately after training. Statistical analysis (two-way ANOVA) revealed a significant cotreatment (L-NAME or PBS) by treatment (SPD or PBS) interaction [ $F(1,23)=8.10, p<0.01$ ], indicating that the administration of L-NAME prevented the  $\text{NO}_x$  increase induced by spermidine.

Figure 5 shows the hippocampal levels of  $\text{NO}_x$  after the systemic administration of 7-NI (30 mg/kg) 30 min before



**Fig. 3** 7-NI (30 mg/kg, i.p. 30 min before training) impairs memory. Data are median±interquartile ranges for 15 animals in each group. Phosphate-buffered saline (200 mM), pH 7.4 was the vehicle for spermidine. Sunflower oil was the vehicle for 7-NI

**Table 4** Effect of 7-NI (30 mg/kg, i.p., 30 min before training) and spermidine (SPD, 0.2 nmol, intrahippocampus, immediately after training) on the behavior of rats in the open field immediately after the inhibitory avoidance testing session

Group	Crossing	Rearing	N
OIL/PBS	16.1±2.7	5.8±1.0	15
OIL/SPD	14.0±4.5	5.2±1.3	15
7-NI/PBS	19.1±4.0	8.2±2.0	15
7-NI/SPD	13.4±2.5	6.0±1.4	15
Statistical analysis			
Interaction	$F_{1,56}=0.24, p>0.05$	$F_{1,56}=0.25, p>0.05$	
Polyamine factor	$F_{1,56}=1.17, p>0.05$	$F_{1,56}=0.79, p>0.05$	
NOS inhibitor factor	$F_{1,56}=0.12, p>0.05$	$F_{1,56}=1.04, p>0.05$	

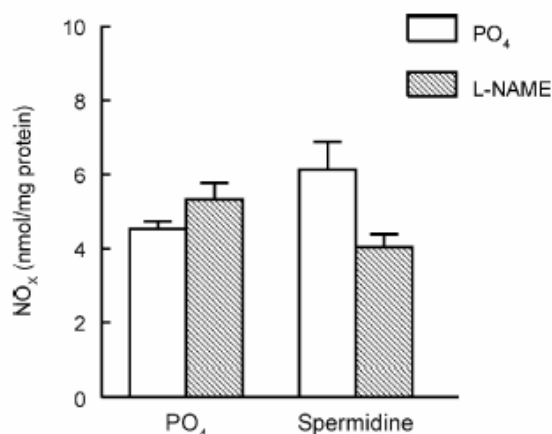
Data are mean±SEM

N number of animals in each group

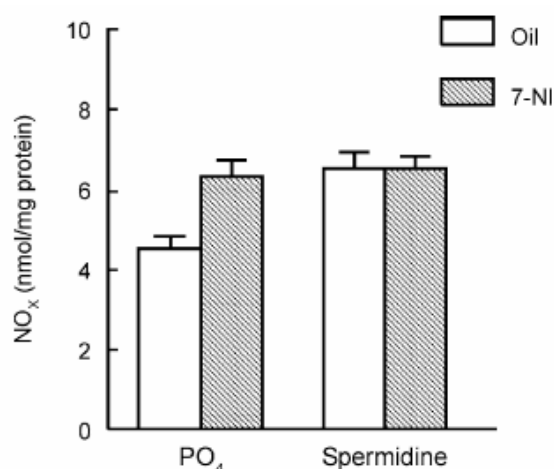
training and/or spermidine (0.2 nmol) immediately after training. Statistical analysis (two-way ANOVA) revealed a significant effect of treatment [PBS or SPD:  $F(1,46)=5.0, p<0.03$ ], and a tendency towards an effect of pretreatment [oil or 7-NI:  $F(1,46)=3.49; p=0.068$ ]. These results confirm the stimulatory effect of SPD on NO<sub>x</sub> levels, and reveal a tendency of systemic 7-NI to paradoxically increase nitrate levels in the hippocampus.

## Discussion

In this study, we showed that L-NAME, a nonselective inhibitor of NOS, prevent the facilitatory effects of intrahippocampal administration of SPD on memory. The intrahippocampal injection of L-NAME prevented SPD-induced increase of hippocampal NO<sub>x</sub> levels. The systemic injection of 7-NI, a NOS inhibitor that has been considered more selective for the neuronal subtype (Hölscher et al. 1996, but see Alderton et al. 2001), caused memory



**Fig. 4** Coadministration of L-NAME (0.1 nmol, intrahippocampus) immediately after training prevents the increase of NO<sub>x</sub> levels induced by spermidine (0.2 nmol). Phosphate-buffered saline (PO<sub>4</sub>)(200 mM), pH 7.4 was the vehicle for L-NAME. Data are mean±SEM for six to seven animals in each group



**Fig. 5** 7-NI (30 mg/kg, i.p.) does not alter spermidine (0.2 nmol)-induced increase of NO<sub>x</sub> levels in the hippocampus. Phosphate-buffered saline (PO<sub>4</sub>)(200 mM), pH 7.4 was the vehicle for spermidine. Sunflower oil was the vehicle for 7-NI. Data are mean±SEM for 13–14 animals in each group

impairment in one of our experiments, and tended to paradoxically increase hippocampal NO<sub>x</sub> levels. We also showed that all pharmacological treatment used in the present study did not alter locomotor behavior at testing, suggesting that the behavioral effects currently reported cannot be attributed to possible unspecific motor effects.

The reversal of the facilitatory effects of the intrahippocampally injected spermidine on step-down inhibitory avoidance by an intrahippocampally administered nonspecific NOS inhibitor has interesting implications. The first is that it suggests that the synthesis of NO in the hippocampus as a mechanism for the facilitatory effects of spermidine on memory. This is corroborated by the demonstration that spermidine increases NO<sub>x</sub> production, and that coadministration of L-NAME prevents spermidine effects on nitrate levels (Fig. 4). Second, it constitutes experimental evidence against the inhibition of NOS as a possible mechanism of action for polyamines on memory (Hu et al. 1994) because spermidine increased NO<sub>x</sub> production and improved memory. In fact, our data support exactly the opposite, i.e., that memory improvement induced by intrahippocampal spermidine is related to increased NOS activity and NO production. As pointed out before (see the “Introduction” section), a significant number of studies have shown that NOS inhibitors impair or have no effect (Maren 1998; Johnson et al. 2000; Vanaja and Ekambaram 2004) on memory acquisition, consolidation, and retrieval but to our knowledge, no study has unequivocally described memory improvement by NOS inhibitors (see the results obtained with 7-NI, below).

Once determined that the hippocampal NOS activity was involved in the facilitatory effects of spermidine on memory, we tried to determine the NOS isoform mediating such an effect. The systemic injection of 7-NI, at a dose reported to cause 85% inhibition of n-NOS activity (Mackenzie et al. 1994, but see Alderton et al. 2001 and Watts et al. 2005), impaired memory. In fact, although 7-NI

had no effect on memory in the experiment that determined the dose to be used in the other experiments, it caused a significant deleterious effect on memory in the experiment that investigated whether NOS inhibitors alter the facilitatory effect of spermidine on memory. This confirms the view that NOS inhibitors have deleterious effects on memory. Spermidine increased NO<sub>x</sub> levels in the hippocampi in this experiment, replicating the results of the experiment with L-NAME. Surprisingly, however, the systemic administration of 7-NI tended to increase hippocampal NO<sub>x</sub> levels. Regarding this point, it is important to mention that a recent study has described that the infusion of 7-NI or L-NAME paradoxically increases nitrite production in the hippocampus (Watts et al. 2005). The same study has also shown that the infusion of 7-NI causes a biphasic long-lasting increase in nitrite production, which is maintained for 2 h after its removal from the infusing dialysis solution. Our results agree with the results of Watts et al. (2005) because we found increased levels of NO<sub>x</sub> after systemic 7-NI administration. According to that study, L-NAME does not cause such a long-lasting increase in NO production because nitrite production decreases as infusion stops and, importantly, the infusion of L-NAME decreases NMDA-induced nitrite production below basal levels. This indicates that L-NAME may revert NMDA-induced nitrite production, although it may cause increase in NO levels when injected alone. Our results are, again, in agreement with the data Watts et al. because the intrahippocampal infusion of L-NAME (0.1 nmol) was able to fully prevent the nitrite production induced by spermidine coinjection, although we did not find a significant increase in nitrate levels in the hippocampi of animals injected only with L-NAME.

