

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

**ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE AGENTES
POLIAMINÉRGICOS MODULA A MEMÓRIA NA
TAREFA DE MEDO CONDICIONADO EM RATOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

KELI CAMERA

Santa Maria, RS, Brasil

2006

**ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE AGENTES
POLIAMINÉRGICOS MODULA A MEMÓRIA NA TAREFA DE
MEDO CONDICIONADO EM RATOS**

por

Keli Camera

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

Orientadora: Maribel Antonello Rubin
Co - orientador: Carlos Fernando de Mello

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

**ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE AGENTES POLIAMINÉRGICOS
MODULA A MEMÓRIA NA TAREFA DE MEDO CONDICIONADO EM
RATOS**

elaborada por

Keli Camera

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

Comissão examinadora:

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

Prof^o. Dr. Rafael Roesler (UFRGS)

Prof^a Dra. Tatiana Emanuelli (UFSM)

Santa Maria, 1^o de dezembro de 2006.

"A única moeda verdadeiramente boa e pela qual convém trocar todas as restantes é a sabedoria."

Platão

AGRADECIMENTOS

Ao Rodrigo, pelo apoio, estímulo, carinho e paciência durante esse período.

A minha família: ao meu pai, Valdemar, pelo incentivo incondicional em busca dos meus objetivos; a minha mãe, Noeli, pelos preceitos de dedicação e disciplina; a minha maninha querida, Cátia, por estar sempre ao meu lado e compartilhar todos os momentos comigo e a minha adorada tia Nelci, pela imensa força. Obrigada, de coração!

Em especial aos orientadores, Maribel e Carlos, em primeiro lugar pelo acompanhamento, também pela amizade e principalmente pela oportunidade. Muito obrigada!

Ao professor Juliano, pela disponibilidade, pelos questionamentos e pelas inúmeras explicações. Obrigada!

Aos amigos que tornaram essa passagem mais simples, mais rica e mais bela.

Aos funcionários Paulino, que sempre com boa vontade nos ajudou no conserto dos equipamentos, ao Rinaldo pelo cuidado com os animais, a Angélica pela ajuda com a parte burocrática.

A Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade.

A CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

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

ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE AGENTES POLIAMINÉRGICOS MODULA A MEMÓRIA NA TAREFA DE MEDO CONDICIONADO EM RATOS

Autora: KELI CAMERA
Orientadora: MARIBEL ANTONELLO RUBIN
Co – Orientador: CARLOS FERNANDO DE MELLO
Data e local de Defesa: Santa Maria, 1º de dezembro de 2006.

As poliaminas endógenas, putrescina, espermina e espermidina são aminas alifáticas que atuam como moduladores endógenos de diversos canais iônicos, incluindo o subtipo de receptor glutamatérgico *N*-metil-D-aspartato (NMDA-R) os quais estão envolvidos com plasticidade sináptica e formação de circuitos neurais, conseqüentemente em processos de aprendizagem e memória. No entanto, não se sabe o papel das poliaminas administrados sistemicamente sobre o aprendizado do medo condicionado Pavloviano. Neste teste comportamental, um estímulo condicionado neutro (CS), tal como um tom, provoca respostas comportamentais depois da associação com um estímulo incondicionado aversivo (US), como um choque. Quando a associação CS-US é aprendida, respostas fisiológicas e comportamentais inatas aparecem tal como o comportamento de congelamento. Assim nós investigamos o efeito da administração intraperitoneal de espermidina, um agonista do sítio das poliaminas no NMDA-R, da arcaína, um antagonista do sítio das poliaminas no receptor NMDA, em uma determinada janela de tempo (0-360 min após o treino) e do MK-801, um antagonista não competitivo do NMDA-R, sobre a consolidação da memória na tarefa do medo condicionado clássico em ratos. Para isso, os ratos foram treinados, recebendo três pareamentos de tom (10 seg-2.000 Hz, 90 dB) e choque (1 seg-0,6 mA) nas patas com intervalos de 40 segundos e imediatamente após o treino recebiam injeções intraperitoneal de espermidina (1-100 mg/kg), arcaína (0,1-10 mg/kg), MK-801 (0,001-0,1 mg/kg), associação de espermidina (100 mg/kg) e arcaína (0,1 mg/kg) ou associação de espermidina (100 mg/kg) e MK-801 (0,001 mg/kg). Após 24h foram testados na tarefa do medo condicionado contextual e 48 h após ao medo condicionado ao tom. A administração de arcaína (0-180 min após o treino) e do MK-801 diminuiu, enquanto que espermidina aumentou o condicionamento de medo ao contexto e ao tom. A arcaína e o MK-801, em doses que não apresentaram efeito *per se* sobre a memória, reverteram o efeito facilitatório sobre a memória, causado pela espermidina. Estes resultados indicam que as poliaminas endógenas e exógenas modulam o início da consolidação da tarefa do medo condicionado quando administradas por via sistêmica em ratos, provavelmente esses efeitos são mediados pela modulação do NMDA-R.

ABSTRACT

Master' degree Dissertation
Toxicological Biochemistry Post-Graduation
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

SYSTEMIC ADMINISTRATION OF POLYAMINERGIC AGENTS MODULATE FEAR CONDITIONING IN RATS.

Author: KELI CAMERA
Oriented by: MARIBEL ANTONELLO RUBIN
Co-oriented by: CARLOS FERNANDO DE MELLO
Date and place of the defense: Santa Maria, December 1st, 2006.

The polyamines, spermine, spermidine and putrescine, are a group of aliphatic amines that interact with diverse cellular targets such as nucleic acids and proteins. The polyamines may act as physiological modulators of *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. The processes mediated by NMDA receptor include synaptic plasticity and formation of neural circuitry consequently in the learning and memory process. However, little is known about the role of systemic administration endogenous modulators of the NMDA receptor, such as polyamines, in Pavlovian fear conditioning learning. In this paradigm, an emotionally neutral conditioned stimulus (CS), such as a tone, elicits behavioral responses after association with a noxious aversive unconditioned stimulus (US), such as a brief electric footshock. Once the CS-US association is learned, innate physiological and behavioral responses appear, such as freezing. Therefore, the present study was conducted to investigate whether the immediate post-training intraperitoneal injection of spermidine (1-100 mg/kg), an agonist of the NMDA receptor polyamine binding site, arcaïne (0-360 min post-training), an antagonist of the NMDA receptor polyamine binding site and/or MK-801, a noncompetitive antagonist of the NMDA receptor, affected classical fear conditioning in rats. Intraperitoneal administration of arcaïne (10 mg/kg) decreased, within a limited time window (0-180 min post-training), while spermidine (10-100 mg/kg) increased contextual and auditory fear conditioning. Arcaïne or MK-801 co-administration, at a dose that had no effect *per se*, reversed the facilitatory effect of spermidine. These results provide evidence that endogenous and exogenous systemic administration of polyamine binding site ligands modulate early consolidation of fear-conditioning task. The facilitatory effect induced by spermidine would be NMDA receptor-mediated.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

FIGURA 01 – Estrutura química das Poliaminas.....	18
FIGURA 02 – Metabolismo das Poliaminas	19
FIGURA 03 - Representação esquemática do NMDA-R.....	25
FIGURA 04 - Ação modulatória da espermina sobre o NMDA-R.....	27
FIGURA 05 – Circuitos neurais para o condicionamento de medo	30
FIGURA 06 – Cascata de reações desencadeadas no processo de formação de memórias	34

MANUSCRITO

FIGURE 01 - Effect of immediate post-training intraperitoneal spermidine administration on freezing to context (a) and to tone (b). * $p < 0.05$ compared with vehicle by the Student-Newman-Keuls test. Data are the means + SEM percentage of freezing averaged across all context (a) or tone (b) trials ($n = 11$ animals in each group)	61
---	----

FIGURE 02 - Effect of immediate post-training intraperitoneal MK-801 administration on freezing to context (a) and to tone (b). * $p < 0.05$ compared with vehicle by the Student-Newman-Keuls test. Data are the means + SEM percentage of freezing averaged across all context (a) or tone (b) trials ($n = 8-9$ animals in each group)	61
--	----

FIGURE 03 – Effect of immediate post-training intraperitoneal arcaïne administration on freezing to context (a) and to tone (b). * $p < 0.05$ compared with vehicle by the Student-Newman-Keuls test. Data are the means + SEM percentage of freezing averaged across all context (a) or tone (b) trials ($n = 12-13$ animals in each group)	62
---	----

FIGURE 04 – Effect of the immediate post-training intraperitoneal administration of MK-801 (0.001 mg/kg) and spermidine (100 mg/kg) on the percentage of freezing to context (a) and to tone (b). PBS represents vehicle treatment. * $p < 0.05$ compared with vehicle by the Student-Newman-Keuls test. Data are means + SEM averaged across all context (a) or tone (b) trials ($n = 7-8$ animals in each group)..... 62

FIGURE 05 - Effect of immediate post-training intraperitoneal administration of arcaine (0.1 mg/kg) and spermidine (100 mg/kg) on the percentage of freezing to context (a) and to tone (b). PBS represents vehicle treatment. * $p < 0.05$ compared with vehicle by the Student-Newman-Keuls test. Data are means + SEM averaged across all context (a) or tone (b) trials ($n = 12-14$ animals in each group)..... 63

FIGURE 06 - Effect of injection of arcaine (10 mg/kg) 0, 60, 180 or 360 min after training, on freezing to context (a) and to tone (b). PBS represents vehicle treatment. * $p < 0.05$ compared with vehicle by the Student-Newman-Keuls test. Data are means + SEM averaged across all context (a) or tone (b) trials ($n = 10-12$ animals in each group)..... 63

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

TABLE 1 - Effect of post-training intraperitoneal administration of spermidine, arcaine and MK-801 on freezing responses in a novel context (room B) without tone. PBS represents vehicle treatment	58
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Poliaminas	17
1.1.1 Estrutura das Poliaminas.....	17
1.1.2 Metabolismo das Poliaminas.....	19
1.1.2.1 Síntese	20
1.1.2.2 Catabolismo	20
1.1.2.2 a) Interconversão	20
1.1.2.2 b) Catabolismo final.....	21
1.1.3 Sistema de Transporte	21
1.1.4 Função das Poliaminas	22
1.2 Receptor NMDA	23
1.2.1 Receptor NMDA e Poliaminas.....	25
1.3 Memória	27
1.3.1 Tipos de Memória.....	28
1.3.2 Medo Condicionado	29
1.3.3 Noções sobre a formação da memória.....	32
1.3.4 Papel do Receptor NMDA na Memória	34

1.4 Poliaminas e Memória	35
2. OBJETIVOS	38
2.1 OBJETIVO GERAL	39
2.2 Objetivos Específicos	40
3. MANUSCRITO	41
3.1. MANUSCRITO: Systemic administration of polyaminergic agents modulate fear conditioning in rats. Keli Camera, Carlos Fernando Mello, Ana Paula Chiapinotto Ceretta, Maribel Antonello Rubin.....	42
4. DISCUSSÃO	64
5. CONCLUSÕES	70
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

LISTA DE ABREVIATURAS

- AMPA - Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico
- AMPc - Adenosina monofosfato cíclica
- ADN – Ácido desoxiribonucléico
- ARN – Ácido ribonucléico
- ARC - Arcaína
- AP-5 - Ácido D-2-amino-5-fosfonopentanóico
- Ca²⁺ - Cálcio
- CaMKII - Proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina do tipo II
- CS - Estímulo condicionado
- CNQX – Cianonitro-quinoxalinodieno
- CS - Estímulo condicionado
- CPP – (\pm)-3-(2-carboxipiperazina-4-yl)-propil-1- ácido fosfônico
- CPG - Ácido DL-beta-clorofenil glutâmico
- CREB - Proteína ligante do elemento responsivo ao AMPc
- DAO - Diamino oxidase
- K⁺ - Potássio
- L-NAME - N^G - Nitro -L-arginina metil éster
- LTP - Potenciação de longa duração
- Mg²⁺ - Magnésio
- MAPK - Proteína quinase ativada por mitógeno
- MGLUR – Receptor glutamatérgico metabotrópico
- MK-801 – (+)5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,b]-ciclohepteno-5-10-amino
- MTA – Metiltioadenosina
- Na²⁺ - Sódio
- NMDA – N-metil-D-aspartato
- NO – Óxido nítrico
- ODC – L- ornitina descarboxilase
- PAO - Poliamina oxidase
- PCP- Fenciclidina
- PKA – Proteína quinase A

Lista de Abreviaturas

PKC – Proteína quinase dependente de cálcio

TCP - Piperidina

SAM – S-adenosil-metionina

SMA-D - S-adenosil-metionina-descarboxilada

SAM-dc – S-adenosil-metionina descarboxilase

SNC – Sistema Nervoso Central

SPD – Espermidina

SSAT - Espermidina/espermina N¹-acetiltransferase

US - Estímulo incondicionado

Zn²⁺ - Z inco

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está descrita da seguinte forma: primeiramente são apresentados a Introdução e os Objetivos. A seguir, os Resultados são apresentados na forma de manuscrito, o qual foi escrito de acordo com as normas do periódico, *Psychopharmacology*, no qual o mesmo foi submetido à publicação. Os itens Discussão e Conclusões, dispostos após o manuscrito, contêm interpretações e comentários gerais referentes ao manuscrito. As Referências Bibliográficas apresentadas no final da dissertação referem-se às citações que aparecem nos itens Introdução, e Discussão.

1. INTRODUÇÃO

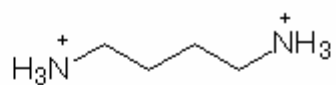
1. INTRODUÇÃO

1.1. Poliaminas

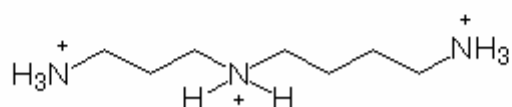
As poliaminas foram primeiramente identificadas em 1678 quando Leuwenhoek relatou a presença de cristais em amostras de esperma seco, hoje conhecidos como cristais de fosfato de espermina. Dois séculos após, as poliaminas foram redescobertas quando Charcot encontrou cristais em amostras de sangue, os quais foram denominados cristais de Charcot-Leyden. Em 1878, Schreiner identificou aqueles cristais como sendo fosfatos de uma nova base orgânica. Landenburg e Abel, em 1886, foram os primeiros a usar o nome espermina, assim denominada por ter sido primeiramente identificada no fluido seminal. Mas apenas em 1926, Dudley sintetizou espermina e espermidina (Johnson, 1996; revisado por Gugliucci, 2004). Atualmente poliaminas é o termo utilizado para designar uma família de moléculas, putrescina, espermina e espermidina (SPD), as quais estão presentes em todas as células vivas, procarióticas, eucarióticas, plantas e animais (Thomas & Thomas, 2001).

1.1.1 Estrutura das Poliaminas

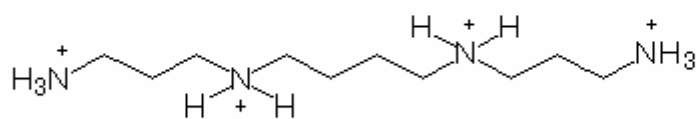
As poliaminas, putrescina (1,4-butano diamina), espermidina [*N*-(3-aminopropil)-1,4-butano diamina] e espermina [*N,N'*- bis (3-aminopropil)-1,4-butano diamina] (figura 1), são aminas alifáticas simples, compostas por uma, duas ou três cadeias carbonadas flexíveis, as quais são conectadas por átomos de nitrogênio. Elas também apresentam grupamentos amino primário nas extremidades da cadeia carbonada (Carter, 1994). Os grupos amino das poliaminas são fortemente básicos e encontram-se totalmente protonadas em pH fisiológico (Usherwood, 2000).