Considering the discussion above and the fact that 7-NI present similar IC<sub>50</sub> for iNOS, nNOS, and eNOS (Alderton et al. 2001), a finding that questions whether 7-NI is a selective nNOS inhibitor, one must interpret all the results obtained with NOS inhibitors with caution. However, based on the different protocols of 7-NI and L-NAME administration in this study, we may speculate about possible mechanisms underlying the differential effect of both NOS inhibitors on memory and nitrite production.

Our results support that the systemic injection of 7-NI (30 mg/kg) impairs memory and that such an effect is not due to a decrease of NO production in the hippocampus. Although we do not have experimental evidence for other effects of 7-NI in these animals, it is possible that the currently reported effects of 7-NI are due to an action on a system other than the nitric system, or on cerebral structures other than the hippocampus. Regarding this point, it is worth pointing out that Maren (1998) has proposed that 7-NI's lack of effect on context conditioning may be related to its differential ability to inhibit LTP in different hippocampal regions, to the presence of multiple form of NOS, or because context conditioning can be acquired in the absence of the hippocampus. On the other hand, the injection of L-NAME into the hippocampus prevented both SPD-induced NO<sub>x</sub> increase and promnesic effects. If we assume that an action at other cerebral

structures is less probable when the intrahippocampal injection protocol is adopted, we may suggest that the results reported in this study indicate that SPD effects on memory are linked to the activation of nitric mechanisms in the hippocampus. It is also worth mentioning that the protocol of coinjection of the drugs in the same solution in the hippocampus can proportionate pharmaceutical interactions. Although L-NAME and spermidine are chemically stable compounds, we cannot rule out the possibility that some other pharmaceutical interaction may have contributed to the effects reported in this study.

In summary, in this study, we show that memory-facilitating effects of spermidine seems to depend on hippocampal NOS activity, and that the intrahippocampal administration of an inhibitor of NOS, at a dose that causes no effect on memory per se, prevents the facilitatory effect of hippocampally administered spermidine. Our results suggest that the participation of NOS in the facilitatory effect of spermidine on the memory of the inhibitory avoidance task. However, further studies are necessary to clarify the paradox of the stimulatory effects of 7-NI on NO<sub>x</sub> production, and the mechanisms by which this compound impairs memory.

**Acknowledgements** This study was supported by CNPq (500096/2003-1 and 500120/2003-0), PIBIC/CNPq-UFSM, CAPES and FAPERGS (01/1338.9). The authors thank Dr. Dominguita L. Graça for providing laboratory facilities.

## References

- Aarts M, Liu Y, Liu L, Besshoh S, Arundine M, Gurd JW, Yu-Tian Wang, Salter MW, Tymianski M (2002) Treatment of ischemic brain damage by perturbing NMDA receptor-PSD-95 protein interactions. *Science* 298:846–850
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357:593–615
- Araneda RC, Lan J-Y, Zheng X, Zukin SR, Bennett MVL (1999) Spermine and arcaine block and permeate *N*-methyl-D-aspartate receptor channels. *Biophys J* 76:2899–2911
- Baratti CM, Kopf SR (1996) A nitric oxide synthase inhibitor impairs memory storage in mice. *Neurobiol Learn Mem* 65:197–201
- Berlese DB, Sauzem PD, Carati MC, Guerra GP, Stiegemeier IA, Mello CF, Rubin MA (2005) Time-dependent modulation of inhibitory avoidance memory by spermidine in rats. *Neurobiol Learn Mem* 83:48–53
- Bernabeu R, De Stein MI, Fin C, Izquierdo I, Medina JH (1995) Role of hippocampal NO in the acquisition and consolidation of inhibitory avoidance learning. *Neuroreport* 6:1498–1500
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Calixto AV, Vandresen N, De Nucci G, Moreno H, Faria MS (2001) Nitric oxide may underlie learned fear in the elevated T-maze. *Brain Res Bull* 55: 37–42
- Carter C (1994) The neuropharmacology of polyamines. Academic, London
- Cebere A, Cebere G, Wagner A, Liljequist S (2002) Spermidine attenuates the inhibitory effect of ethanol on NMDA-induced neurotoxicity. *NS Arch Pharmacol* 366:117–122

- Chien WL, Liang KC, Teng CM, Kuo SC, Lee FY, Fu WM (2005) Enhancement of learning behaviour by a potent nitric oxide-guanylate cyclase activator YC-1. *Eur J Neurosci* 21:1679–1688
- da Cunha IC, José RF, Pereira LO, Pimenta JA, Oliveira de Souza IA, Reiser R, Moreno H Jr, Marino J Neto, Paschoalini MA, Faria MS (2005) The role of nitric oxide in the emotional learning of rats in the plus-maze. *Physiol Behav* 84:351–358
- Dere E, Frisch C, de Souza Silva MA, Gödecke A, Schrader J, Huston JP (2001) Unaltered radial maze performance and brain acetylcholine of the endothelial nitric oxide synthase knockout mouse. *Neuroscience* 107:561–570
- Estell LB, Grant SJ, Cicala G (1993) Inhibition of nitric oxide (NO) production selectively impairs learning and memory in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 46:959–962
- Fin C, Da Cunha C, Bromberg E, Schimitsz PK, Bianchin M, Medina JH, Izquierdo I (1995) Experiments suggesting a role for nitric oxide in the hippocampus in memory process. *Neurobiol Learn Mem* 63:113–115
- Garthwaite J (1991) Glutamate, nitric oxide and cell–cell signaling in the nervous system. *Trends Neurosci* 14:60–68
- Gibson DA, Harris BR, Rogers DT, Littleton JM (2002) Radioligand binding studies reveal agmatine is a more selective antagonist for a polyamine-site on the NMDA receptor than arcaine or ifenprodil. *Brain Res* 952:71–77
- Gibson DA, Harris BR, Prendergast MA, Hart SR, Blanchard JA, Holley RC, Pedigo NW, Littleton JM (2003) Polyamines contribute to ethanol withdrawal-induced neurotoxicity in rat hippocampal slice cultures through interactions with the NMDA receptor. *Alcohol Clin Exp Res* 27:1099–1106
- Grohe C, Kann S, Fink L, Djoufack PC, Paehr M, van Eickels M, Vetter H, Meyer R, Fink KB (2004) 17 Beta-estradiol regulates nNOS and eNOS activity in the hippocampus. *Neuroreport* 15:89–93
- Hölscher C, McGlinchey L, Anwyl R, Rowan MJ (1996) 7-Nitroindazole, a selective neuronal nitric oxide synthase inhibitor in vivo, impairs spatial learning in the rat. *Learn Memory* 2:267–278
- Hölscher C (1997) Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 20:298–303
- Hu J, Mahmoud MI, El-Fakahany EE (1994) Polyamines inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. *Neurosci Lett* 175:41–45
- Huang AM, Lee EH (1995) Role of hippocampal nitric oxide in memory retention in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 50:327–332
- Izquierdo I, Medina JH (1995) Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. *Neurobiol Learn Mem* 63:19–32
- Izquierdo I, Medina JH (1997) Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem* 63:285–316
- Johnson DM, Baker JD, Azorlosa JL (2000) Acquisition, extinction, and reinstatement of Pavlovian fear conditioning: the roles of the NMDA receptor and nitric oxide. *Brain Res* 857:66–70
- Khavandgar S, Homayoun H, Zarrindast MR (2003) The effect of L-NAME and L-arginine on impairment of memory formation and state-dependent learning induced by morphine in mice. *Psychopharmacology* 167:291–296
- Kirchner L, Weitzdoerfer R, Hoeger H, Url A, Schmidt P, Engelmann M, Villar SR, Fountoulakis M, Lubec G, Lubec B (2004) Impaired cognitive performance in neuronal nitric oxide synthase knockout mice is associated with hippocampal protein derangements. *Nitric Oxide* 11:316–330
- Kishi A, Ohno M, Watanabe S (1998a) Concurrent activation of hippocampal glycine and polyamine sites of the N-methyl-D-aspartate receptor synergistically reverses working memory deficits in rats. *Neurosci Lett* 257:131–134
- Kishi A, Ohno M, Watanabe S (1998b) 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
- Kopf SR, Benton RS, Kalfin R, Giovannini MG, Pepeu G (2001) NO synthesis inhibition decreases cortical Ach release and impairs retention of a conditioned response. *Brain Res* 894:141–144
- Liu P, Smith PF, Appleton I, Darlington CL, Bilkey DK (2003) Regional variations and age-related changes in nitric oxide synthase and arginase in the sub-regions of the hippocampus. *Neuroscience* 119:679–687
- Mackenzie GM, Rose S, Bland-Ward PA, Moore PK, Jenner P, Marsden CD (1994) Time course of inhibition of brain nitric oxide synthase by 7-nitro-indazole. *Neuroreport* 5:1993–1996
- Maren S (1998) Effects of 7-nitroindazole, a neuronal nitric oxide synthase nNOS inhibitor, on locomotor activity and contextual fear conditioning in rats. *Brain Res* 804:155–158
- Mayer B, Andrew P (1998) Nitric oxide synthases: catalytic function and progress towards selective inhibition. *NS Arch Pharmacol* 358:127–133
- Mayer S, Harris B, Gibson DA, Blanchard J, Prendergast MA, Holley RC, Littleton J (2002) Acamprosate has no effect on NMDA-induced toxicity but reduces toxicity induced by spermidine or by changing the medium in organotypic hippocampal slice cultures from rat. *Alcohol Clin Exp Res* 26:655–662
- Meyer RC, Spangler EL, Patel N, London ED, Ingram DK (1998) Impaired learning in rats in a 14-unit T-maze by 7-nitroindazole, a neuronal nitric oxide synthase inhibitor, is attenuated by the nitric oxide donor, molsidomine. *Eur J Pharmacol* 341:17–22
- Mikolajczak P, Okulicz-Kozaryn I, Kaminska E, Szulc M, Dyr W, Kostowski W (2003) Lack of ifenprodil anxiolytic activity after its multiple treatment in chronically ethanol-treated rats. *Alcohol Alcohol* 38:310–315
- Miranda KM, Espey MG, Wink DA (2001) A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 5:62–71
- Moore PK, Wallace P, Geffen Z, Hart SL, Babbidge RC (1993) Characterization of the novel nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole and related indazoles: antinociceptive and cardiovascular effects. *Br J Pharmacol* 110:219–224
- Ohno M, Yamamoto T, Watanabe S (1993) Deficits in working memory following inhibitory of hippocampal nitric oxide synthesis in the rat. *Brain Res* 632:36–40
- Paxinos G, Watson C (1986) The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic, Sydney, pp 237
- Pellegrini-Giampietro DE (2003) An activity-dependent spermidine-mediated mechanism that modulates glutamate transmission. *Trends Neurosci* 26:9–11
- Pitsikas N, Rigamonti AE, Cella SG, Sakellaris N, Muller EE (2005) The nitric oxide donor molsidomine antagonizes age-related memory deficits in the rat. *Neurobiol Aging* 26:259–264
- Plech A, Klimkiewicz T, Maksym B (2003) Effect of L-arginine on memory in rats. *Pol J Pharmacol* 55:987–992
- Prast H, Philippu A (2001) Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog Neurobiol* 64:51–68
- Ran I, Miura RM, Puil E (2003) Spermine modulates neuronal excitability and NMDA receptors in juvenile gerbil auditory thalamus. *Hear Res* 176:65–79
- Ransom RW, Stec NL (1988) Cooperative modulation of [<sup>3</sup>H] MK-801 binding to the N-methyl-D-aspartate receptor ion channel complex by L-glutamate, glycine, and polyamines. *J Neurochem* 51:830–836
- Reynolds IJ (1990) Arcaine is a competitive antagonist of the polyamine site on the NMDA receptor. *Eur J Pharmacol* 177:215–216
- Rock DM, Macdonald RL (1992) Spermine and related polyamines produce a voltage-dependent reduction of N-methyl-D-aspartate receptor single-channel conductance. *Mol Pharmacol* 42:157–164

- Rock DM, Macdonald RL (1995) Polyamine regulation of *N*-ethyl-D-aspartate receptor channels. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35:463–482
- Roehrs C, Garrido-Sanabria ER, Da Silva AC, Faria LC, Sinhorin VDG, Marques RH, Priel MR, Rubin MA, Cavalheiro EA, Mello CF (2004) Succinate increases neuronal post-synaptic excitatory potentials *in vitro* and induces convulsive behavior through *N*-methyl-D-aspartate-mediated mechanisms. *Neuroscience* 125:965–971
- Royes LF, Figuera MR, Furian AF, Oliveira MS, Fiorenza NG, de Carvalho Myskiw J, Frussa-Filho R, Mello CF (2005) Involvement of NO in the convulsive behavior and oxidative damage induced by the intrastriatal injection of methylmalonate. *Neurosci Lett* 376:116–120
- Rubin MA, Jurach A, Zanolta GR, Boemo RL, Souza DO, Mello CF (1997) Intrahippocampal GMP administration improves inhibitory avoidance performance through GABAergic and glutamatergic mechanisms in rats. *Neuroreport* 8:3713–3716
- Rubin MA, Boemo RL, Jurach A, Rojas DB, Zanolta GR, Obregon ADC, Souza DO, Mello CF (2000) Intrahippocampal spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. *Behav Pharmacol* 11:57–62
- Rubin MA, Stiegemeier JA, Volkweis MA, Oliveira DM, Fenili AC, Boemo RL, Jurach A, Mello CF (2001) Intra-amygdala spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. *Eur J Pharmacol* 423:35–39
- Rubin MA, Berlese DB, Stiegemeier JA, Volkweis MA, Oliveira DM, dos Santos TL, Fenili AC, Mello CF (2004) Intra-amygdala administration of polyamines modulates fear conditioning in rats. *J Neurosci* 24: 2328–2334
- Sharma TA, Reynolds IJ (1999) Characterization of the effects of polyamines on [125I]MK-801 binding to recombinant *N*-methyl-D-aspartate receptors I. *J Pharmacol Exp Ther* 289:1041–1047
- Shimada A, Spangler EL, London ED, Ingram DK (1994) Spermidine potentiates dizocilpine-induced impairment of learning performance by rats in a 14-unit T-maze. *Eur J Pharmacol* 262:293–300
- Susswein AJ, Katzoff A, Miller N, Hurwitz I (2004) Nitric oxide and memory. *Neuroscientist* 10:153–162
- Tadano T, Hozumi S, Yamadera F, Murata A, Nijjima F, Tan-No K, Nakagawasai O, Kisara K (2004) Effects of NMDA receptor-related agonists on learning and memory impairment in olfactory bulbectomized mice. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 26: 93–97
- Vanaja P, Ekambaram P (2004) Demonstrating the dose- and time-related effects of 7-nitroindazole on picrotoxin-induced convulsions, memory formation, brain nitric oxide synthase activity, and nitric oxide concentration in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 77:1–8
- Watts J, Whitton PS, Pearce B (2005) Unexpected effects of nitric oxide synthase inhibitors on extracellular nitrite levels in the hippocampus *in vivo*. *Pharmacology* 74:163–168
- Weitzdoerfer R, Hoeger H, Engidawork E, Engelmann M, Singewald N, Lubec G, Lubec B (2004) Neuronal nitric oxide synthase knock-out mice show impaired cognitive performance. *Nitric Oxide* 10:130–140
- Williams K (1997) Interactions of polyamines with ion channels. *Biochem J* 325:289–297
- Williams K, Romano C, Dichter MA, Molinoff PB (1991) Modulation of the NMDA receptor by polyamines. *Life Sci* 48:469–498
- Yamada K, Noda Y, Nakayama S, Komori Y, Sugihara H, Hasegawa T, Nabeshima T (1995) Role of nitric oxide in learning and memory and in monoamine metabolism in the rat brain. *Br J Pharmacol* 115:852–858
- Zou L-B, Yamada K, Tanaka T, Kameyama T, Nabeshima T (1998) Nitric oxide synthase inhibitors impair reference memory formation in a radial arm maze task in rats. *Neuropharmacology* 37:323–330