PUTRESCINA



ESPERMIDINA



ESPERMINA

Fig. 1. Representação esquemática das estruturas moleculares das poliaminas (adaptado de Williams, 1997a).

1.1.2 Metabolismo das Poliaminas

O nível celular das poliaminas é mantido por um cuidadoso balanço entre a biossíntese, degradação e captação destas aminas (Figura 2).

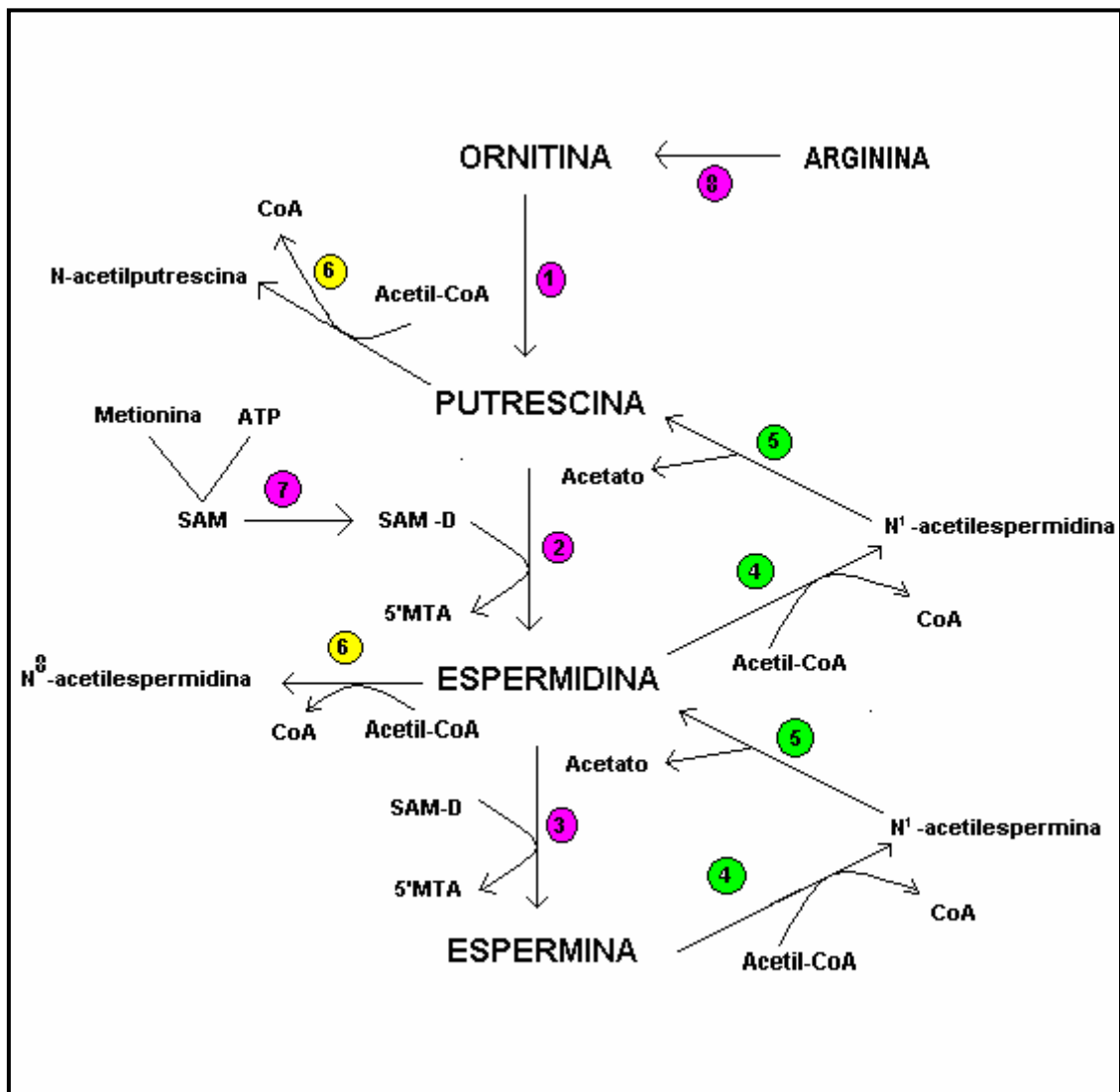


Fig. 2. Metabolismo das poliaminas. 1. ornitina descarboxilase (ODC); 2. espermidina sintetase; 3. espermina sintetase; 4. acetil-CoA: espermidina/espermina N^oacetil-transferase (SSAT); 5. poliamina oxidase (PAO); 6. N^o acetil-transferase; 7. S-adenosil-metionina-decarboxilase (SAMdc); 8. arginase; SAM: S-adenosil-metionina; SAM-D: S-adenosil-metionina descarboxilada; 5'MTA: 5' metiltioadenosina (adaptado de Moinard *et al.*, 2005).

1.1.2.1 Síntese

Os aminoácidos primários, precursores das poliaminas são L-arginina e L-metionina. A arginina é clivada formando ornitina por uma reação catalisada pela arginase. Ornitina é descarboxilada pela enzima ornitina descarboxilase (ODC), dando origem a putrescina (Jänne & Raina, 1968; Russell & Snyder, 1968). A metionina é primeiramente convertida em S-adenosil-metionina (SAM) que subsequente é descarboxilada pela S-adenosilmetionina descarboxilase (SAMdc), a qual será doadora de grupos aminopropil para a espermidina sintase produzir espermidina e para a espermina sintase formar espermina (Figura 2) (Casero & Pegg, 1993). A taxa de biossíntese pode ser afetada pela concentração do substrato para as descarboxilases (ornitina e SAM) ou por regulação da atividade das enzimas ODC e SAMdc (Gugliucci, 2004). Ambas têm meia-vida curta e atividade basal baixa a qual pode ser rapidamente induzida por diferentes estímulos tais como fatores de crescimento, fatores hormonais e tróficos (Seiler & Raul, 2005).

1.1.2.2 Catabolismo

As poliaminas podem ser catabolizadas por dois caminhos: o caminho de interconversão e o catabolismo terminal, como descrito a seguir.

1.1.2.2 a) Interconversão

As reações biossintéticas são irreversíveis, entretanto espermina e espermidina podem ser recicladas respectivamente em espermidina e putrescina por uma rota de interconversão (Figura 2). Espermina e espermidina são primeiro acetiladas na posição N¹ pelas enzimas citosólicas acetil-CoA: espermidina/espermina N¹-acetiltransferase (SSAT) (Casero & Pegg, 1993). Após a

acetilação as poliaminas servem como substrato para a enzima poliamina oxidase (PAO), liberando os grupos aminopropil provenientes da S-adenosil-metionina-descarboxilada (SMA-D) e peróxido de hidrogênio (Carter, 1994). Além disso, a enzima N⁸-acetil-transferase nuclear produz N⁸-acetil-espermidina e N-acetil-putrescina que são excretados (Seiler *et al.*, 1996). A enzima SSAT regula a interconversão das poliaminas (Urdiales *et al.*, 2001).

1.1.2.2 b) Catabolismo final

O catabolismo final das poliaminas é catalisado por amino oxidases dependentes de Cu⁺², em vertebrados esta reação é realizada especificamente por diamino oxidases (DAO) (Seiler & Knodgen, 1983). Cada intermediário do ciclo de interconversão pode ser transformado em um aldeído por desaminação oxidativa dos grupos amino primários. O aldeído será oxidado em um aminoácido ou em um grupamento gama lactâmico (Seiler *et al.*, 1996).

Os produtos do catabolismo final, bem como poliaminas acetiladas estão sujeitas a excreção renal (Seiler, 2004). A degradação das poliaminas pode ser regulada pela disponibilidade de acetilCoA, pela acetilação de poliaminas, pela reutilização de poliaminas ou pela desaminação oxidativa.

Estudos têm demonstrado que a rota de interconversão de poliaminas no sistema nervoso central (SNC) é responsável por 70% da putrescina formada a partir da espermidina (SPD), enquanto somente 30% da putrescina é formada pela descarboxilação da ornitina, sendo assim o ciclo de interconversão parece ser o sistema usual para a regulação das poliaminas, e a desaminação oxidativa é mais utilizada pelas células ricas em enzima DAO (Seiler *et al.*, 1985; Carter, 1994).

1.1.3 Sistemas de transporte

O transporte (captação e efluxo) é uma das principais maneiras de regular as quantidades intracelulares das poliaminas. As poliaminas são captadas por sistemas

saturáveis pelas células, eles requerem energia, são dependentes de temperatura, mediados por carreadores e operam contra um gradiente de concentração. O número de carreadores no sistema de transporte das poliaminas varia conforme o tipo de célula. (Igarashi & Kashiwagi, 2000; Morgan, 1998). Algumas células têm transportadores separados para putrescina, espermidina e espermina enquanto que em outras, todas as poliaminas são transportadas pelo mesmo carreador (Urdiales *et al.*, 2001).

As poliaminas encontram-se abundantemente e heterogeneamente distribuídas no sistema nervoso de mamíferos (Morrison *et al.*, 1995; Johnson, 1996). Poliaminas, por sua natureza polar, dificilmente atravessam a barreira hemato-encefálica intacta, entretanto o transporte de poliaminas através da barreira hemato-encefálica existe. De fato, cerca de 5% da concentração das poliaminas encontradas na corrente sangüínea passam para o encéfalo (Anderson *et al.*, 1975; Shin *et al.*, 1985). Diler e colaboradores (2002) sugerem que a passagem de poliaminas pode envolver carreadores em nível de barreira hemato-encefálica.

1.1.4 Função das Poliaminas

Como policátions carregados em pH fisiológico, as poliaminas interagem com ânions. Apenas uma pequena fração das poliaminas intracelulares, ocorre na forma livre. Estas interações eletrostáticas das poliaminas com os sítios aniônicos das macromoléculas são responsáveis pela maioria das funções das poliaminas (Jänne *et al.*, 2005).

Evidências indicam que as poliaminas têm importantes papéis fisiológicos. Dentre estes se destaca: modulação do crescimento e diferenciação celular (Tabor & Tabor, 1984), apoptose (Thomas & Thomas, 2001), estabilização do ADN e ARN (Igarashi & Kashiwagi, 2000), regulação da expressão gênica (Celano *et al.*, 1989), síntese de proteínas (Lenzen *et al.*, 1986, Yoshida *et al.*, 1999), estão envolvidas com sinalização celular (Johnson & McCormack, 1999; Bachrach *et al.*, 2001), diminuição da lipoperoxidação (Bellé *et al.*, 2004) e possuem específicas interações com canais iônicos (Williams, 1997a-b) tais como, canais de potássio (K^+)

retificadores de entrada, receptores AMPA (AMPA-R) permeáveis ao cálcio (Ca^{2+}), receptores cainato e o receptor *N*-metil-D-aspartato (NMDA-R) (Aizenman *et al.*, 2002; Mott *et al.*, 2003; Pellgrini-Giampietro, 2003). Além destas ações, está descrito que as poliaminas estão envolvidas nos processos de aprendizado e memória, como será relatado posteriormente no item 1.4 desta introdução.

Diversos estudos apontam para a modulação das poliaminas sobre o NMDA-R (Williams *et al.*, 1990, 1994, 1997a; Littleton *et al.*, 2001; Ran *et al.*, 2003). Espermina e SPD potencializam e inibem o NMDA-R por interagir com sítios extracelulares e com um sítio no canal deste receptor (Usherwood, 2000).

1.2 Receptor *N*-Metil-D-Aspartato (NMDA-R)

O receptor (NMDA-R, Fig. 3) é um dos principais subtipos de receptor glutamatérgico e está largamente distribuído nos neurônios do encéfalo de mamíferos (Dingledine *et al.*, 1990). É um canal iônico formado por subunidades heteroméricas: NR1, NR2 (A-D) e NR3 (A-B) (Yamakura & Shimoji, 1999; Prybylowski & Wenthold, 2004). Diferentes combinações destas subunidades conferem distintas funções e propriedades farmacológicas aos NMDA-R (Hollmann & Heinemann, 1994; Dingledine *et al.*, 1999). A subunidade NR1 determina a afinidade do co-agonista glicina (Honer *et al.*, 1998) e a subunidade NR2 e NR3 formam o sítio de ligação para o glutamato (Lynch *et al.*, 1994; Laube *et al.*, 1997; Matsuda *et al.*, 2002), modulam a permeabilidade ao Ca^{2+} , a condutância e sensibilidade ao magnésio (Mg^{2+}) (Reidel *et al.*, 2003). Resultados usando mutações sítio dirigidas, designados para procurar resíduos que podem contribuir para o sítio de ligação das poliaminas no NMDA-R identificaram alguns resíduos que influenciam nos efeitos das poliaminas (descritos no item 1.2.1). Resíduos de aminoácidos envolvidos na estimulação pelas poliaminas estão localizados na região amino terminal da subunidade NR1 (Igarashi & Kashiwagi, 2000). Receptores que expressam uma variante de edição (“splicing”) da subunidade NR1 com ausência da inserção do amino ácido 21 (NR1A) mostram a estimulação por poliaminas independente de glicina (Durand *et al.*, 1992, 1993). Os resíduos de aminoácidos

que estão envolvidos no bloqueio dependente de voltagem estão localizados ao redor do “loop” formado pelo poro e o primeiro e o terceiro segmento transmembrana (Masuko *et al.*, 1999). Além disso, Gallagher e colaboradores (1997) localizaram uma região na subunidade NR2B (amino ácidos 138-238) que regula a estimulação por poliaminas independente de glicina.

No potencial de repouso da membrana o NMDA-R é bloqueado pelo Mg^{2+} , este bloqueio é removido pela despolarização da membrana permitindo assim a ativação do receptor pelo agonista glutamato e pelo co-agonista glicina. Portanto, a passagem de íons (influxo de sódio Na^{2+} e Ca^{2+} e efluxo de K^{+}) pelo canal é ativada por neurotransmissor e dependente de voltagem (Nicoll *et al.*, 1988; Bear *et al.*, 2002).

O NMDA-R possui vários sítios regulatórios distintos para ligantes endógenos e exógenos que modulam a função do receptor. Dentre estes estão os sítios para ligação dos neurotransmissores endógenos, glutamato e glicina, o sítio para a ligação do Mg^{2+} . Outros sítios para modulação alostérica incluem sítios para agentes redox, prótons, zinco (Zn^{2+}), de fosforilação e para drogas que bloqueiam o canal iônico tais como, fenciclidina (PCP), piperidina (TCP), cetamina e (+)5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,b]-ciclohepteno-5-10-amino (MK-801) (Yamakura & Shimoji, 1999; Hynd *et al.*, 2004). Além disso, há sítios distintos no NMDA-R para poliaminas aos quais ao se ligarem, exercem diferentes efeitos sobre o receptor, como descrito a seguir.

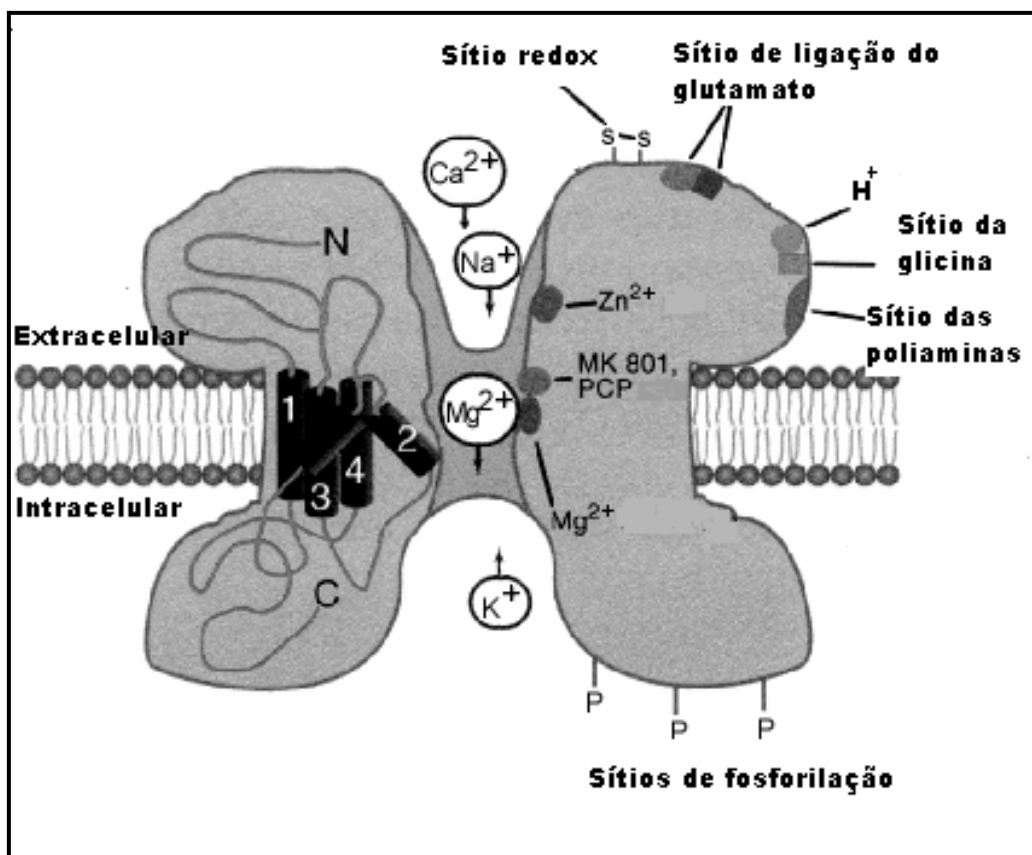


Fig. 3. Representação esquemática do receptor NMDA, adaptado de Zigmond *et al.*, 1999.

1.2.1 Receptor NMDA e Poliaminas

O efeito das poliaminas sobre o NMDA-R foi primeiro relatado por Ransom e Stec em 1988, que mostrou que espermina e SPD aumentam a ligação do [³H] MK-801 no NMDA-R na presença ou na ausência de concentrações saturantes de glutamato e glicina. Além disso, foi demonstrado que a espermina potencializa a ação destes aminoácidos por melhorar a ligação do [³H] MK-801, sendo assim as poliaminas foram denominadas agonistas do NMDA-R (Ransom & Stec, 1988). Em concordância com esses achados, estudos eletrofisiológicos demonstram que espermina melhora as correntes induzidas através do NMDA-R em culturas de neurônios (Williams *et al.*, 1990). As poliaminas atuam sobre o NMDA-R de maneira bifásica, ou seja, em baixas concentrações potencializam a ligação do [³H] MK-801 no NMDA-R, aumentando a condutância e a frequência de abertura do canal, enquanto que em altas concentrações inibem a ligação do [³H] MK-801. Estes

efeitos podem ser mediados pela ligação das poliaminas em sítios distintos no NMDA-R (Ransom & Stec, 1988; Reynolds & Miller, 1989; Williams 1989, 1997a, 1997b).

A ação das poliaminas sobre o NMDA-R consiste em componentes estimulatórios e inibitórios. Quatro efeitos diferentes são propostos para a ação das poliaminas sobre o NMDA-R (Figura 4).

1- estimulação independente de glicina: as poliaminas aumentam as correntes induzidas pelo glutamato na presença de concentrações saturantes de glicina.

2- estimulação dependente de glicina: as poliaminas aumentam a afinidade do receptor pela glicina na presença de concentrações sub-saturantes de glicina.

3- inibição dependente de voltagem: por diminuição na condutância do canal, devido ao seu caráter catiônico. As poliaminas bloqueiam a entrada do poro ou no interior do canal aberto como faz o Mg^{2+} .

4- inibição da afinidade do receptor pelo glutamato.

Estudos eletrofisiológicos sugerem que o estímulo causado pelas poliaminas pode estar ligado com uma diminuição da inibição realizada por prótons (indicado pelo número 5 na figura 4) (Traynelis *et al.*,1995; Gallagher *et al.*,1997). Estes efeitos das poliaminas sobre o receptor NMDA são dependentes do potencial de ação e das concentrações de glutamato e de glicina, bem como da composição molecular do NMDA-R (Williams, 1994).

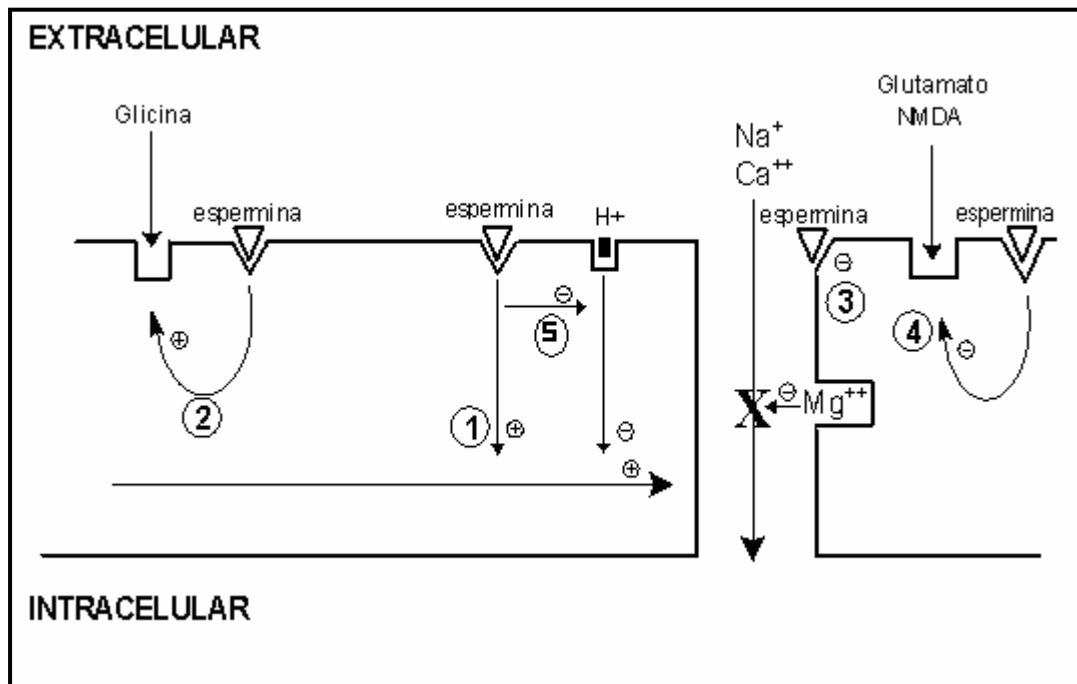


Fig.4. Esquema das ações modulatórias da espermina sobre o receptor NMDA (adaptado de Williams, 1997b). + Ação estimulatória das poliaminas; – ação inibitória das poliaminas.

O NMDA-R desempenha uma variedade de funções no sistema nervoso central, ele está envolvido em importantes funções fisiológicas tendo um papel central na plasticidade sináptica e formação de sinapses que implicam em processos de aprendizagem e memória (Pláteník *et al.*, 2000; Daoudal & Debanne, 2003). Além disso, acredita-se que a ativação do NMDA-R durante os pareamentos CS-US (estímulo condicionado-estímulo incondicionado) tem como alvos mudanças neurais das quais dependem as memórias; assim a contribuição do NMDA-R em memórias associativas é reconhecida (Walker & Davis, 2004).

1.3 Memória

Nossas memórias fazem de nós quem somos. Elas podem refletir uma infinita variedade de coisas; de “flashbacks” de eventos de nossa infância a habilidade de

lembrar o enredo de um livro mesmo muitos anos após lê-lo, da facilidade com a qual encontramos a nossa casa e habilidades musicais. A memória permite que os seres humanos e animais beneficiem-se da experiência passada para resolver problemas. Proporciona a eles diversas aptidões, desde o simples reflexo condicionado, até a lembrança de episódios (Dityatev & Bolshakov, 2005). Dessa forma apropriadamente Izquierdo, (2002) relata: “somos aquilo que recordamos e também somos aquilo que resolvemos esquecer”.

A diversidade de memórias baseia-se no tripé; aquisição, armazenamento e evocação de informações (Abel & Lattal, 2001; Izquierdo, 2002; 2004).

1.3.1 Tipos de memória

As memórias podem ser classificadas de acordo com o tempo que duram e com seu conteúdo, existindo uma correlação entre estas memórias e as zonas cerebrais que intervêm em sua formação e talvez em seu armazenamento (Squire & Zola, 1996).

Do ponto de vista da duração as memórias podem ser classificadas em memória de trabalho, de curta e de longa duração. A memória de trabalho é breve e fugaz, gerencia a realidade mantendo a informação de alguns segundos a, no máximo, alguns minutos, até que esta seja processada. Ela é processada fundamentalmente no córtex pré-frontal, dependendo apenas da atividade elétrica dos neurônios (Curtis & D'Esposito, 2003). A memória de curta duração (minutos ou poucas horas) permite suprir os processos mnemônicos enquanto a memória definitiva não foi ainda construída. A fase em que só temos completa a memória de curta duração e a de longa duração ainda não está fixada, é uma fase lábil e sensível a fármacos, traumatismos e até mesmo a outras memórias. As memórias de longa duração são aquelas que podem ser recordadas durante dias, meses ou anos após terem sido consolidadas (armazenadas) (Ranganath & Blumenfeld, 2005). Quanto ao conteúdo as memórias podem ser divididas em declarativas e não-declarativas. As memórias declarativas são aquelas acessíveis à consciência adquiridas de forma explícita (Squire & Zola, 1996). Elas são fáceis de formar, mas também facilmente

esquecidas. As memórias declarativas dividem-se em subcategorias: a memória semântica, a memória episódica (Ashby & O'Brien, 2005).

As memórias semânticas são as memórias de informações gerais e as memórias episódicas que são as memórias de eventos específicos (Stickgold, 2005); as estruturas do lobo temporal medial, especialmente o hipocampo são importantes para a formação destas memórias (Eichenbaum, 2000). Memórias não-declarativas ou memórias de procedimentos são aquelas que utilizamos sem recordação consciente, adquiridas de forma implícita (Stickgold, 2005). São as memórias de habilidades motoras ou sensoriais que comumente chamamos de “hábitos”, os reflexos e associações emocionais. As estruturas encefálicas comumente envolvidas na formação destas memórias são: estriado, cerebelo e amígdala (Squire & Zola, 1996; Bear *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2003).

1.3.2 Medo Condicionado

As memórias que são adquiridas por meio de associações foram primeiramente descritas pelo psicólogo russo Ivan Pavlov no início do século XX e denominadas condicionamento pavloviano ou clássico ou ainda medo condicionado (Schafe *et al.*, 2001; Maren, 2005). Em um experimento típico de medo condicionado um estímulo condicionado (CS) neutro como um tom é pareado com um estímulo incondicionado (US) aversivo como um choque nas patas. Quando esta associação é aprendida, o animal responde ao estímulo condicionado com uma resposta comportamental defensiva; ele pára de se mover, congelando os movimentos (“freezing”), seu pêlo fica eriçado, sua pressão sanguínea e batimentos cardíacos aumentam (Figura 5). Estas memórias de medo podem persistir por meses, anos ou até por toda vida (Maren, 2005). O CS pode ser unimodal, envolvendo somente uma modalidade sensorial ou dica tais como um som, cheiro ou luz ou multimodal envolvendo algumas modalidades sensoriais tais como o contexto (Dityatev & Bolshakov, 2005).

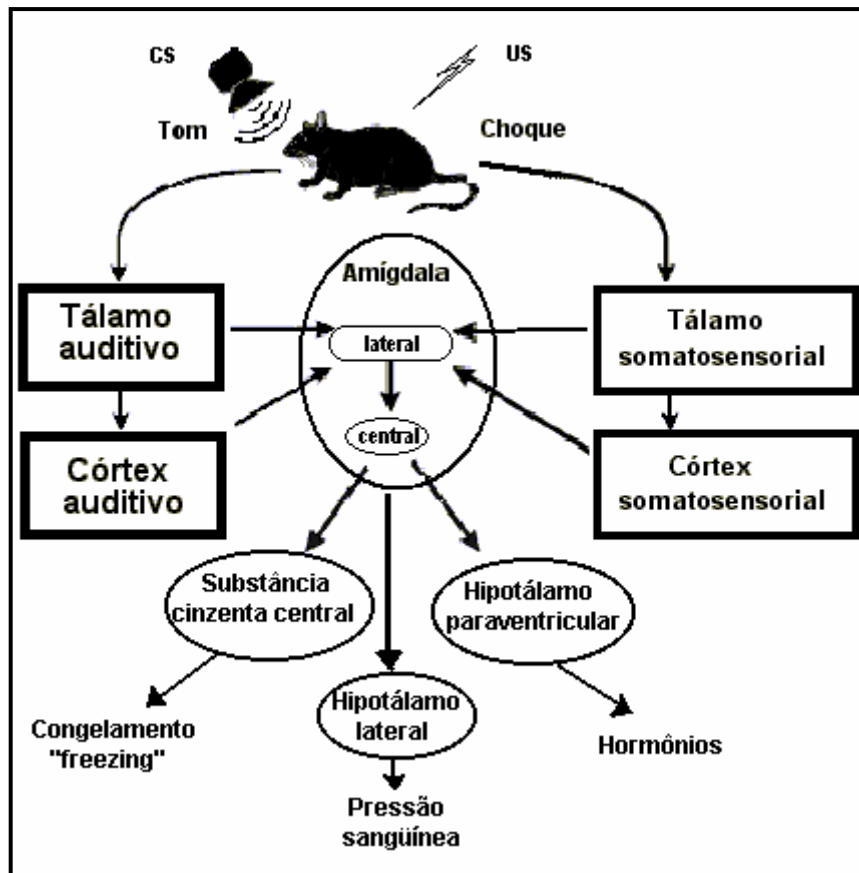


Fig. 5. Circuitos neurais para o medo condicionado. Os CS e US chegam na amígdala através do núcleo lateral onde ocorre a associação destes estímulos. Este núcleo é interconectado com o núcleo central da amígdala o qual envia projeções para vários centros somatomotores e autonômicos que controlam a expressão das respostas do medo e respostas relacionadas com o sistema nervoso autonômico e endócrino, via projeções para o tronco cerebral e hipotálamo (adaptado de Sirgurdsson *et al.*, 2006).