---

## V. DISCUSSÃO



No presente estudo, foi avaliado o envolvimento do NO no efeito facilitatório sobre a memória induzido pela administração intra-hipocampal de SPD na tarefa de esquiva inibitória em ratos.

O L-NAME, um inibidor não seletivo da NOS, preveniu o efeito facilitatório da administração intra-hipocampal de SPD sobre a memória de ratos, na tarefa de esquiva inibitória, e preveniu o aumento dos níveis de nitrito e nitrato ( $\text{NO}_x$ ) induzido por SPD. A injeção sistêmica de 7-NI piorou a memória e tendeu, paradoxalmente, a aumentar o nível de  $\text{NO}_x$  hipocampal. Nós também demonstramos que nenhum dos tratamentos farmacológicos usados neste estudo alterou o comportamento locomotor dos animais, sugerindo que os efeitos comportamentais não são atribuídos a possíveis efeitos motores inespecíficos.

A prevenção do efeito facilitatório da memória induzido por SPD na tarefa de esquiva inibitória através da administração intra-hipocampal de L-NAME sugere o aumento da síntese de NO no hipocampo como um possível mecanismo de ação da SPD sobre a melhora da memória. Sendo esta evidência confirmada pelo aumento na produção de  $\text{NO}_x$  induzido por SPD e pela co-administração de L-NAME prevenindo o efeito da SPD sobre este aumento nos níveis de  $\text{NO}_x$ .

Está descrito que as poliaminas podem atuar inibindo a enzima óxido nítrico sintase (Hu *et al.*, 1994). Nossos dados demonstraram que SPD melhorou a memória e aumentou a produção de  $\text{NO}_x$ , comprovando exatamente o oposto, uma vez que, a melhora da memória induzida pela

injeção intra-hipocampal de SPD está relacionada com o aumento na atividade da NOS e produção de NO.

Além do mais um significativo número de estudos tem demonstrado que inibidores da NOS prejudicam ou não tem efeito sobre a aquisição, consolidação ou evocação da memória (Johnson *et al.*, 2000; Maren, 1998; Vanaja & Ekambaram, 2004), porém, nenhum estudo descreveu melhora da memória através de inibidores da NOS.

Demonstramos que a atividade da NOS hipocampal está envolvida nos efeitos facilitatórios da SPD sobre a memória, em seguida nós tentamos determinar qual a isoforma da NOS está por trás deste efeito. Para isso utilizamos o 7-NI, um inibidor seletivo para a NOS neuronal.

Com a finalidade de determinar a dose a ser usada no experimento de reversão da melhora da memória causada por SPD, realizamos uma curva de 7-NI (1-30 mg/kg). Neste experimento nenhuma das doses testadas foi capaz de causar piora da memória nos ratos. Levando em consideração esse dado e que, segundo Mackenzie e colaboradores (1994), a administração sistêmica de 7-NI, na dose de 30 mg/kg, inibe 85% da atividade da *n*-NOS, escolhemos essa dose para o experimento de reversão. Porém, inesperadamente, essa mesma dose de 7-NI piorou a memória dos ratos no experimento em que investigamos o seu efeito sobre a melhora da memória causada pela administração intra-hipocampal de SPD. Uma possível explicação para esses resultados controversos poderia ser devido a variação sazonal do comportamento

dos animais, já que os dois conjuntos de experimentos foram realizados em épocas diferentes do ano.

Surpreendentemente, a administração sistêmica de 7-NI tendeu a aumentar os níveis de NO<sub>x</sub> hipocampais. Com relação a este ponto, é importante mencionar um recente estudo que descreve que a infusão de 7-NI ou L-NAME paradoxalmente aumenta produção de nitrito no hipocampo (Watts *et al.* 2005). O mesmo estudo também mostrou que a infusão de 7-NI causa um aumento bifásico duradouro na produção de nitrito, que é mantido por duas horas depois da remoção da solução de diálise infundida. Nossos resultados estão de acordo com os resultados de Watts e colaboradores (2005), uma vez que, os níveis de NO<sub>x</sub> aumentaram uma hora depois da administração sistêmica de 7-NI. De acordo com o estudo, L-NAME não causa um aumento duradouro na produção de nitrito, porque a produção de nitrito diminui com o término da infusão, e o mais importante, a infusão de L-NAME diminui a produção de nitrito induzida por NMDA abaixo dos níveis basais. Isto indica que L-NAME pode reverter o aumento na produção de nitrito induzida por NMDA, embora possa causar um aumento nos níveis de NO quando injetado sozinho. Nossos resultados estão, novamente, de acordo com os dados de Watts e colaboradores (2005), uma vez que, a infusão intra-hipocampal de L-NAME (0,1 nmol) foi capaz de prevenir completamente o aumento da produção de NO<sub>x</sub> induzida pela co-infusão de SPD, embora

nós não achamos um aumento significativo nos níveis de NO<sub>x</sub> no hipocampo de animais injetados apenas com L-NAME.

O 7-NI é um inibidor da NOS considerado mais seletivo para o subtipo neuronal (Hölscher *et al.*, 1996). Entretanto alguns estudos demonstram que 7-NI não é um inibidor seletivo da *n*-NOS, uma vez que, deve-se referir a inibidores seletivos para uma isoforma da NOS em particular, se o efeito de seletividade for demonstrado a nível da enzima isolada, além dos efeitos farmacológicos em células e *in vivo*, o que não ocorre com 7-NI (Alderton *et al.*, 2001). Considerando a discussão acima e o fato do 7-NI apresentar IC<sub>50</sub> semelhante para i-NOS, *n*-NOS, e e-NOS (Alderton *et al.* 2001), a questão se 7-NI é um inibidor seletivo da *n*-NOS, deve ser interpretada com cautela.

Portanto, baseado nos diferentes protocolos de administração de 7-NI e L-NAME neste estudo, nós podemos especular sobre os possíveis mecanismos que estão por trás dos diferentes efeitos de ambos inibidores da NOS sobre a memória e produção de NO<sub>x</sub>.

Sabemos que ambas as isoformas e-NOS e *n*-NOS estão presentes no hipocampo (Liu *et al.*, 2003) e que o NO gerado por elas parece contribuir para alguns eventos como a plasticidade sináptica (Bon & Garthwaite, 2003). Estudos com camundongos transgênicos sugerem que uma isoforma pode compensar o efeito da outra (Son *et al.*, 1996).

Nossos resultados sugerem que a administração sistêmica de 7-NI poderia estar inibindo apenas a isoforma neuronal da NOS e causando

assim uma super expressão da isoforma endotelial, o que ocasionaria um aumento na produção de NO, mesmo com a administração de um inibidor da NOS. Podemos sugerir isto, uma vez que, não está claro se o 7-NI é inibidor seletivo para a isoforma neuronal da enzima NOS .

Por outro lado, L-NAME além de ser um inibidor que não possui seletividade para as isoformas da NOS foi administrado diretamente na estrutura, o que pode ter provocado uma inibição nas mesmas proporções para ambas as isoformas.