Evidências farmacológicas e neurofisiológicas indicam que a amígdala, um núcleo em forma de noz localizado profundamente no lobo temporal, é fundamental para a aquisição, consolidação e expressão das memórias de medo, sendo assim a amígdala é um componente crítico para o circuito do medo condicionado (Fendt & Fanselow, 1999; Maren, 2001). Informações auditivas e somatosensoriais representando o CS e US, respectivamente, alcançam o núcleo lateral da amígdala de ambas as fontes talâmicas e corticais. Dentro da amígdala, neurônios individuais respondem aos estímulos auditivos e somatosensoriais, sugerindo convergência de

entradas do CS e US a nível celular. Depois das informações serem processadas pelo núcleo lateral da amígdala a informação sensorial é enviada para o núcleo central da amígdala, que envia projeções da amígdala para áreas de tronco encefálico e hipotálamo que controlam a expressão de comportamentos defensivos, secreção hormonal e respostas autônomas como o comportamento de congelamento e o aumento da pressão sanguínea (Dityatev & Bolshakov, 2005; Kim & Jung, 2006; Sigurdsson *et al.*, 2006). A amígdala desempenha um papel central no condicionamento de medo, uma vez que as respostas ao medo condicionado são eliminadas pela lesão bilateral da amígdala. Já o hipocampo codifica os componentes declarativos (contextuais) do condicionamento do medo (McGaugh, 2004; Sanders *et al.*, 2003; Dityatev & Bolshakov, 2005). Um modelo de medo condicionado, como qualquer modelo animal de aprendizado e memória, possui diversas etapas relacionadas aos processos mnemônicos de aquisição, consolidação, evocação e extinção ou reconsolidação (McGaugh, 2000; Garelick & Storm, 2005) todas passíveis de manipulação farmacológica e com grande importância biológica. Assim, as memórias podem ser prejudicadas ou melhoradas durante o período de consolidação com manipulações após o treino que interfiram nos processos de formação da memória (Abel & Lattal, 2001; Schenberg *et al.*, 2005).

As respostas emocionais a situações aversivas, constrangedoras ou ameaçadoras são bastante comuns em seres humanos e possuem grande importância para os indivíduos. No entanto, em certos momentos elas podem se tornar exageradas ou começarem a ocorrer em situações inapropriadas, caracterizando um distúrbio de ansiedade, tal como o Transtorno de Estresse Pós-Traumático (Ledoux, 1998). O Transtorno de Estresse Pós-Traumático ocorre quando um indivíduo presenciou, vivenciou ou tomou conhecimento de um fato traumático e este passa a ser persistentemente revivenciado na forma de imagens, pensamentos, percepções, sonhos ou recordações angustiantes, intensa reatividade fisiológica ou psicológica podem estar presentes à lembrança do evento; esquiva persistente de estímulos associados com o trauma; sintomas persistentes de excitabilidade aumentada devem estar presentes desde o trauma. A perturbação causa sofrimentos clinicamente significativos no funcionamento social ou

ocupacional, ou em outras áreas importantes na vida do indivíduo (Quevedo *et al.*, 2003). Diversas similaridades relacionam os sintomas de ansiedade em seres humanos à expressão de comportamentos defensivos em animais, já que assim como os humanos, os animais de laboratório tendem a apresentar comportamentos defensivos evidentes em situações potencialmente ameaçadoras (Borsini *et al.*, 2002). O condicionamento pavloviano ou medo condicionado pode ser utilizado para investigar os mecanismos de aprendizado e memória nos mamíferos e para o conhecimento das origens dos distúrbios relacionados ao medo em humanos (Kim & Jung, 2006).

1.3.3 Noções sobre a formação da memória

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

Estudos em modelos animais têm mostrado que a formação da memória envolve uma série de alterações bioquímicas em várias áreas do sistema nervoso central (SNC) (Figura 6). A formação das memórias começa com a liberação do neurotransmissor glutamato das vesículas pré-sinápticas de um neurônio ativado. Uma vez liberado o glutamato une-se aos receptores glutamatérgicos do tipo AMPA no neurônio pós-sináptico, permitindo a entrada de íons Na^{2+} na célula produzindo

despolarização. Como consequência da despolarização o íon Mg^{2+} desobstrui o poro do NMDA-R, que passa a responder ao glutamato, permitindo a entrada de íons Ca^{2+} na célula. Os receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGlu-R) também podem ser ativados liberando Ca^{2+} das reservas intracelulares (Izquierdo & Medina, 1995; Abel & Lattal, 2001).

O aumento da concentração de Ca^{2+} ativa proteínas-quinases. Elas ativam enzimas produtoras de mensageiros retrógrados como óxido nítrico sintase que sintetiza óxido nítrico (ON). Essas substâncias difundem-se através das membranas até a pré-sinapse onde aumentam a liberação do glutamato melhorando a eficiência da sinapse (Medina & Izquierdo, 1995). A ativação da proteína quinase dependente de Ca^{2+} (PKC), e a proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina do tipo II (CaMKII) favorece a fosforilação dos receptores glutamatérgicos melhorando a eficácia dos mesmos. A proteína quinase A (PKA) tem papel importante nos primeiros minutos após a aquisição da memória e 2-6 horas mais tarde. A PKA e a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) fosforilam a CREB (proteína ligante do elemento responsivo ao AMPc) nuclear ativando vários genes que induzem a síntese de várias proteínas essenciais para a memória (McGaugh, 2000; Izquierdo, 2002; Carlezon *et al.*, 2005; Mizuno & Giese, 2005).

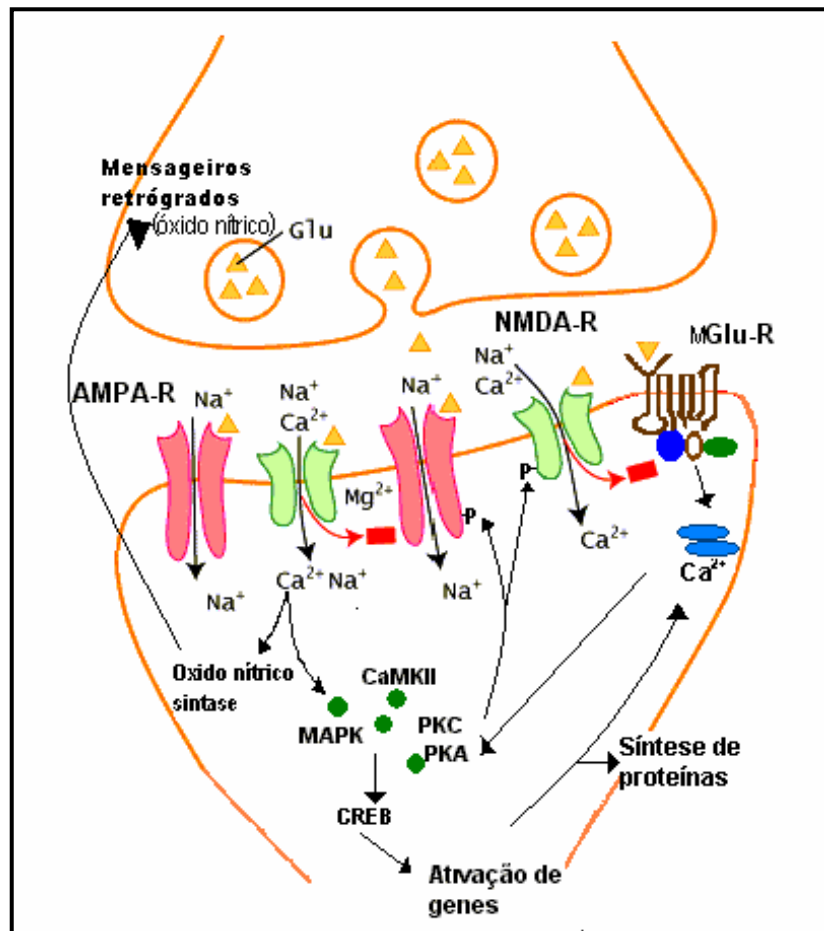


Fig. 6. Cascata de reações desencadeadas no processo de formação de memórias. Ca^{2+} -íons cálcio, Na^+ -íons sódio, Mg^{2+} -íons magnésio, PKC- proteína quinase dependente de Ca^{2+} , CaMKII- proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina do tipo II, PKA- proteína quinase A, MAPK- proteína quinase ativada por mitógeno, NMDA-R- receptor *N*-metil-D-aspartato, mGlu-R- receptores glutamatérgicos metabotrópicos, AMPA-R- receptor ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico, Glu- glutamato, CREB- proteína ligante do elemento responsivo ao AMPc (ver texto para mais detalhes).

1.3.4 Papel do NMDA-R na memória

Inúmeras evidências confirmam o papel fundamental dos NMDA-R nos processos de aprendizagem e memória. Os níveis de expressão dos NMDA-R declinam, em determinadas regiões, com o envelhecimento dos animais (Clayton & Browning, 2001). Além disso, a ligação do glutamato marcado ao NMDA-R encontra-

se diminuída em ratos velhos e em pacientes com doença de Alzheimer (Greenamyre *et al.*, 1987; Ulas *et al.*, 1992). Estas alterações comprometem a plasticidade sináptica e podem ser responsáveis pelo declínio na memória. Também, ratos com alta capacidade de aprendizado apresentam aumento nos níveis de NMDA-R no hipocampo (Stecher *et al.*, 1997; Riedel *et al.*, 2003).

A administração de antagonistas do NMDA-R provoca prejuízo no desempenho de diversas tarefas de memória. Por exemplo, podemos citar que a administração de MK-801 e AP5, prejudicam a formação da memória em diversas tarefas (Morris *et al.*, 1986; Izquierdo *et al.*, 1992; Castellano *et al.*, 1999; Roesler *et al.*, 2000; Lima *et al.*, 2005).

Por outro lado, agonistas do NMDA-R, 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 esquivas inibitória e de camundongos no labirinto em T respectivamente (Flood *et al.*, 1990).

As poliaminas como ligantes endógenos do NMDA-R exercem um importante papel na modulação da memória.

1.4 Poliaminas e memória

Alguns estudos relatam o envolvimento das poliaminas na modulação da memória em diferentes tarefas (Shimada *et al.*, 1994; Kishi *et al.*, 1998a; Kishi *et al.*, 1998b; Meyer *et al.*, 1998; Conway, 1998; Rubin *et al.*, 2000, 2001, 2004; Berlese *et al.*, 2005, Guerra *et al.*, 2006) Altas doses de poliaminas (125-250 nmol), administradas por via intracerebroventricular, causam dano hipocampal e déficit de aprendizado na tarefa do labirinto aquático de Morris (Conway, 1998). Além disso, Shimada e colaboradores (1994) descreveram que a espermidina potencializa a piora da memória, no labirinto de 14 braços em T, induzida por MK-801. Estas evidências sugerem que altas doses de poliaminas são neurotóxicas e, portanto pioram a memória. Por outro lado, baixas doses de espermidina são efetivas para atenuar o déficit de memória induzido por antagonistas do NMDA-R (MK-801 e CPP) bem como, por antagonistas muscarínico, glutamatérgico metabotrópico e um

antagonista do sítio da glicina no NMDA-R (Kishi *et al.*, 1998a, b; Meyer *et al.*, 1998; Nishiga & Kamei, 2003).

Além disso, a administração de SPD, intra-hipocampal ou intra-amígdala imediatamente após o treino, melhora o desempenho dos ratos na tarefa de esQUIVA inibitória, de forma tempo-dependente, uma vez que a SPD melhora a aquisição e a consolidação recente, mas não altera a consolidação tardia e a evocação da memória (Rubin *et al.*, 2000, 2001; Berlese *et al.*, 2005; Guerra *et al.*, 2006). Da mesma forma, a administração de SPD intra-amígdala pré e pós-treino melhora a memória dos ratos na tarefa de medo condicionado (Rubin *et al.* 2004). Este efeito facilitatório da SPD sobre a memória parece depender da atividade da enzima óxido nítrico sintase hipocampal e da produção de óxido nítrico, uma vez que a administração intra-hipocampal de N^G - Nitro -L-arginina metil éster (L-NAME), um inibidor não específico da enzima óxido nítrico sintase, imediatamente depois do treino previne a melhora da memória causada por SPD na tarefa de esQUIVA inibitória. A SPD aumenta os níveis de nitrato e nitrito e a co-administração de L-NAME e SPD previne este efeito (Guerra *et al.*, 2006). Mikolajczak e colaboradores (2002) também demonstraram que a SPD melhora a memória de curta duração em ratos quando administrada sistemicamente (i.p.) na tarefa de reconhecimento social.

Por outro lado, a ARC, antagonista do sítio das poliaminas no NMDA-R, administrado intra-amígdala prejudica o desempenho dos ratos nas tarefas de esQUIVA inibitória e medo condicionado. A utilização de uma dose de ARC que não possui efeito *per se* sobre a memória reverte o efeito facilitatório sobre a memória causada pela SPD nas tarefas de esQUIVA inibitória e medo condicionado (Rubin *et al.*, 2000, 2001, 2004). Outro antagonista do sítio das poliaminas no NMDA-R, ifenprodil, administrado por via intra-amígdala e intraperitoneal prejudica o desempenho dos ratos na tarefa de medo condicionado (Rodrigues *et al.*, 2001) e a sua administração intracerebroventricular, reverte o efeito facilitatório da SPD sobre a memória (Tadano *et al.*, 2004).

O principal alvo do estudo das bases neuroquímicas envolvidas na aprendizagem e memória é o desenvolvimento de terapias que possam ajudar a melhorar as funções cognitivas, especialmente a memória. Esta abordagem poderia ser útil terapêuticamente quando estas funções estão prejudicadas, tanto em situações fisiológicas, como o esquecimento benigno de senescência, quanto em casos patológicos, como na doença Alzheimer ou na doença de Urbach-Wiethe

(Markowitsch *et al.*, 1994; Huemer, 1999; Squire & Kandel, 2003). Além disso, especula-se a utilização de estimulantes da memória, denominadas drogas inteligentes (“smart drugs”) ou nootrópicas em indivíduos saudáveis para melhorar suas funções cognitivas (Rose, 2002; Gerlai, 2003). Neste contexto, o inibidor da acetilcolinesterase donepezil mostrou-se eficaz tanto em pacientes com doença de Alzheimer como em sujeitos normais (Matthews *et al.*, 2002; Yesavage *et al.*, 2002). Por outro lado, fármacos que possam piorar a consolidação das memórias do medo poderiam ser úteis na prevenção do Transtorno do Estresse Pós-traumático (O’Brien & Nutt, 1998; Walker *et al.*, 2002; Graeff, 2003).

Embora já seja conhecido o envolvimento do NMDA-R nos processos de aprendizagem e memória e sua modulação por agonistas e antagonistas do sítio das poliaminas sobre o NMDA-R, pouco se sabe a respeito da influência da administração sistêmica de poliaminas sobre as memórias, especialmente sobre as memórias aversivas como medo condicionado.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o efeito da administração intraperitoneal das poliaminas (ARC e SPD) assim como do MK-801 sobre a fase de consolidação da memória em ratos utilizando o teste do medo condicionado.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da administração intraperitoneal de ARC (imediatamente, 60, 180 e 360 minutos pós-treino) sobre a consolidação da memória em ratos, utilizando a tarefa de medo condicionado.
- Examinar o efeito da administração intraperitoneal de SPD (imediatamente pós-treino) sobre a memória em ratos, utilizando a tarefa do medo condicionado.
- Avaliar o efeito da administração intraperitoneal (imediatamente pós-treino) de MK-801, antagonista não-competitivo do receptor NMDA, sobre a consolidação da memória na tarefa de medo condicionado em ratos.
- Avaliar o efeito da co-administração intraperitoneal de MK-801 e de SPD (imediatamente pós-treino) sobre a consolidação da memória na tarefa de medo condicionado em ratos.
- Avaliar o efeito da co-administração intraperitoneal de ARC e de SPD (imediatamente pós-treino) sobre a consolidação da memória na tarefa de medo condicionado em ratos.

3. MANUSCRITO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito, o qual se encontra aqui organizado. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio manuscrito. A apresentação está baseada na versão submetida à publicação, no periódico *Psychopharmacology*, o qual se encontra em fase de revisão.