Nossos resultados sugerem que o prejuízo da memória causado pela a injeção sistêmica de 7-NI (30 mg/kg) não é devido a uma diminuição na produção de NOx no hipocampo. Embora não tenhamos evidência experimental de outro efeito do 7-NI nestes animais, é possível que o efeito relatado do 7-NI seja devido a uma ação sobre um sistema diferente do sistema nitrérgico ou em estruturas cerebrais diferentes do hipocampo, uma vez que, este composto foi administrado por via sistêmica.

Um suposto mecanismo, diferente do nitrérgico, para o efeito do 7-NI sobre a memória, pode ser através da liberação de dopamina. Wegener e colaboradores (2000) demonstraram que a administração sistêmica de 7-NI causa um aumento nos níveis de dopamina no hipocampo, o qual não é revertido pela adição de L-arginina, substrato da enzima NOS. Assim, pode-se questionar se o aumento nos níveis de dopamina ocorre realmente por um mecanismo nitrérgico. Desta maneira,

podemos sugerir que o prejuízo de memória na tarefa de esQUIVA inibitória, obtido pela administração de 7-NI, possa ocorrer pela liberação de dopamina. Uma vez que, a estimulação de receptores dopaminérgicos prejudica a memória espacial de trabalho (Zahrt *et al.*, 1997). Além disso, diferentes regiões do encéfalo podem ser inibidas diferentemente pela administração sistêmica de 7-NI (Kalish *et al.*, 1996).

Por outro lado, a injeção intra-hipocampal de L-NAME preveniu o aumento de NO<sub>x</sub> induzido por SPD. Se nós assumimos que com injeção intra-hipocampal de L-NAME o mesmo não atua em outra estrutura cerebral que não o hipocampo nós podemos sugerir que os resultados deste estudo indicam que os efeitos da SPD sobre a memória estão ligados à ativação de mecanismos nitrérgicos no hipocampo. Também vale mencionar que o protocolo de co-injeção das drogas em uma mesma solução no hipocampo pode proporcionar interações farmacêuticas. Embora L-NAME e SPD sejam substâncias quimicamente estáveis, não podemos descartar a possibilidade de que alguma outra interação farmacêutica possa contribuir para os efeitos relatados neste estudo.

Em resumo, neste estudo, nós mostramos que o efeito facilitatório da memória induzido por SPD parece depender da atividade da NOS hipocampal, e que a administração intra-hipocampal de um inibidor da NOS, em uma dose que não causa efeito *per se* sobre a memória, previne este efeito.

Nossos resultados sugerem a participação da NOS no efeito facilitatório da memória na tarefa de esquiva inibitória induzido pela SPD. Entretanto, estudos adicionais são necessários para esclarecer o paradoxal efeito estimulatório do 7-NI sobre a produção de  $\text{NO}_x$ , e os mecanismos pelo qual esta substância prejudica a memória.

---

## **VI. CONCLUSÕES**



Com base nos resultados obtidos, concluiu-se que:

- A administração intra-hipocampal de L-NAME, um inibidor não seletivo da NOS, e a administração sistêmica de 7-NI, um inibidor seletivo da *n*-NOS, não produziram efeito sobre a memória na tarefa de esquiva inibitória em ratos.
  
- A administração intra-hipocampal de L-NAME, mas não a administração sistêmica de 7-NI, foi capaz de prevenir o efeito facilitatório sobre a memória induzido por SPD. Além disso, neste experimento, a administração de 7-NI causou déficit de memória dos ratos na tarefa de esquiva inibitória.
  
- A administração intra-hipocampal de L-NAME, mas não a administração sistêmica de 7-NI, preveniu o aumento nos níveis de nitrito e nitrato hipocampais induzidos pela administração intra-hipocampal de SPD.

---

## VII. REFERÊNCIAS

- ABEL, T. & LATTAL, M. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. **Current Opinion in Neurobiology**, **11**: 180–187, 2001.
- AHLANDER, M., MISANE, I., SCHOTT, P. A. & OGREN, S. O. A behavioral analysis of the spatial learning deficit induced by the NMDA receptor antagonist MK-801 (dizocilpine) in the rat. **Neuropsychopharmacology**, **21**: 414–26, 1999.
- ALDERTON, W. K., COOPER, C. E. & KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochemical Journal**, **357**: 593–615, 2001.
- ALEXANDER, S. P. H., KENDALL, D. A. & HILL, S. J. Excitatory amino acid-induced phosphoinositide turnover in guinea pig cerebral cortical slices: selective enhancement by spermine of the response to DL-1-aminocyclopentane-trans-1,3-dicarboxilate. **Journal of Neurochemistry**, **59**: 610–615, 1992.
- BARATTI, C. M. & KOPF S. R. A nitric oxide synthase inhibitor impairs memory storage in mice. **Neurobiology of Learning and Memory**, **65**: 197-201, 1996.
- BEAR, M. F., CONNORS B. W. & PARADISO, M. A. **Neurociência: desvendando o sistema nervoso**. 2ª edição, Porto Alegre: Artmed Editora S.A, 2002.
- BERLESE, D. B., SAUZEM, P. D., CARATI, M. D., GUERRA, G. P., STIEGEMEIER, J. A., MELLO, C. F. & RUBIN, M. A. Time-dependent modulation of inhibitory avoidance memory by

- spermidine in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, **83**: 48-53, 2005.
- BERNABEU, R., DE STEIN, M. I., FIN, C., IZQUIERDO, I. & MEDINA, J. H. Role of hippocampal NO in the acquisition and consolidation of inhibitory avoidance learning. **Neuroreport**, **6**: 1498–1500, 1995.
- BERNABEU, R., SCHMITZ, P., FAILLACE, M. P., IZQUIERDO, I. & MEDINA, J. H. Hippocampal cGMP and cAMP are differentially involved in memory processing of inhibitory avoidance learning. **NeuroReport**, **7**: 585–588, 1996.
- BLISS, T. V. P. & COLLINGRIDGE, G. L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, **361**: 31–39, 1993.
- BOHME, G. A., BON, C., LEMAIRE, M., REIBAUD, M., PIOT, O., STUTZMANN, J. M., DOBLE, A. & BLANCHARD, J. C. Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **90**: 9191–9194, 1993.
- BOLHUIS, J. J. & REID, I. C. Effects of intraventricular infusion of the *N*-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor antagonist AP5 on spatial memory of rats in a radial arm maze. **Behavioural Brain Research**, **47**: 151–7, 1992.
- BON, C. L.M. & GARTHWAITE, J. On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. **The Journal of Neuroscience**, **23**: 1941–1948, 2003.

- BROADBENT N. J., SQUIRE, L. R. & CLARK, R. E. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **101**: 14515–14520, 2004.
- CALIXTO, A. V., VANDRESEN, N., DE NUCCI, G., MORENO, J. R. H. & FARIA M. S. Nitric oxide may underlie learned fear in the elevated T-maze. **Brain Research Bulletin**, **55**: 37–42, 2001.
- CAMPBELL, R. A., BARTOS, D., MORRIS, D. R., DAVES, G. D. JR. & BARTOS, F. **Advances in polyamine research**. Editora Raven Press, New York, 1ª edição, p. 1–10, 1978.
- CARAMANOS, Z. & SHAPIRO, M. L. Spatial memory and *N*-methyl-daspartate receptor antagonists APV and MK-801: memory impairments depend on familiarity with the environment, drug dose, and training duration. **Behavioral Neuroscience**, **108**: 30–43, 1994.
- CARTER, C. **Neuropharmacology of Polyamines**. Londres: Academic Press, 1994.
- CASTELLANO, C., CESTARI, V. & CIAMEI, A. NMDA receptors and learning and memory processes. **Current Drug Targets**, **2**: 273–83, 2001.
- CELANO, P., BAYLIN, S. B. & CASERO, JR. R. A. Polyamines differentially modulate the transcription of growth-associated genes in human colon carcinoma cells. **Journal of Biological Chemistry**, **264**: 8922–8927, 1989.

- CHIEN, W. L., LIANG, K. C., TENG, C. M., KUO, S. C., LEE, F. Y. & FU, W. M. Enhancement of learning behaviour by a potent nitric oxideguanylate cyclase activator YC-1. **European Journal Neuroscience**, **21**:1679– 1688, 2005.
- CHOU, J. C. & LEE, E. C. Differential involvement of hippocampal G-protein subtypes in the memory process of rats. **Neuroscience**, **64**: 5–15, 1995.
- CONWAY, E. C. Brain lesions and delayed water maze learning deficits after intracebroventricular spermine. **Brain Research**, **800**: 10–20, 1998.
- COUGHENOUR, L. L. & BARR, B. M. Use of trifluoroperazine isolates a [<sup>3</sup>H]ifenprodil binding site in rat brain membranes with the pharmacology of the voltage-independent ifenprodil site on N-Methyl- D-aspartate receptors containing NR2B subunits. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, **296**: 150–159, 2001.
- DA CUNHA, I. C., JOSÉ, R. F., PEREIRA, L. O., PIMENTA, J. A., OLIVEIRA DE SOUZA, I. A., REISER, R., MORENO, H. JR., MARINO, J. NETO, PASCHOALINI, M. A. & FARIA, M. S., The role of nitric oxide in the emotional learning of rats in the plus-maze. **Physiology & Behavior**, **84**: 351–358, 2005.
- DAVIS, R. H. Management of polyamine pools and the regulation of ornithine decarboxylase. **Journal of Cellular Biochemistry**, **44**:199–205, 1990.

- DAWSON, R. M, ELLIOT, D. C, ELLIOT, W. H & JONES, K. M. Data for Biological Research, **3rd edition. Oxford: Clarendon Press; 1986.**
- DE LIMA, M. N., LARANJA, D. C., BROMBERG, E., ROESLER, R. & SCHRODER, N. Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. **Behavioral Brain Research, 156:139-43, 2005.**
- DERE, E., FRISCH, C., DE SOUZA SILVA, M. A., GÖDECKE, A., SCHRADER, J. & HUSTON, J. P. Unaltered radial maze performance and brain acetylcholine of the endothelial nitric oxide synthase knockout mouse. **Neuroscience, 107: 561-570, 2001.**
- ELGERSMA, Y. & SILVA A. J. Molecular mechanisms of synaptic plasticity and memory. **Current Opinion in Neurobiology, 9: 209–213, 1999.**
- ERNESTUS, R-I., ROHN, G., HOSSMANN, K-A. & PASCHEN, W. Polyamine metabolism in experimental brain tumors of rat. **The Journal of Neurochemistry, 60: 417–422, 1993.**
- ESTALL, L. B., GRANT, S. J. & CICALA G. Inhibition of nitric oxide (NO) production selectively impairs learning and memory in the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behaviour, 46: 959-962, 1993.**
- FANSELOW, M. S & KIM, J. J. Acquisition of contextual Pavlovian fear conditioning is blocked by application of an NMDA receptor antagonist d,l-2-amino-5 phosphonovaleric acid to the basolateral amygdala. **Behavioral Neuroscience, 108:210–2, 1994.**

- FIN, C., DA CUNHA, C., BROMBERG, E., SCHIMITZ, P. K., BIANCHIN, M., MEDINA, J. H. & IZQUIERDO, I. Experiments suggesting a role for nitric oxide in the hippocampus in memory process. **Neurobiology of Learning and Memory**, **63**: 113-5, 1995.
- FLOOD, J. F., BAKER, M. L. & DAVIS, J. L. Modulation of memory processing by glutamic acid receptor agonist and antagonists. **Brain Research**, **521**: 197–202, 1990.
- GARTHWAITE, J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system. **Trends in Neurosciences**, **14**: 60-68, 1991.
- GUGLIUCCI, A., Poliamines as clinical laboratory tools. **Clinica Chimica Acta**, **344**:23-35, 2004.
- HARMAN, R. J. & SHAW, G. G. High-affinity uptake of spermine by slices of rat cerebral cortex. **Journal of Neurochemistry**, **36**: 1609–1615, 1981.
- HÖLSCHER, C., MCGLINCHEY, L., ANWYL, R. & ROWAN, M. J. 7-Nitroindazole, a selective neuronal nitric oxide synthase inhibitor in vivo, impairs spatial learning in the rat. **Learning Memory**, **2**: 267–278, 1996.
- HU, J., MAHMOUD, M. I. & EL-FAKAHANY, E. E. Polyamines inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. **Neuroscience Letters** **175**: 41–45, 1994.



HUANG, A. M. & LEE, E. H. Role of hippocampal nitric oxide in memory retention in rats. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, **50**: 327–332, 1995.

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

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

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

JAFARI-SABET, M. NMDA receptor blockers prevents the facilitatory effects of post-training intra-dorsal hippocampal NMDA and physostigmine on memory retention of passive avoidance learning in rats. **Behavioural Brain Research**, **169**: 120–127, 2006.

JEEVANANDAM, M. & PETERSEN, S. R. Clinical role of polyamine analysis: problem and promise. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, **4(5)**: 385-90, 2001

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

JOHNSON, D. M., BAKER, J. D. & AZORLOSA, J. L. Acquisition, extinction, and reinstatement of Pavlovian fear conditioning: the

roles of the NMDA receptor and nitric oxide. **Brain Research**, **857**:66–70, 2000

KALISCH, B. E., CONNOP, B. P., JHAMANDAS, K., BENINGER, R. J. & BOEGMAN, R. J. Differential action of 7-nitro indazole on rat brain nitric oxide synthase. **Neuroscience Letters**, **219**: 75-78, 1996.

KHAVANDGAR, S., HOMAYOUN, H. & ZARRINDAST, M. R. The effect of L-NAME and L-arginine on impairment of memory formation and state-dependent learning induced by morphine in mice. **Psychopharmacology**, **167**: 291–296, 2003.

KIRCHNER, L., WEITZDOERFER, R., HOEGER, H., URL, A., SCHMIDT, P., ENGELMANN, M., VILLAR, S. R., FOUNTOLAKIS, M., LUBEC, G. & LUBEC, B. Impaired cognitive performance in neuronal nitric oxide synthase knockout mice is associated with hippocampal protein derangements. **Nitric Oxide**, **11**: 316-330, 2004.

KISH, S. J., WILSON, J. M. & FLETCHER, P. J. The polyamine synthesis inhibitor difluormethylornithine is neuroprotective against N-methyl-D-aspartate-induced brain damage in vivo. **European Journal Pharmacology**, **209**: 101-103, 1991.

KISHI, A., OHNO, M. & WATANABE, S. Concurrent activation of hippocampal glycine and polyamine sites of the *N*-methyl-D-aspartate receptor synergistically reverses working memory deficits in rats. **Neuroscience Letters**, **257**: 131–134, 1998a.

- KISHI, A., OHNO, M. & WATANABE, S. Spermidine, a polyamine site agonist, attenuates working memory deficits caused by blockade of hippocampal muscarinic receptors and mGluRs in rats. **Brain Research**, **793**: 311–314, 1998b.
- KOPF, S. R., BENTON, R. S., KALFIN, R., GIOVANNINI, M. G. & PEPEU, G. NO synthesis inhibition decreases cortical Ach release and impairs retention of a conditioned response. **Brain Research**, **894**:141–144, 2001.
- KUBO, S., TAMORI, A., NISHIGUCHI, S., SHUHEI, O. OMIRA, T., KINOSHITA, H., HIROHASHI, K., KUROKI, T. & OTANI, S. Relationship of polyamine metabolism to degree of malignancy of human hepatocellular carcinoma. **Oncology Reports** **5(6)**: 1385-8, 1998.
- LIU, P., SMITH, P. F., APPLETON, I., DARLINGTON, C. L. & BILKEY, D. K. Regional variations and age-related changes in nitric oxide synthase and arginase in the sub-regions of the hippocampus. **Neuroscience**, **119**:679–687, 2003.
- MAcDERMOTT, A. B., MAYER, M. L., WESTBROOK, G. L., SMITH, S. J. & BARKER, J. L. NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. **Nature (Lond.)**, **321**: 519-522, 1986.
- MACKENZIE, G. M., ROSE, S., BLAND-WARD, P. A., MOORE, P. K., JENNER, P. & MARSDEN, C. D. Time course of inhibition of brain nitric oxide synthase by 7-nitro-indazole. **Neuroreport**, **5**:1993–1996, 1994.