3.1 Systemic administration of polyaminergic agents modulate fear conditioning in rats. Keli Camera, Carlos Fernando Mello, Ana Paula Chiapinotto Ceretta, Maribel Antonello Rubin

Keli Camera, Carlos Fernando Mello, Ana Paula Chiapinotto Ceretta,
Maribel Antonello Rubin

Systemic administration of polyaminergic agents modulate fear conditioning in rats

K. Camera, A.P.C. Ceretta, M.A. Rubin (Corresponding author)

Laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia,
Centro de Ciências Naturais e Exatas, Departamento de Química,
Universidade Federal de Santa Maria,
Santa Maria, 97105-900 RS, Brazil
e-mail: marubin@smail.ufsm.br
Fax: + 55 55 3220 8031

C.F. Mello

Laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia,
Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Fisiologia e Farmacologia,
Universidade Federal de Santa Maria,
Santa Maria, 97105-900 RS, Brazil

Acknowledgements:

The authors thank Dr. Juliano Ferreira for the helpful suggestions and Dr. Susan Barron for a critical reading of the manuscript. This study was supported by CNPq (475131/04-5, 500120/2003-0, 505965/2003-8, 505527/2004-9). K Camera is recipient of a CAPES fellowship. CF Mello and MA Rubin are recipients of CNPq productivity fellowships. All the experiments comply with the current laws of Brazil.

Abstract *Rationale:* The polyamines putrescine, spermine and spermidine are a group of aliphatic amines that physiologically modulate the N-methyl-D-aspartate receptor (NMDA receptor), a glutamate receptor implicated in memory formation. *Objectives:* Given the potential application of these drugs in the treatment of memory disorders, we investigated whether agonists and/or antagonists of the NMDA receptor polyamine binding site alters the memory of fear conditioning, and determined the time window in which fear conditioning is modulated by polyaminergic agents given by the systemic route. *Results:* Post-training intraperitoneal administration of spermidine (10-100 mg/kg) immediately after training increased, whereas arcaine (10 mg/kg) and MK-801 (0.01-0.1 mg/kg) decreased contextual and auditory fear conditioning. Arcaine and MK-801, at doses that had no effect per se, reversed the facilitatory effect of spermidine. Memory of fear conditioning was impaired by polyaminergic blockade up to 180 min, but not at 360 min after training. *Conclusion:* These results provide evidence that systemic administration of polyamine binding site ligands modulate early consolidation of fear-conditioning.

Keywords: Fear conditioning; Polyamines; Spermidine; Arcaine; Memory; NMDA receptor; MK-801; Posttraumatic stress disorder

Introduction

The polyamines putrescine, spermine and spermidine are present in almost all cells, but at particularly high concentrations in the vertebrate nervous system, including cerebral structures known to participate in memory formation, such as the amygdala and hippocampus (Morrison et al. 1995). In fact, electrophysiological and neurochemical evidence suggest that polyamines modulate α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate (AMPA) (Pellegrini-Giampietro 2003; Stromgaard and Mellor 2004) and N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors (Ransom and Stec 1988; McGurk et al. 1990; Sacaan and Johnson 1990; Sprosen and Woodruff 1990), which are excitatory ionotropic glutamate receptors implicated in learning and memory (Sprosen and Woodruff 1990; Izquierdo et al. 2000; Cammarota et al. 2004; Jasnow et al. 2004; Stote and Fanselow, 2004; Walker and Davis 2004).

A convincing body of pharmacological evidence indicates that polyamines modulate acquisition and/or early consolidation of inhibitory avoidance (Rubin et al. 2000; Rubin et al. 2001) and fear conditioning (Rubin et al. 2004) tasks. Accordingly, immediately post-training intrahippocampal and intra-amygdala administration of low doses of spermidine, an agonist at the polyamine binding site of the NMDA receptor, improves memory of the inhibitory avoidance (Rubin et al. 2000, 2001) and fear conditioning tasks (Rubin et al. 2004). It has also been shown that the facilitatory effect of low doses of spermidine on memory of the inhibitory avoidance task is restricted to the acquisition and early consolidation phases of memory, since late consolidation and retrieval are not affected by spermidine (Berlese et al. 2005). Interestingly, the facilitatory effects of spermidine are antagonized by minute amounts of arcaïne, an antagonist of the NMDA receptor

polyamine binding site, suggesting that the NMDA receptor is involved in the memory improvement induced by spermidine (Rubin et al. 2000, 2001, 2004).

The injection of arcaine into the amygdala, at doses higher than those required to block the facilitatory effects of spermidine, impairs memory of the inhibitory avoidance and fear conditioning (Rubin et al. 2004) tasks, suggesting the existence of an endogenous “polyaminergic tonus” that physiologically modulates memory processing in this CNS structure.

One of the main objectives of investigating the underlying neurochemical mechanisms of memory is to develop drugs that might be helpful to treat not only conditions associated with memory deficits, but also those states in which the intrusive recurrent recall of a traumatic event causes its re-experience and disruption of normal life, such as the post-traumatic stress disorder (Turnbull, 1998; Shalev, 2001). In either case, it would be optimal that these drugs should cause the desired effect when given via the systemic route. Given the potential application of these drugs in the treatment of memory disorders, we investigated whether agonists and/or antagonists of the NMDA receptor polyamine binding site alters the memory of fear conditioning, and determined the time window in which fear conditioning is modulated by polyaminergic agents given by the systemic route.

Materials and Methods

Animals

A total of 211 experimentally naive male Wistar rats (220–260 g) bred in our animal house were housed five to a cage on a 12-h light/dark cycle (lights on at 7:00 a.m.)

at a temperature of 21°C with *ad libitum* access to water and standard laboratory chow (Guabi, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil). All experimental procedures were conducted between 9:00 and 16:00h. 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.

Apparatus

Training and contextual fear testing took place in identical observation chambers (30 X 25 X 25 cm), located in a well-lit room (room A) with ventilation fans producing a background noise of 70 dB. The front wall and ceiling of the chamber were made of clear acrylic plastic, whereas the lateral and rear walls were made of opaque plastic. The floor of the chamber consisted of 32 stainless steel rods (3 mm diameter), spaced 1 cm apart and wired to a shock generator. The chamber was cleaned with an acetic acid 1% solution before and after each rat occupied it. Tone testing took place in a different room (room B) using a chamber that differed in shape and size. This chamber was triangular (size, 23 cm each wall) and had its floor covered with linoleum. The lateral walls of the chamber were made of wood, whereas the front wall was made of translucent acrylic plastic to allow observation of the animals. There was no background noise. The cage was cleaned with 30% ethyl alcohol before and after each rat occupied it.

Fear conditioning

Each animal was subjected to a single fear-conditioning training session as described previously (Fanselow and Kim, 1994). In brief, the rat was placed in the

conditioning chamber of room A and habituated to the apparatus for 3 min. Immediately thereafter, the rats received three presentations of a CS (90 dB sound at 2000 Hz) for 10 sec, followed immediately by an US (0.6 mA footshock) for 1 sec. The shocks were 40 sec apart. The stimulus strength and number of presentations CS/US pairs were chosen according to Rubin et al. (2004). After the last CS/US pairing, rats were allowed to stay in the chamber for another 60 s before returning to their home cages.

On the following day, each rat was placed back in the cage in room A, where it was trained the day before, and an 8 min test was performed. During this time neither shock nor tone was given. Using a time sampling procedure, the rat was observed every 4 s to assess whether it was in freezing, or not, by a trained observer who was unaware of the experimental treatment conditions. Behavior was judged as freezing if there was an absence of any visible movement, except for that necessitated by respiration. The percentage of samples scored as freezing during this 8 min was taken as a contextual fear-conditioning measure.

On the second day of testing, the rats were placed into the chamber into room B and habituated to this new chamber for 3 minutes. During this time freezing without tone was recorded. After the 3 min period of habituation, the tone (2000 Hz; 90 dB) was presented continuously for 8 min, and the percentage of samples scored as freezing was recorded, as described above. The percentage of samples scored as freezing in the presence of tone was taken as an auditory fear-conditioning measure.

Treatments

The animals received intraperitoneal injections of vehicle (50 mM PBS, pH 7.4), *N*-[3-aminopropyl]-1.4-butanediamine trihydrochloride (spermidine; 1.0-100 mg/kg; Sigma, St. Louis, MO), MK-801 (dizolcipine; 0.001-0.1 mg/kg; Sigma, St. Louis, MO), 1.4-diguanidinobutane sulfate (arcaine; 0.1-10 mg/kg; Sigma, St. Louis, MO), spermidine (100 mg/kg) and MK-801 (0.001 mg/kg) or spermidine (100 mg/kg) and arcaine (0.1 mg/kg). Injections were performed immediately after training, in a 1.0 ml/kg injection volume. In the experiments designed to study the effect of arcaine and MK-801 on the facilitatory effect of spermidine on freezing, the 2 compounds (spermidine and antagonist) were administered i.p., separately, in the right and left flanks, respectively. In the experiment designed to evaluate the time window in which arcaine modulates fear conditioning, arcaine was administered 0, 60, 180, or 360 min after training.

Statistics

The data were converted to the percentage of samples scored as freezing and analyzed by one- or two-way ANOVA, depending on the experimental design, followed by post hoc analyses (Student-Newman-Keuls test).

Results

Figures 1a and 1b show the effects of post-training administration of spermidine (1-100 mg/kg, i.p.) on freezing to context and to tone, respectively. Statistical analysis (one-way ANOVA) revealed a significant effect of spermidine on contextual freezing ($F(3,40) = 4.19$; $p < 0.05$; Fig.1a) and on freezing to tone ($F(3,40) = 5.04$; $p < 0.05$; Fig. 1b). *Post hoc* analysis (Student-Newman-Keuls test) revealed that 10-100 mg/kg of spermidine facilitated contextual and auditory fear conditioning.

Figures 2a and 2b show the effect of post-training administration of MK-801 (0.001-0.1mg/kg, i.p.), on freezing to context and to tone, respectively. Statistical analysis (one-way ANOVA) revealed that MK-801 decreased freezing to the context CS ($F(3,31) = 12.64; p < 0.05$; Fig. 2a) and freezing to the tone CS ($F(3,31) = 4.74; p < 0.05$; Fig. 2b). *Post hoc* analysis (Student-Newman-Keuls test) showed that 0.01 and 0.1 mg/kg of MK-801 impaired contextual fear conditioning, whereas administration of 0.1 mg/kg of MK-801 impaired auditory fear conditioning.

Figures 3a and 3b show the effect of post-training administration of arcaine (0.1-10 mg/kg, i.p.) on freezing to the context and to the tone, respectively. Statistical analysis (one-way ANOVA) revealed that arcaine decreased freezing to context ($F(3,46) = 5.71; p < 0.05$; Fig. 3a) and freezing to tone ($F(3,46) = 3.12; p < 0.05$; Fig. 3b). *Post hoc* analysis (Student-Newman-Keuls test) showed that 10 mg/kg of arcaine impaired contextual and auditory fear conditioning.

Figures 4a and 4b show that the administration of MK-801, at the dose that had no effect per se (0.001 mg/kg, i.p.), reversed the facilitatory effect of spermidine (100 mg/kg, i.p.) on freezing to context (significant spermidine or PBS x MK-801 or PBS interaction: $F(1,25) = 12.87; p < 0.05$; Fig. 4a) and on freezing to tone (significant spermidine or PBS x MK-801 or PBS interaction: $F(1,25) = 5.11; p < 0.05$; Fig. 4b), suggesting that the facilitatory effect of spermidine may involve the NMDA receptor.

Figures 5a and 5b show that the administration of arcaine, at the dose that had no effect per se (0.1 mg/kg, i.p.), reversed the facilitatory effect of spermidine (100 mg/kg, i.p.) on freezing to context (significant spermidine or PBS x arcaine or PBS interaction: $F(1,49) = 4.27; p < 0.05$; Fig. 5a) and on freezing to tone (significant spermidine or PBS x arcaine or PBS interaction: $F(1,49) = 11.49; p < 0.05$; Fig. 5b),

suggesting that the facilitatory effect of spermidine may involve the polyamine-binding site at the NMDA receptor.

Figures 6a and 6b show the effect of the injection of arcaine (10 mg/kg) 0, 60, 180 or 360 min after training, on freezing to context and to tone, respectively. Statistical analysis (two-way ANOVA) revealed that arcaine decreased freezing to context ($F(3,76) = 3.05$; $p < 0.05$; Fig. 6a) and freezing to tone ($F(3,76) = 3.87$; $p < 0.05$; Fig. 6b). *Post hoc* analysis (Student-Newman-Keuls test) showed that arcaine impaired contextual and auditory fear conditioning when administered 0, 60 or 180 min after training.

The post-training administration of spermidine, arcaine or MK-801 did not alter freezing in the novel context (room B) without tone (Table 1). This finding indicates that freezing during the tone was in response to tone and not due to generalization across context.

Discussion

In this study we showed, for the first time, that while the systemic administration of the polyamine spermidine improves the consolidation of fear conditioning, the administration of arcaine, an antagonist of the polyamine binding site at the NMDA receptor, impairs it. In addition, systemic injections of arcaine and MK-801, at doses that have no effect on fear conditioning consolidation *per se*, prevented the facilitatory effect of spermidine on fear conditioning, further supporting a role for NMDA receptors in the effects of spermidine.

This facilitatory effect of systemically injected spermidine on memory is in agreement with the view that polyamines modulate memory (Kishi et al. 1998b, a;

Meyer et al. 1998; Rubin et al. 2000, 2001; Mikolajczak et al. 2002; Nishiga and Kamei, 2003; Rubin et al. 2004; Tadano et al. 2004; Berlese et al. 2005; Guerra et al. 2006). In fact, it has been demonstrated that intra-hippocampus and intra-basolateral amygdala administration of spermidine improves the consolidation of inhibitory avoidance and fear conditioning tasks, respectively (Rubin et al. 2000, 2001, 2004; Berlese et al. 2005; Guerra et al. 2006). In addition, the intracerebroventricular administration of spermidine antagonizes 7-chlorokynurenic acid-induced working memory deficits (Nishiga and Kamei, 2003) in the radial maze and attenuates the memory impairment induced by olfactory bulbectomy in the passive avoidance task (Tadano et al. 2004). Interestingly, female transgenic mice overexpressing the polyamine catabolic enzyme, spermidine/spermine N-1-acetyltransferase (SSAT), perform worse than syngenic females in a radial maze task (Kaasinen et al. 2004).

A limited number of studies have investigated the effect of systemic polyamines on memory (Meyer et al. 1998; Mikolajczak et al. 2002). In fact, it has been described that systemic administration of spermidine before training improves social recognition memory and attenuates (\pm)-3-(2-carboxypiperazine-4-yl)-propyl-1-phosphonic acid-induced learning deficits in a 14-unit T-maze (Meyer et al. 1998). The current findings showing enhancement of fear conditioning by the systemic administration of spermidine is in full agreement with these previous studies, which have shown that this polyamine improves memory of non-aversive tasks. However, to our knowledge, this is the first study to show that the systemic administration of spermidine improves the memory of CS associated with aversive stimuli. This is of particular relevance for drugs with potential use in the clinics, since polyamines are known to have limited access to the brain (Shin et al. 1985) and, due to this fact, they

have been overlooked as compounds that might cause central effects when given systemically.