- MAREN, S. Effects of 7-nitroindazole, a neuronal nitric oxide synthase nNOS inhibitor, on locomotor activity and contextual fear conditioning in rats. **Brain Research**, **804**:155–158, 1998.
- MARTON, L. J. & MORRIS, D. R. Molecular and cellular functions of polyamines. In: Inhibition of Polyamine Metabolism. Biological Significance and Basis for New Therapies. McCann PP, Pegg AE, Sjoerdsma A (editors). London: **Academic Press**; 1987.
- MAYER, M. L. & WESTBROOK, G. L. Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. **Journal Physiology (Lond.)**, **394**: 501-527, 1987a.
- MAYER, B. & ANDREW, P. Nitric oxide synthases: catalytic function and progress towards selective inhibition. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, **358**: 127–133, 1998.
- MCGAUGH, J. L. Memory- A century of consolidation. **Science**, **287**: 248 –251, 2000.
- MCGAUGH, J. L. & IZQUIERDO, I. The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. **Trends in Pharmacological Sciences**, **21**: 208–210, 2000.
- MCGAUGH, J. Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective. **Trends in Neurosciences**, **25**: 456–461, 2002.
- MESSING, E., KIM, K., SHARKEY, F., SCHULTZ, M., PARNES, H., KIM, D., SALTZSTEIN, D. & WILDING, G. Randomized

- Prospective Phase III Trial of Difluoromethylornithine vs Placebo in Preventing Recurrence of Completely Resected Low Risk Superficial Bladder Cancer. **The Journal of Urology**, **176**: 500-504, 2006.
- MEYER, R. C., SPANGLER, E. L., PATEL, N., LONDON, E. D. & INGRAM, D. K. Impaired learning in rats in a 14-unit T-maze by 7-nitroindazole, a neuronal nitric oxide synthase inhibitor, is attenuated by the nitric oxide donor, molsidomine. **European Journal of Pharmacology**, **341**: 17–22, 1998.
- MIKOLAJCZAK, P., OKULICZ-KOZARYN, I., DAMINSKA, E., NIEDOPAD, L., POLANSKA, A. & GEBKA, J. Effects of acamprosate and some polyamine site ligands of NMDA receptor on short-memory in rats. **European Journal of Pharmacology**, **444**: 83–96, 2002.
- MILLER, D. B., O'CALLAGHAN, J. P. Aging, stress and the hippocampus. **Ageing Research Reviews**, **4(2)**: 123-40, 2005.
- MISERENDINO, M. J. D., SANANES, C. B., MELIA, K. R & DAVIS, M. Blocking of acquisition but not expression of conditioned fear-potentiated startle by NMDA antagonists in the amygdala. **Nature**, **345**: 716–8, 1990.
- MONAGHAN, D. T., & COTMAN, C. W. Distribution of N-methyl-D-aspartate-sensitive L-3[H]glutamate binding sites in rat brain. **The Journal of Neuroscience**, **5**: 2909-2919, 1985.
- MOORE, P. K., WALLACE, R. C., GAFFEN, Z., HART, S. L. & BABBAGE, R. C. Characterization of the novel nitric oxide

- synthase inhibitor 7-nitroindazole and related indazoles: Antinociceptive and cardiovascular effects. **British Journal of Pharmacology**, **110**: 219–224, 1993.
- MORRIS, R. G., ANDERSON, E., LYNCH, G. S. & BAUDRY, M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an *N*-methyl-d-aspartate receptor antagonist, AP5. **Nature**, **319**: 774–6, 1986.
- MORRIS, R. G. Synaptic plasticity and learning: selective impairment of learning rats and blockade of long-term potentiation in vivo by de *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5. **The Journal of Neuroscience**, **9**: 3040–3057, 1989.
- O'DELL, T. J., HAWKINS, R. D., KANDEL, E. R. & ARANCIO, O. Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **88**: 11285–11289, 1991.
- OHNO, M., YAMAMOTO, T. & WATANABE, S., Deficits in working memory following inhibitory of hippocampal nitric oxide synthesis in the rat. **Brain Research**, **632**: 36-40, 1993.
- OZAWA, S., KAMIYA, H. & TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Progress in Neurobiology**, **54**: 581–618, 1998.
- PLECH, A., KLIMKIEWICZ, T. & MAKSYM, B. Effect of L-arginine on memory in rats. **Polish Journal Pharmacology**, **55**: 987–992, 2003.

- PRAST, H. & PHILIPPU, A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. **Progress Neurobiology**, **64**: 51–68, 2001.
- PRYBYLOWSKI, K. & WENTHOLD, R. J. N-methyl-D-aspartate receptors: subunit assembly and trafficking to the synapse. **The Journal of Biological Chemistry**, **279**: 9673–9676, 2004.
- RANSON, R. W. & STEC, N. I. Cooperative modulation of [<sup>3</sup>H]MK-801 binding to the *N*-methyl-D-aspartate receptor-ion channel complex by L-glutamate, glycine and polyamines. **Journal of Neurochemistry**, **51**: 830–836, 1988.
- RAUL, F., GOSSE, F., GALLUSER, M., HASSELMANN, M. & SEILER, N. Functional and metabolic changes in intestine mucosa of rats after enteral administration of ornithine alphaketoglutarate salt. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, **19**: 145–50, 1995.
- RIEDEL, G., PLATT, B. & MICHEAU, J. Glutamate receptor function in learning and memory. **Behavioural Brain Research**, **18**: 1–47, 2003.
- ROCK, D. M. & MACDONALD, R. L. Polyamine regulation of *N*-methyl-D-aspartate receptor channels. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, **35**: 463–482, 1995.

- ROESLER, R., VIANNA, M., SANT'ANNA, M. K., KUYVEN, C. R., KRUEL, A. V. S. & QUEVEDO, J. Intrahippocampal infusion of the NMDA receptor antagonist AP5 impairs retention of an inhibitory avoidance task: protection from impairment by pretraining or preexposure to the task apparatus. **Neurobiology of Learning Memory**, **69**: 87–91, 1998.
- ROESLER, R., VIANNA, M.R.M., DE-PARIS, F., QUEVEDO, J., WALZ, R. & BIANCHIN, M. Infusions of ap5 into the basolateral amygdala impair the formation, but not the expression, of step-down inhibitory avoidance. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **33**: 829-834, 2000.
- ROHN, G., ELS, T., HELL, K. & ERNESTUS, R-I. Regional distribution of ornithine decarboxylase activity and polyamine levels in experimental cat brain tumors. **Neurochemistry International**, **39**: 135–140, 2001.
- ROKKAS, T., VAJA, S., MURPHY, G. M. & DOWLING, R. H. Aminoguanidine blocks intestinal diamine oxidase (DAO) activity and enhances the intestinal adaptive response to resection in the rat. **Digestion**, **46**:447– 57, 1990.
- RUBIN, M. A., JURACH, A., ZANOLLA, G. R., BOEMO, R. L., SOUZA, D. O. & MELLO, C. F. Intrahippocampal GMP administration improves inhibitory avoidance performance through GABAergic and glutamatergic mechanisms in rats. **NeuroReport**, **8**: 3713–3716, 1997.