The current findings demonstrating that administration of arcaine immediately after training impairs memory are also in agreement with previous reports that polyamine antagonists disrupt memory (Rubin et al. 2001, 2004). In fact, we have previously shown that intra-amygdala administration of arcaine impairs the memory of inhibitory avoidance (Rubin et al. 2001) and fear conditioning (Rubin et al. 2004) tasks. Accordingly, systemic or intra-amygdala injection of ifenprodil, another polyamine site antagonist, before training, impairs the acquisition of contextual and tone fear condition in rats (Rodrigues et al. 2001). The intracerebroventricular administration of ifenprodil also reverses the memory facilitation caused by spermidine and NMDA in olfactory bulbectomized mice in the inhibitory avoidance task (Tadano et al. 2004), further supporting the view that polyamine antagonists modulate NMDA-mediated effects on memory. Finally, systemic eliprodil, an antagonist of the polyamine binding site at the NMDA receptor, has no effect on short- (Sternberg memory scanning and paired words) or long-term memory (delayed free recall of pictures for long-term memory) in humans (Patat et al. 1994). In addition, we showed that the modulation of fear conditioning by arcaine is time-dependent, since its intraperitoneal administration 0 min, 60 min or 180 min after training impairs fear conditioning. This is in agreement with previous results showing that the effect of intrahippocampal spermidine on memory of inhibitory avoidance is time-dependent (Berlese et al. 2005).

It should be noted, however, that there are also reports of memory improvement by polyamine antagonists, and lack of effect as well. In line with this

or ifenprodil (da Silva et al. 2006) have no effect on the memory of inhibitory avoidance task in rats. An absence of effect of systemic ifenprodil on a social recognition test has also been reported (Mikolajczak et al. 2002). On the other hand, systemic administration of arcaine (5.0 mg/kg i.p.) before training improves the memory of the social recognition task (Mikolajczak et al. 2002). The reasons for these discrepancies are not known, but they may be related to the structure injected and the task used to assess memory, since polyamine antagonists do not alter the memory of inhibitory avoidance task if they are injected into the hippocampus. Due to this fact a “polyaminergic tonus”, or a role for endogenous polyamines on memory, has been suggested for the amygdala (Rubin et al. 2001, 2004), but not for the hippocampus (Rubin et al. 2000). Therefore, one might argue that the amnesic effect of systemic polyamine binding site antagonists in aversive, but not in non-aversive tasks, is due to their preferential effect on the amygdala. If this were true, polyamine antagonists might be useful to prevent the formation of aversive memories, and these compounds might be of value to prevent posttraumatic stress disorder (PTSD) (Hageman et al. 2001). However, more studies are necessary to determine whether arcaine is suitable to prevent PTSD.

References

- Berlese DB, Sauzem PD, Carati MC, Guerra GP, Stiegemeier JA, Mello CF, Rubin MA (2005) Time-dependent modulation of inhibitory avoidance memory by spermidine in rats. *Neurobiol Learn Mem* 83: 48-53.
- Cammarota M, Bevilaqua LRM, Bonini JS, Rossatto JI, Medina JH, Izquierdo N (2004) Hippocampal glutamate receptors in fear memory consolidation. *Neurotox Res* 6: 205-211.
- da Silva WC, Bonini JS, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Cammarota M (2006) Histamine enhances inhibitory avoidance memory consolidation through a H(2) receptor-dependent mechanism. *Neurobiol Learn Mem* (*in press*).
- Fanselow MS, Kim JJ (1994) 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. *Behav Neurosci* 108: 210-212.
- Guerra GP, Mello CF, Sauzem PD, Berlese DB, Furian AF, Tabarelli Z, Rubin MA (2006) Nitric oxide is involved in the memory facilitation induced by spermidine in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 186(2):150-158.
- Hageman I, Andersen HS, Jorgensen MB (2001) Post-traumatic stress disorder: a review, of psychobiology and pharmacotherapy. *Acta Psychiatr Scand* 104: 411-422.
- Izquierdo LA, Barros DM, Ardenghi PG, Pereira P, Rodrigues C, Choi H, Medina JH, Izquierdo I (2000) Different hippocampal molecular requirements for short- and long-term retrieval of one-trial avoidance learning. *Behav Brain Res* 111: 93-98.

- Jasnow AM, Cooper MA, Huhman KL (2004) N-methyl-D-aspartate receptors in the amygdala are necessary for the acquisition and expression of conditioned defeat. *Neuroscience* 123: 625-634.
- Kaasinen SK, Oksman M, Alhonen L, Tanila H, Janne J (2004) Spermidine/spermine N-1-acetyltransferase overexpression in mice induces hypoactivity and spatial learning impairment. *Pharmacol Biochem Behav* 78: 35-45.
- 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.
- McGurk JF, Bennett MVL, Zukin RS (1990) Polyamines potentiate responses of N-Methyl-D-Aspartate receptors expressed in *Xenopus* Oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 9971-9974.
- Meyer RC, Knox J, Purwin DA, Spangler EL, Ingram DK (1998) Combined stimulation of the glycine and polyamine sites of the NMDA receptor attenuates NMDA blockade induced learning deficits of rats in a 14-unit T-maze. *Psychopharmacology* 135: 290-295.
- Mikolajczak P, Okulicz-Kozaryn I, Polanska A, Szczawinska K, Bobkiewicz-Kozłowska T (2002) Effect of multiple ifenprodil or spermidine treatment on social recognition in rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 13: 61-67.
- Morrison LD, Becker L, Ang LC, Kish SJ (1995) Polyamines in human brain - regional distribution and influence of aging. *J Neurochem* 65: 636-642.

- Nishiga M, Kamei C (2003) Ameliorative effects of histamine on 7-chlorokynurenic acid-induced spatial memory deficits in rats. *Psychopharmacology* 166: 360-365.
- Patat A, Molinier P, Hergueta T, Brohier S, Zieleniuk I, Danjou P, Warot D, Puech A (1994) Lack of amnestic, psychotomimetic or impairing effect on psychomotor performance of eliprodil, a new NMDA antagonist. *Int Clin Psychopharmacol* 9: 155-162.
- Pellegrini-Giampietro DE (2003) An activity-dependent spermine-mediated mechanism that modulates glutamate transmission. *Trends Neurosci* 26: 9-11.
- Ransom RW, Stec NL (1988) Cooperative modulation of [H-3] Mk-801 binding to the N-Methyl-D-Aspartate receptor-Ion channel complex by L-Glutamate, glycine, and polyamines. *J Neurochem* 51: 830-836.
- Rodrigues SM, Schafe GE, LeDoux JE (2001) Intra-amygdala blockade of the NR2B subunit of the NMDA receptor disrupts the acquisition but not the expression of fear conditioning. *J Neurosci* 21: 6889-6896.
- Rubin MA, Berlese DB, Stiegemeier JA, Volkweis MA, Oliveira DM, dos Santos TLB, Fenili AC, Mello CF (2004) Intra-amygdala administration of polyamines modulates fear conditioning in rats. *J Neurosci* 24: 2328-2334.
- Rubin MA, Boemo RL, Jurach A, Rojas DB, Zanolla GR, Obregon ADC, Souza DO, Mello CF (2000) Intrahippocampal spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. *Behav Pharmacol* 11: 57-61.
- Rubin MA, Stiegemeier JA, Volkweis MA, Oliveira DM, Fenili AC, Boemo RL, Jurach A, Mello CF (2001) Intra-amygdala spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. *Eur J Pharmacol* 423: 35-39.

- Sacaan AI, Johnson KM (1990) Characterization of the stimulatory and inhibitory effects of polyamines on [H-3] N-(1-[Thienyl]Cyclohexyl) piperidine binding to the N-Methyl-D-Aspartate receptor ionophore complex. *Mol Pharmacol* 37: 572-577.
- Shalev AY (2001) What is posttraumatic stress disorder? *J Clin Psychiatry* 62: 4-10.
- Shin WW, Fong WF, Pang SF, Wong PCL (1985) Limited blood-brain-barrier transport of polyamines. *J Neurochem* 44: 1056-1059.
- Sprosen TS, Woodruff GN (1990) Polyamines potentiate NMDA induced whole-cell currents in cultured striatal neurons. *Eur J Pharmacol* 179: 477-478.
- Stote DL, Fanselow MS (2004) NMDA receptor modulation of incidental learning in Pavlovian context conditioning. *Behav Neurosci* 118: 253-257.
- Stromgaard K, Mellor I (2004) AMPA receptor ligands: Synthetic and pharmacological studies of polyamines and polyamine toxins. *Med Res Rev* 24: 589-620.
- Tadano T, Hozumi S, Yamadera F, Murata A, Niiijima 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.
- Turnbull GJ (1998) A review of post-traumatic stress disorder. Part I: Historical development and classification. *Injury* 29: 87-91.
- Walker DL, Davis M (2004) Are fear memories made and maintained by the same NMDA receptor-dependent mechanisms? *Neuron* 41: 781-793.

Table 1 Effect of post-training intraperitoneal administration of spermidine, arcaine and MK-801 on freezing responses in a novel context (room B) without tone. PBS represents vehicle treatment.

Group (mg/kg)	Freezing without tone (%)
PBS	6.64 ± 0.87
Spermidine	
(1)	11.30 ± 4.34
(10)	9.08 ± 2.49
(100)	6.66 ± 1.55
PBS	11.67 ± 5.71
Arcaine	
(0.1)	13.67 ± 3.70
(1)	13.51 ± 4.32
(10)	11.01 ± 2.67
PBS	10.32 ± 6.66
MK-801	
(0.001)	6.38 ± 2.46
(0.01)	5.42 ± 1.61
(0.1)	8.06 ± 1.97

Data are means ± SEM for (8-13) animals in each group.

Figure legends

Fig. 1 Effect of immediate post-training intraperitoneal spermidine administration on freezing to context (a) and to tone (b). * $p < 0.05$ compared with vehicle by the Student-Newman-Keuls test. Data are the means + SEM percentage of freezing averaged across all context (a) or tone (b) trials ($n = 11$ animals in each group).

Fig. 2 Effect of immediate post-training intraperitoneal MK-801 administration on freezing to context (a) and to tone (b). * $p < 0.05$ compared with vehicle by the Student-Newman-Keuls test. Data are the means + SEM percentage of freezing averaged across all context (a) or tone (b) trials ($n = 8-9$ animals in each group).

Fig. 3 Effect of immediate post-training intraperitoneal arcaïne administration on freezing to context (a) and to tone (b). * $p < 0.05$ compared with vehicle by the Student-Newman-Keuls test. Data are the means + SEM percentage of freezing averaged across all context (a) or tone (b) trials ($n = 12-13$ animals in each group).

Fig. 4 Effect of the immediate post-training intraperitoneal administration of MK-801 (0.001 mg/kg) and spermidine (100 mg/kg) on the percentage of freezing to context (a) and to tone (b). PBS represents vehicle treatment. * $p < 0.05$ compared with vehicle by the Student-Newman-Keuls test. Data are means + SEM averaged across all context (a) or tone (b) trials ($n = 7-8$ animals in each group).

Fig. 5 Effect of immediate post-training intraperitoneal administration of arcaïne (0.1 mg/kg) and spermidine (100 mg/kg) on the percentage of freezing to context (a) and

to tone (b). PBS represents vehicle treatment. * $p < 0.05$ compared with vehicle by the Student-Newman-Keuls test. Data are means + SEM averaged across all context (a) or tone (b) trials ($n = 12-14$ animals in each group).

Fig. 6 Effect of injection of arcaïne (10 mg/kg) 0, 60, 180 or 360 min after training, on freezing to context (a) and to tone (b). PBS represents vehicle treatment. * $p < 0.05$ compared with vehicle by the Student-Newman-Keuls test. Data are means + SEM averaged across all context (a) or tone (b) trials ($n = 10-12$ animals in each group).

Fig. 1

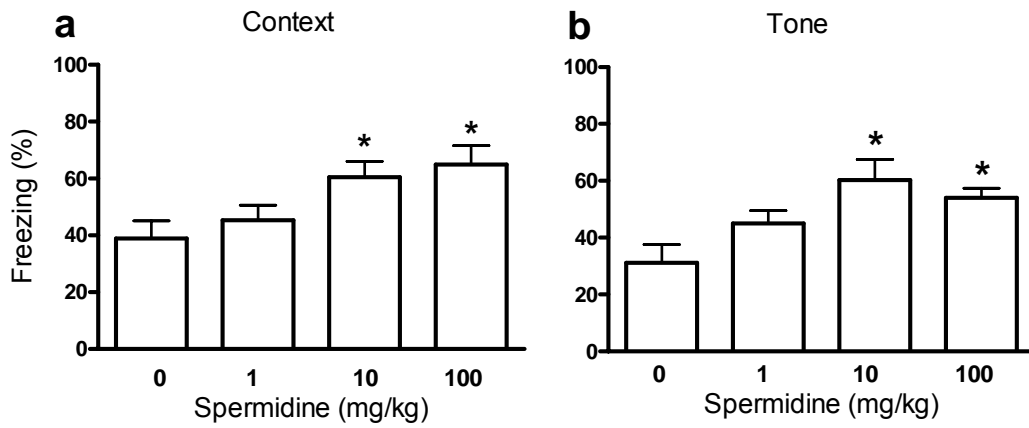


Fig. 2

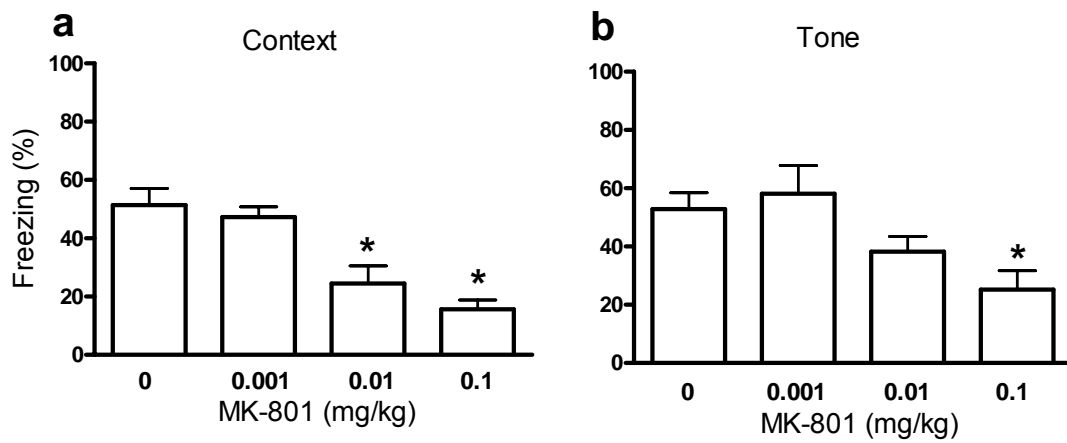


Fig. 3

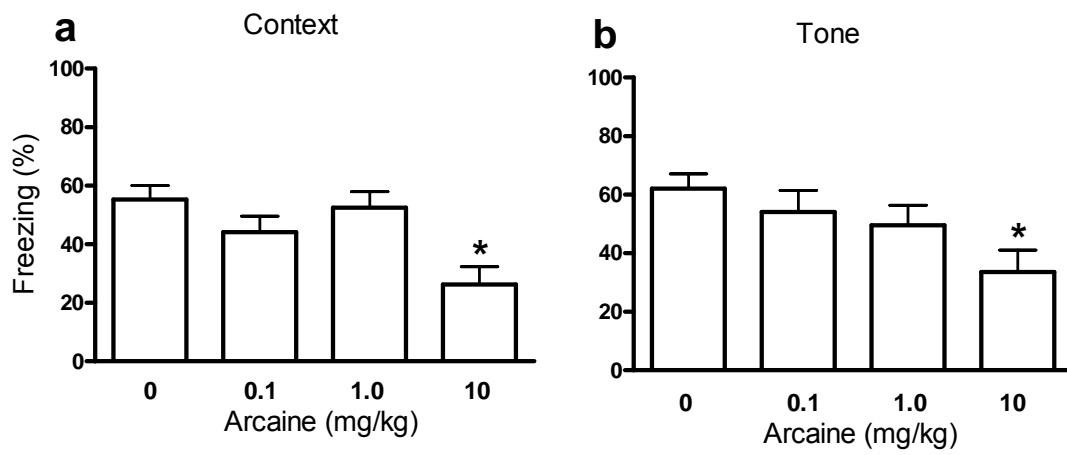


Fig. 4

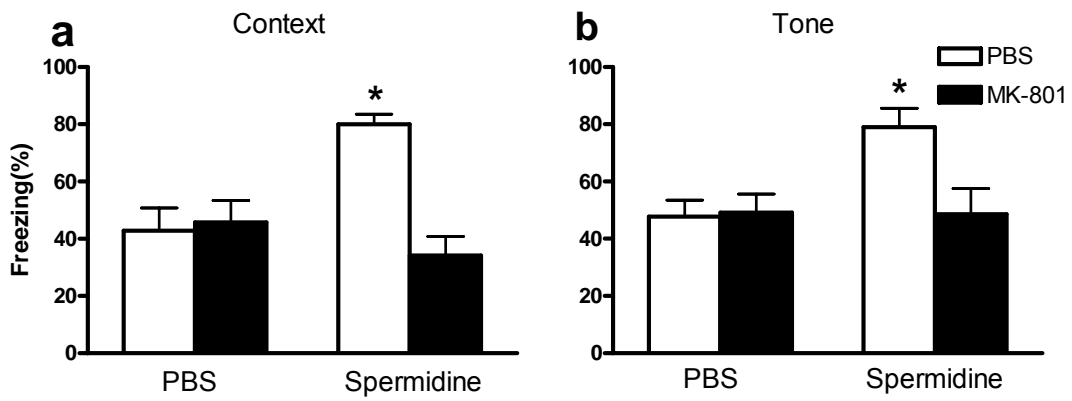


Fig. 5

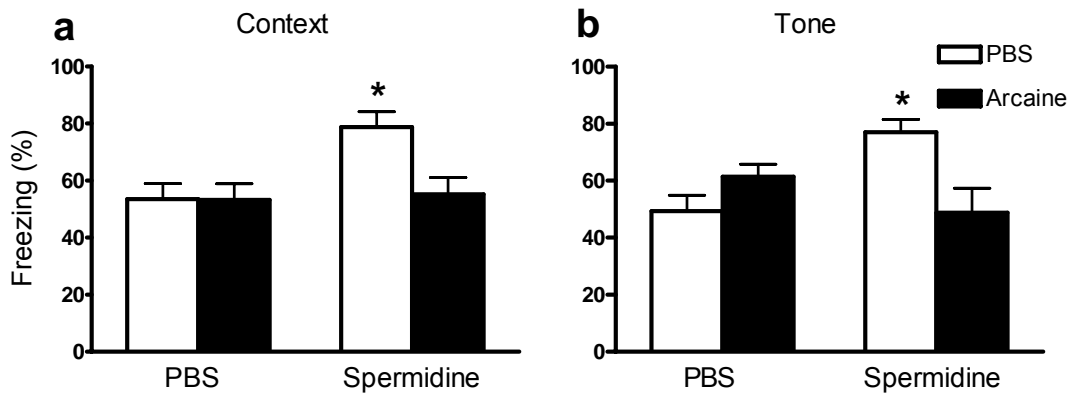
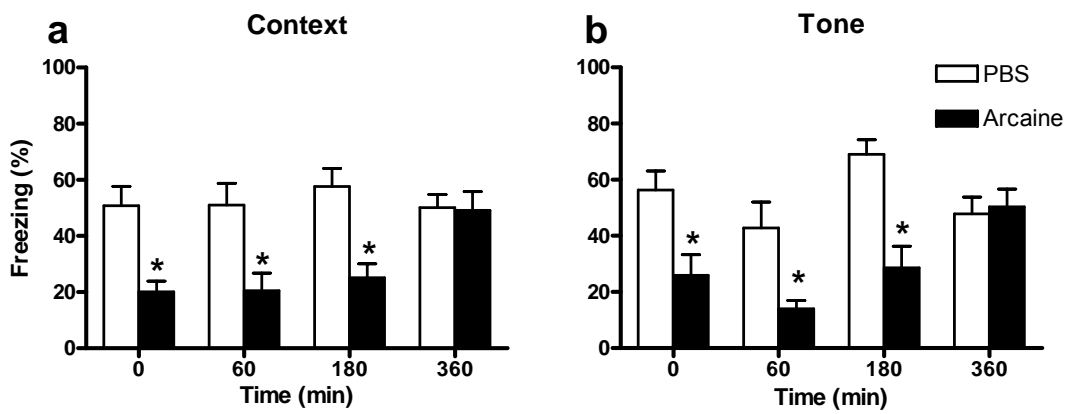


Fig. 6



4. DISCUSSÃO

No presente estudo nós demonstramos, pela primeira vez, que a administração sistêmica da poliamina SPD, agonista do sítio das poliaminas no NMDA-R, melhorou o desempenho dos ratos na tarefa de medo condicionado tanto ao contexto quanto ao tom. ARC, um antagonista do sítio das poliaminas no NMDA-R, e MK-801, antagonista não-competitivo do NMDA-R, administrados intraperitonealmente (i.p.) após o treino, prejudicaram a consolidação do medo condicionado ao contexto e ao tom. Outro achado importante foi que a administração de ARC e MK-801, em doses que não tiveram efeito *per se* sobre o medo condicionado, reverteram o efeito facilitatório causado pela SPD tanto ao contexto como ao tom. Estes resultados reforçam a idéia de que a melhora da memória causada por SPD pode ser mediada pelo sítio de ligação das poliaminas no NMDA-R.

O efeito facilitatório da administração sistêmica de SPD sobre a tarefa de medo condicionado, demonstrado com o aumento da imobilidade tanto ao contexto quanto ao tom, vem ao encontro de outros estudos nos quais a administração de poliaminas modulam a memória em diferentes tarefas (Kishi *et al.*, 1998 a, b; Meyer *et al.*, 1998; Rubin *et al.*, 2000, 2001, 2004; Mikolajczak *et al.*, 2002; Nishiga M. & Kamei C., 2002; Tadano *et al.*, 2004; Berlese *et al.*, 2005; Guerra *et al.*, 2006). Assim, microinjeções intra-hipocampal ou intra-amígdala de SPD aumentam a latência de descida da plataforma na tarefa de esquivas inibitória (Rubin *et al.*, 2000, 2001; Berlese *et al.*, 2005; Guerra *et al.*, 2006) e aumentam o condicionamento de medo ao contexto e ao tom (Rubin *et al.*, 2004). SPD melhora o desempenho dos ratos na tarefa de esquivas inibitória, de forma tempo-dependente, uma vez que a SPD melhora a aquisição e a consolidação recente, mas não afeta consolidação tardia e a evocação (Berlese *et al.*, 2005). Além disso, a administração de SPD (intra-hipocampal e intracerebroventricular) é efetiva para atenuar o déficit de memória de trabalho induzido por antagonistas do NMDA-R (MK-801) bem como, por antagonistas muscarínico, glutamatérgico metabotrópico e um antagonista do sítio da glicina no NMDA-R (escopolamina, AIDA e ácido 7-cloroquinurênico) (Kishi *et al.*, 1998a; Kishi *et al.*, 1998b, Nishiga & Kamei, 2003). A SPD também atenua o prejuízo da memória induzido pela retirada do bulbo olfatório na tarefa de esquivas passiva (Tadano *et al.*, 2004). Uma linhagem de camundongos transgênicos que superexpressam a enzima espermidina/espermina-N¹-acetiltransferase, uma enzima do catabolismo das poliaminas, possuem níveis diminuídos de SPD e espermina e

um desempenho prejudicado no labirinto radial de oito braços (Kaasinem *et al.*, 2004). Juntos estes resultados fornecem evidências de que as poliaminas estão envolvidas na modulação da memória em diferentes tarefas.

Entretanto, poucos estudos têm investigado o efeito da administração sistêmica das poliaminas sobre a memória. Assim, a administração sistêmica de SPD atenua os erros no aprendizado do labirinto induzido por CPP (um antagonista competitivo do NMDA-R) e a administração (i.p.) de SPD melhora a memória de reconhecimento social em ratos (Meyer *et al.*, 1998; Mikolajczak *et al.*, 2002). O presente estudo é o primeiro estudo que mostrou que a administração sistêmica de SPD melhora a memória da associação de um estímulo aversivo com um estímulo neutro.

Está bem estabelecido que o condicionamento para dicas como o tom, requer a amígdala, mas não o hipocampo. Em contraste, o medo condicionado contextual requer ambos, tanto a amígdala quanto o hipocampo (Sanders *et al.*, 2003; Dityatev & Bolshakov, 2005). Como no presente estudo foi observado que a SPD melhorou a consolidação da memória tanto ao contexto quanto ao tom, sugerimos que sistemicamente ela modula tanto tarefas dependentes do hipocampo quanto dependentes da amígdala.

O efeito facilitatório da administração sistêmica de SPD sobre memórias do medo, ocorre mesmo com a passagem restrita destes compostos através da barreira hemato-encefálica (Shin *et al.*, 1985). O efeito sistêmico das drogas é de grande importância quando se projeta a sua utilização na clínica, uma vez que tanto as drogas que melhoram quanto as drogas que prejudicam a memória podem ter um potencial terapêutico (O' Brien & Nutt, 1998; Rose, 2002; Gerlai, 2003).

Neste estudo nós também mostramos que a administração sistêmica pós-treino de ARC prejudica o desempenho dos animais tanto ao contexto como ao tom na tarefa de medo condicionado. Este resultado está de acordo com as evidências obtidas em experimentos onde a administração intra-amígdala de ARC prejudica a consolidação da memória nas tarefas de esquiva inibitória e de medo condicionado (Rubin *et al.*, 2001, 2004). De fato, estudos eletrofisiológicos mostram que a ARC reduz as correntes através do NMDA-R reduzindo a condutância do canal (Rock & MacDonald, 1995). Além disso, a administração sistêmica ou intra-amígdala de ifenprodil, outro antagonista do sítio das poliaminas, prejudica a aquisição do condicionamento ao contexto e ao tom em ratos (Rodrigues *et al.*, 2001). Também, a

administração de ifenprodil reverte o efeito facilitatório da memória causada por SPD e NMDA em camundongos sem o bulbo olfatório na tarefa de esQUIVA passiva (Tadano *et al.*, 2004). Por fim, a administração sistêmica de eliprodil, um antagonista do sítio de ligação das poliaminas no NMDA-R, não tem efeito sobre a memória de curto e de longo prazo (Patat *et al.*, 1994).

Está descrito que a administração de antagonistas das poliaminas causam prejuízo na memória ou não possuem efeito (Rubin *et al.*, 2000; Mikolajczak *et al.*, 2002; da Silva *et al.*, 2006). Assim, a administração de ARC e ifenprodil intra-hipocampal não teve efeito sobre a tarefa de esQUIVA inibitória (Rubin *et al.*, 2000; da Silva, 2006). Já na tarefa de reconhecimento social a administração sistêmica de ifenprodil não teve efeito e a ARC (5 mg/kg) melhorou o desempenho dos animais (Mikolajczak *et al.*, 2002). As razões dessas discrepâncias não são conhecidas. Pode-se argumentar que essas diferenças possam estar relacionadas com a estrutura injetada ou com a tarefa utilizada. Uma vez que a ARC não tem efeito sobre a memória quando administrada intra-hipocampo (Rubin *et al.*, 2000), mas tem efeito quando administrada intra-amígdala (Rubin *et al.*, 2001, 2004) podemos sugerir que exista um tônus poliaminérgico na amígdala, mas não no hipocampo. É provável que esta variabilidade ocorra, ao menos em parte, devido a expressão de diferentes combinações de subunidades do NMDA-R (Johnson, 1996; Williams, 1997a) e sua distribuição heterogênea nessas estruturas (Goebel & Poesch, 1999; Rodrigues *et al.*, 2001).

A administração sistêmica de ARC, um antagonista do sítio das poliaminas no NMDA-R, prejudicou a memória em uma determinada janela de tempo; o efeito foi evidenciado de 0-180 minutos pós-treino. Outro antagonista do receptor NMDA também apresenta ação dependente do tempo e da estrutura a qual foi administrado. Assim, o AP5, um antagonista competitivo do receptor NMDA, causa amnésia quando injetado no hipocampo e na amígdala imediatamente após o treino (Roesler *et al.*, 2003), mas não é capaz de causar amnésia quando injetado 90 minutos após o treino, entretanto quando administrado de 90-180 e não quando administrado 360 minutos pós-treino no córtex entorrinal causa amnésia, na tarefa de esQUIVA inibitória (Jerusalinsky *et al.*, 1992; Ferreira *et al.*, 1992) e não tem efeito pós-treino na tarefa de medo condicionado (Schenberget *et al.*, 2005). Desde que a administração intraperitoneal de ARC entre 0-180 minutos após o treino piorou a

memória podemos especular que seu efeito seja mediado por diferentes estruturas neste período de tempo.

A descoberta de drogas que impeçam a formação das memórias de medo, ou seja, daquelas memórias que não são de interesse preservá-las, pode ser útil no tratamento do Transtorno do Estresse Pós-traumático (O' Brien & Nutt, 1998; Walker *et al.*, 2002). Assim a ARC poderia ter valor terapêutico na prevenção do Transtorno do Estresse Pós-traumático.

No presente estudo a administração de ARC e MK-801, em doses que não apresentam efeito *per se*, reverteram o efeito facilitatório da SPD sobre o medo condicionado tanto para o contexto quanto para o tom, reforçando a idéia de que a melhora da consolidação da memória pela SPD pode ser mediada pelo NMDA-R. Este efeito vem ao encontro da descrição de que existem sítios para as poliaminas no NMDA-R (Williams, 1997; Gallagher *et al.*, 1997). Além do mais os efeitos causados pela SPD podem ser atribuídos a sua ação na consolidação da memória e não a outros parâmetros comportamentais, tais como atividade locomotora ou ansiedade. No presente estudo a atividade locomotora não foi alterada pela administração de SPD, ARC e MK-801 (dados não mostrados), além disso, a administração intra-amígdala de SPD e ARC não alteraram estes parâmetros comportamentais (Rubin *et al.*, 2004).

Além dos efeitos descritos para as poliaminas sobre o NMDA-R elas também podem influenciar na atividade de outros canais iônicos. Assim AMPA-R, os quais também estão envolvidos nos processos de aprendizagem e memória, são modulados por poliaminas. Entretanto, o efeito facilitatório da SPD sobre a memória, encontrado em nosso estudo, provavelmente não seja mediado pelo AMPA-R, visto que poliaminas endógenas e exógenas bloqueiam AMPA-R, permeáveis ao cálcio, deste modo diminuindo a excitabilidade sináptica (Aizenmann *et al.*, 2002; Pellgrini-Giampietro, 2003; Shin *et al.*, 2005). Da mesma forma poliaminas bloqueiam o poro de receptores cainato impedindo o influxo de íons quando a membrana está despolarizada. Além disso, SPM bloqueia o poro do canal K⁺ retificadores de entrada no lado intracelular. Esses canais de K⁺ retificadores de entrada controlam o potencial de repouso e a excitabilidade em neurônios. Um estudo de Bianchi e colaboradores (1996) mostrou que a redução dos níveis intracelulares de SPD reduz a retificação de canais de K⁺ retificadores de entrada e assim desloca o limiar de excitação para potenciais mais positivos. Portanto, o aumento nos níveis de do uso

destes compostos para tratar os distúrbios relacionados com a memória em humanos. Uma perspectiva futura seria examinar os efeitos de agonistas e antagonistas do sítio das poliaminas no NMDA-R sobre a extinção das memórias de poliaminas aumenta o grau de retificação, aumentando a excitabilidade (Lopatin *et al.*, 1995). Desta forma não podemos excluir a possibilidade de um efeito sinérgico dos canais de K⁺ retificadores de entrada e do NMDA-R, modulados por SPD, no efeito facilitatório na tarefa de medo condicionado descrito neste estudo.