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

RUBIN, M. A., STIEGEMEIER, J. A., VOLKWEIS, M. A., OLIVEIRA, D. M., FENILI, A. C., BOEMO, R. L., JURACH, A. & MELLO, C. F. Intra-amygdala spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. **European Journal of Pharmacology**, **423**: 35–39, 2001.

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. Intraamygdala administration of polyamines modulates fear conditioning in rats. **Journal of Neuroscience**, **24**: 2328–2334, 2004.

SCATTON, B. The NMDA receptor complex. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, **7**: 389–400, 1993.

SCHUMAN, E. M. & MADISON, D. V. A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. **Science**, **254**: 1503-1506, 1991.

SEILER, N. Polyamine metabolism and function in brain. **Neurochemistry International**, **3**: 95–110, 1981.

SEILER, N. Formation, catabolism and properties of the natural polyamines. In *Neuropharmacology of Polyamines*. **Editora Academic Press**, p. 26–36, 1994.

- SEILER, N., BOLKENIUS, F. N. & KNÖDGEN, B. The influence of catabolic reactions on polyamine excretion. **Biochemical Journal**, **255**: 319–322, 1985.
- SEILER, N., DELCROS, J. G. & MOULINOX, J. P. Polyamine transport in mammalian cells. An update *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **28 (8)**: 843-861, 1996.
- SEILER, N. & SCHMIDT-GLENEWINKEL, T. Regional distribution of putrescine, spermidine and spermine in relation to the distribution of RNA and DNA in the rat nervous system. **Journal of Neurochemistry**, **24**: 791–795, 1975.
- SHAPIRO, M. L. & O'CONNOR, C. *N*-Methyl-d-aspartate receptor antagonist MK-801 and spatial memory representation: working memory is impaired in an unfamiliar environment but not in a familiar environment. **Behavioral Neuroscience**, **106**: 604–12, 1992.
- SHAPIRO, M. L. & EICHENBAUM, H. Hippocampus as a memory map: synaptic plasticity and memory encoding by hippocampal neurons. **Hippocampus**, **9**: 365–84, 1999.
- SHIMADA, A., SPANGLER, E. L., LONDON, E. D. & INGRAM, D. K. Spermidine potentiates dizocilpine-induced impairment of learning performance by rats in a 14-unit T-maze. **European Journal of Pharmacology**, **262**: 293–300, 1994.

- SHING, L., OLES, R. & WOODRUFF, G. In vivo interaction of a polyamine with NMDA receptor. **European Journal of Pharmacology**, **180**: 391– 392, 1990.
- SON, H., HAWKINS, R. D., MARTIN, K., KIEBLER, M., HUANG, P. L., FISHMAN, M. C. & KANDEL, E.R. Longterm potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase. **Cell**, **87**: 1015–1023, 1996.
- SQUIRE, L. R. & KANDEL, E. R. **Memória: da mente às moléculas**, Porto Alegre, Artmed Editora S.A, 2003.
- SZE, C., BI, H., KLEINSCHMIDT-DEMASTERS, B. K., FILLEY, C. M. & MARTIN, L. J. N-Methyl-D-aspartate receptor subunit proteins and their phosphorylation status are altered selectively in Alzheimer's disease. **Journal of the Neurological Sciences**, **182(2)**: 151-9, 2001.
- TABOR, C. W. & TABOR, H. Polyamines. **Annual Review of Biochemistry**, **53**: 749–790, 1984.
- TANG, Y., SHIMIZU, E., DUBE, G. R., RAMPON, C., KERCHNER, G. A., ZHUO, M., LIU, G. & TSIEN, J. Z. Genetic enhancement of learning and memory in mice. **Nature**, **401**: 63–69, 1999.
- TETI, D., VISALLI, M. & MCNAIR, H. Analysis of polyamines as markers of (patho)physiological conditions. **Journal of Chromatography B**, **781**: 107–149 , 2002.

- TEYLER, T. J. Use of brain slices to study long-term potentiation and depression as examples of synaptic plasticity. **Methods**, **18**: 109–116, 1999.
- THOMAS, T. & THOMAS, T. J. Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. **Cellular and Molecular Life Sciences**, **58(2)**: 244-58, 2001.
- URDIALES, J. L., MEDINA, M. A. & SANCHEZ-JIMENEZ, F. Polyamine metabolism revisited. **European Journal of Gastroenterology and Hepatology**, **13**: 1015–1019, 2001.
- VANAJA, P. & EKAMBARAM, P. Demonstrating the dose- and timerelated effects of 7-nitroindazole on picrotoxin-induced convulsions, memory formation, brain nitric oxide synthase activity, and nitric oxide concentration in rats. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, **77**:1–8, 2004.
- WATTS, J., THOMSON, A. M. Excitatory and inhibitory connections show selectivity in the neocortex. **The Journal of Physiology**, **562**: 89-97, 2005.
- WATTS, J., WHITTON, P. S. & PEARCE, B. Unexpected effects of nitric oxide synthase inhibitors on extracellular nitrite levels in the hippocampus in vivo. **Pharmacology**, **74**:163–168, 2005.
- WEGENER, G., VOLKE, V. & ROSENBERG, R. Endogenous nitric oxide decreases hippocampal levels of serotonin and dopamine in vivo. **British Journal of Pharmacology**, **130**: 575-580, 2000.

- WEITZDOERFER, R., HOEGER, H., ENGIDAWORK, E., ENGELMANN, M., SINGEWALD, N., LUBEC, G. & LUBEC, B. Neuronal nitric oxide synthase knock-out mice show impaired cognitive performance. **Nitric oxide**, **10**:130-140, 2004.
- WILLIAMS, K., ROMANO, C. & MOLINOFF, P. B. Effects of polyamines on the Binding of [<sup>3</sup>H]MK-801 to the *N*-methyl-D-aspartate receptor: Pharmacological evidence for the existence of a polyamine recognition site. **Molecular Pharmacology**, **36**: 575–581, 1989.
- WILLIAMS, K., ROMANO, C., DICHTER, M. A. & MOLINOFF, P. B. Minireview: Modulation of the NMDA receptor by polyamine. **Life Science**, **48**: 469–498, 1991.
- WILLIAMS, K. Interactions of polyamines with ion channels. **Biochemical Journal**, **325**: 289–297, 1997.
- WORTHEN, D. R., GIBSON, D. A., ROGERS, D. T., BENCE, A. K., FU, M., LITTLETON, J. M. & CROOKS, P. A. Endogenous indoles as novel polyamine site ligands at the *N*-methyl-D-aspartate receptor complex. **Brain Research**, **890**: 343–346, 2001.
- YAMADA, K., NODA, Y., NAKAYAMA, S., KOMORI, Y., SUGIHARA, H., HASEGAWA, T. & NABESHIMA, T. Role of nitric oxide in learning and memory and in monoamine metabolism in the rat brain. **British Journal Pharmacology**, **115**: 852–858, 1995.
- YAMAKURA, T. & SHIMOJI, K. Subunit- and site-specific pharmacology of the NMDA receptor channel. **Progress in Neurobiology**, **59**: 279–298, 1999.

YONEDA, Y. & OGITA, K. Novel fourth binding sites of  $^3\text{[H]}$ -spermidine within the NMDA receptor complex. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, **287**: 455–475, 1991.

ZAHRT, J., TAYLOR, J. R., MATHEW, R. G. & ARNSTEN, A. F. T. Supranormal Stimulation of D1 Dopamine Receptors in the Rodent Prefrontal Cortex Impairs Spatial Working Memory Performance. **The Journal of Neuroscience**, **17(21)**:8528–8535, 1997.

ZOU, L-B, YAMADA, K., TANAKA, T., KAMEYAMA, T. & NABESHIMA, T. Nitric oxide synthase inhibitors impair reference memory formation in a radial arm maze task in rats. **Neuropharmacology**, **37**:323–330, 1998.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.