Em resumo, a administração sistêmica de arcaína piora enquanto que a administração de SPD melhora a memória do medo condicionado em ratos. Isto abre a possibilidade de medo, já que as evidências de que agonistas do NMDA-R facilitam a extinção do aprendizado do medo, tem significância clínica, porque o principal tratamento atualmente efetivo, para desordens de ansiedade, é baseado na extinção (Richardson *et al.*, 2004); desta forma um modelo útil e com potencial terapêutico para o Transtorno do Estresse Pós-Traumático. Assim, mais estudos são necessários para definir se estas poliaminas podem ser usadas na clínica ou não.

5. CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

- A administração intraperitoneal de ARC (0-180 min pós-treino) prejudicou o desempenho dos ratos na tarefa de medo condicionado tanto ao contexto quanto ao tom.
- A administração intraperitoneal pós-treino de SPD melhorou o desempenho dos ratos na tarefa de medo condicionado tanto ao contexto quanto ao tom.
- A administração intraperitoneal pós-treino de MK-801 prejudicou o desempenho dos ratos na tarefa de medo condicionado tanto ao contexto quanto ao tom.
- A administração intraperitoneal pós-treino de MK-801, em uma dose que não teve efeito *per se* sobre a memória, reverteu o efeito facilitatório da SPD sobre a tarefa de medo condicionado tanto ao contexto quanto ao tom.
- A administração intraperitoneal pós-treino de ARC, em uma dose que não teve efeito *per se* sobre a memória, reverteu o efeito facilitatório da SPD sobre a tarefa de medo condicionado tanto ao contexto quanto ao tom.

6. REFERÊNCIAS

ABEL, T.; LATTAL, K. M. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. **Curr Opin Neurobiol.** v. 11, p.180-187, 2001.

AIZENMAN, C.; MUÑOZ-ELIAS, G.; CLINE, H. T. Visually driven modulation of glutamatergic synaptic transmission is mediated by the regulation of intracellular polyamines. **Neuron.** v. 34, p. 623-634, 2002.

ANDERSON, D. J.; CROSSLAND, J.; SHAW, G. G. The actions of spermidine and spermine on the central nervous system. **Neuropharmacology.** v. 14, p. 571-577, 1975.

ASHBY, F. G.; O'BRIEN, J. B. Category learning and multiple memory systems. **Trends Cogn Sci.** v. 9, p. 83-89, 2005.

BACHRACH, U.; WANG, Y. C.; TABIT, A. Polyamines: New cues in cellular signal transduction. **News Physiol. Sci.** v. 16, p. 106-109, 2001.

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

BELLÉ, N. A V.; DALMOLIN, G. D.; FONINI, G.; RUBIN, M. A; ROCHA, J. B. T. Polyamines reduces lipid peroxidation induced by different pro-oxidant agents. **Brain Res.** v.1008, p. 245–251, 2004.

BERLESE, D. B.; SAUZEM, P. D.; CARATI, M. C.; GUERRA, G. P.; STIEGEMEIER, J. A.; MELLO, C. F.; RUBIN, M. A. Time- dependent modulation of inhibitory avoidance memory by spermidine in rats. **Neurobiol Learn Mem.** v. 83, p. 48-53, 2005.

BIANCHI, L.; ROY, M. L.; TAGLIALATELA, M.; LUNDGREN, D. W.; BROWN, A. M.; FICKER, E. Regulation by spermine of native inward rectifier K⁺ channels in RBL-1 cells. **J Biol Chem.** v. 271(11), p. 6114-6121, 1996.

BLISS, T. V., LOMO, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. **J Physiol (Lond).** v. 232, p. 331–56, 1973.

BORSINI, F.; PODHORNA, J.; MARAZZITI, D. Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants? **Psychopharmacology (Berl).** v. 163(2), p. 121-141, 2002.

CARLEZON, W. A. C. J.; DUMAN, R. S.; NESTLER, E. J. The many faces of CREB. **Trends Neurosci.** v. 28, p. 436-45, 2005.

CARTER, C. **Neuropharmacology of Polyamines.** Londres: Academic Press, 1994.

CASERO, R. A.; PEGG, A. E. Spermidine/spermine N1-acetyl-transferase the turning point in polyamine metabolism. **FASEB J.** v. 7, p. 653-61, 1993.

CASTELLANO, C.; CESTARI, V.; CIAMEI, A.; PAVONE, F. MK-801- induced disruptions of one-trial inhibitory avoidance are potentiated by stress and reversed by naltrexone. **Neurobiol Learn Mem.** v. 72, p. 215-29, 1999.

CELANO, P.; BAYLIN, S. B.; CASERO, R. A. J. Polyamines differentially modulate the transcription of growth-associated genes in human colon carcinoma cells. **J Biol Chem.** v. 264, p. 8922-8927, 1989.

CLAYTON, D.A.; BROWNING, M. D. Deficits in expression of the NR2B subunit in the hippocampus of aged Fisher 344 rats. **Neurobiol Aging.** v. 22, p. 165-168, 2001.

CONWAY, E. C. Brain lesions and delayed water maze learning deficits after intracebroventricular spermine. **Brain Res.** v. 800, p. 10-20, 1998.

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

DAOUDAL, G.; DEBANE, D. Long-term plasticity of intrinsic excitability: learning rules and mechanisms. **Learn Mem.** v. 10, p. 456-465, 2003.

da SILVA, W. C.; BONINI, J. S.; BEVILAQUA, L. R.; IZQUIERDO I.; CAMMAROTA, M. Histamine enhances inhibitory avoidance memory consolidation through a H(2) receptor-dependent mechanism. **Neurobiol Learn Mem.** (*in press*), 2006.

DILER, A. S.; ZIYLAN, Y. Z; UZUM, G.; LEFAUCONNIER, J. M.; SEYLAZ, J.; PINARD, E. Passage of spermidine across the blood-brain barrier in short recirculation periods following global cerebral ischemia: effects of mild hyperthermia. **Neurosci Res.** v. 43, p. 335-42, 2002.

DINGLELINE, R.; McBAIN, C. J.; McNAMARA, J. O. Excitatory amino acid receptors in epilepsy. **Trends Pharmacol Sci.** v. 11, p. 334-338, 1990.

DITYATEV, A. E.; BOLSHAKOV, V. Amygdala, Long-term Potentiation, and Fear Conditioning. **Neuroscientist.** v. 11, p. 75-88, 2005.

DURAND, G. M.; GREGOR, P.; ZHENG, X.; BENNETT, M. V.; UHL, G. R.; ZUKIN, R. S. Cloning of an apparent splice variant of the rat *N*-methyl- *D*-aspartate receptor NMDAR1 with altered sensitivity to polyamines and activators of protein kinase C. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 89, p. 9359-9363, 1992.

DURAND, G. M.; BENNETT, M. V.; ZUKIN, R. Splice variants of the *N*- methyl-*D*-aspartate receptor NR1 identify domains involved in regulation by polyamines and protein kinase C. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 90, p. 6731-6735, 1993.

EICHENBAUM, H. A cortical-hippocampal system for declarative memory. **Nat Rev Neurosci.** v. 1(1), p. 41-50, 2000.

FENDT, M.; FANSELOW, M. S.; The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. **Neurosci Biobehav Rev.** v. 23, p. 743-760, 1999.

FERREIRA, M. B.; Da SILVA, R. C.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I. Late posttraining memory processing by entorhinal cortex: Involvement of NMDA and GABAergic receptors. **Pharmacol Biochem Behav.** v. 41(4), p. 767-771, 1992.

FERREIRA, T. L.; MOREIRA, K. M.; IKEDA, D. C.; BUENO, O. F. A.; OLIVEIRA, M. G. M. Effects of dorsal striatum lesions in tone fear conditioning and contextual fear conditioning. **Brain Res.** v. 987, p. 17-24, 2003

FLOOD, J. F.; BAKER, M. L. ; DAVIS, J. L. Modulation of memory processing by glutamate receptor agonist and antagonists. **Brain Res.** v. 521, p. 197-202, 1990.

GALLAGHER, M. J.; HUANG, H.; GRANT, E. R.; LYNCH, D. R. The NR2B-specific Interactions of Polyamines and Protons with the N-Methyl-D-aspartate Receptor. **J Biol Chem.** v. 272, p. 24971-24979, 1997.

GARELICK, M. G.; STORM, D. R. The relationship between memory retrieval and memory extinction. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 102(26), p. 9091-9092, 2005.

GERLAI, R. Memory enhancement: the progress and our fears. **Genes Brain Behav.** v. 2, p. 187-190, 2003.

GREENAMYRE, J. T.; PENNEY, J. B.; D' AMATO, C. J.; YOUNG, A. B. Dementia of the Alzheimer's type: changes in hippocampal L-[3H]glutamate binding. **J Neurochem.** v. 48, p. 543 – 551, 1987.

GOEBEL, D. J.; POOSCH, M. S. NMDA receptor subunit gene expression in the rat brain: a quantitative analysis of endogenous mRNA levels of NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D and NR3A. **Mol Brain Res.** v. 69, p. 164-170, 1999.

GRAEFF, F. G. Bases biológicas do transtorno de estresse pós-traumático. **Rev Bras Psiquiatr.** v. 25, p. 21-24, 2003.

GUERRA, G. P.; MELLO, C. F.; SAUZEM, P. D.; BERLESE, D. B.; FURIAN, A. F.; TABARELLI, Z., RUBIN, M. A. Nitric oxide is involved in the memory facilitation induced by spermidine in rats. **Psychopharmacology (Berl).** (*in press*), 2006.

GUGLIUCCI, A. Polyamines as clinical laboratory tools. **Clin Chim Acta.** v. 344, p. 23-35, 2004.

HOLLMANN, M.; HEINEMANN, S. Cloned glutamate receptors. **Annu Rev Neurosci.** v. 17, p. 31-108, 1994.

HONER, M.; BENKE, D.; LAUBE, B.; KUHSE, J.; HECKENDORN, R.; ALLGEIER, H.; ANGST, C.; MONYER, H.; SEEBURG, P. H.; BETZ, H.; MOHLER, H. Differentiation of glycine antagonist sites of *N*-methyl-D-aspartate receptors subtypes. Preferential interaction of CGP 61594 with NR1/2B receptors. **J Biol Chem.** v. 273, p. 11158-11163, 1998.

HUEMER, R. P. Smart Drugs and Orthomolecular Substances for Aging Minds. **J Advancem Medic.** v. 12(2), p. 19-129, 1999.

HYND, M. R.; SCOTT, H. L.; DODD, P. R. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. **Neurochem Int.** v. 45, p. 583-595, 2004.

IGARASHI, K.; KASHIWAGI, K.; Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 271, p. 559-564, 2000.

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. **Behav Neural Biol.** v. 58, p. 16–26, 1992.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Correlation between the pharmacology of Long-term potentiation and the pharmacology of memory. **Neurobiol Learn Mem.** v. 63, p. 19–32, 1995.

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

IZQUIERDO, I. **Arte de Esquecer: Cérebro, Memória e Esquecimento.** Vieira & Lent, 2004.

JÄNNE J.; RAINA, A. Stimulation of spermidine synthesis in the regenerating rat liver: relation to increased ornithine decarboxylase activity. **Acta Chem Scand.** v. 22, p. 1349–51, 1968.

JÄNNE, J.; ALHONEN, L.; KEINÄNEM, T. A.; PIETILÄ, M.; UIMARI, A.; PIRINEM, E.; HYVÖNEM, M. T.; JÄRVINEM, A. Animal disease models generated by genetic engineering of polyamine metabolism. **J Cell Mol Med.** v. 9, p. 865-882, 2005.

JERUSALINSKY, K.; FERREIRA, M. B.; WALZ, R.; DA SILVA, R. C.; BIACHIN, M., RUSCHEL, A. C.; ZANATTA, M. S.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I. Amnesia by post-training infusion of glutamate receptor antagonists into the amygdala, hippocampus, and entorhinal cortex. **Behav Neu Biol.** v. 58, p. 76–80, 1992.

JOHNSON, T. D. Modulation of channel function by polyamines. **Trends Pharmacol Sci.** v. 17(1), p. 22-27, 1996.

JOHNSON, L. R.; McCORMACK, S. A. Healing of Gastrointestinal Mucosa: Involvement of Polyamines. **News Physiol Sci.** v. 14, p. 12-17, 1999.

KAASINEN, S. K.; OKSMAN, M.; ALHONEN, L.; TANILA, H.; Janne, J. Spermidine/spermine N-1-acetyltransferase overexpression in mice induces hypoactivity and spatial learning impairment. **Pharmacol Biochem Behav.** v. 78, p. 35-45, 2004.

KIM, J. J.; JUNG, M. W. Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: A critical review. **Neurosci Biobehav Rev.** v. 30, p. 188–202, 2006.

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. **Neurosci Lett.** v. 257, p. 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 Res.** v. 793, p. 311–314, 1998b.

LAUBE, B.; HIRAI, H.; STURGESS, M.; BETZ, H.; KUHSE, J. Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit. **Neuron.** v. 18, p. 493-503, 1997.

LEDOUX, J. Fear and the brain: where have we been, and where are we going? **Biol Psychiatry.** v. 15, p. 1229-1238, 1998.

LENZEN, S.; HICKETHIER, R.; PANTEN, U. Interactions between spermine and Mg²⁺ on mitochondrial Ca²⁺ transport. **J Biol Chem.** v. 261, p. 16478-16483, 1986.

LIMA, M. N. M; LARANJA, D. C.; BROMBERG, E.; ROESLER, R.; SCHRÖDER, N. Pré- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impair object recognition memory in rats. **Behav Brain Res.** v. 156, p. 139-143, 2005.

LITTLETON, J. M.; LOVINGER, D.; LILJEQUIST, S.; TICKU, R.; MATSUMOTO, I.; BARRON, S. Role of polyamines and NMDA receptors in ethanol dependence and withdrawal. **Alcohol Clin Exp Res.** v. 25, p. 132-136, 2001.

LYNCH, D. R.; ANEGAWA, N. J.; VERDOORN, T.; PRITCHETT, D. B. *N*-methyl-D-aspartate receptors-different subunit requirements for binding of glutamate antagonists, glycine antagonists, and channel-blocking agents. **Mol Pharmacol.** v. 45, p. 540-545, 1994.

LOPATIN, A. N.; MAKHINA, E. N.; NICHOLS, C. G. The mechanism of Inward Rectification of Potassium Channels: “Long-pore Plugging” by cytoplasmic polyamines. **J Gen Physiol.** v. 106(5), p. 923-955, 1995.

MAREN, S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. **Annu Rev Neurosci.** v. 24, p.897-931,2001.

MAREN, S. Synaptic mechanisms of associative memory in the amygdala. **Neuron**. v. 47(6) p. 783-786, 2005.

McGAUGH, J. L. Memory- a century of consolidation. **Neuroscience**. v. 287, p. 248-251, 2000.

McGAUGH, J. L. The amygdale modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. **Annu Rev Neurosci**. v. 27, p. 1-28, 2004.

MARKOWITSCH, H. J.; CALABRESE, P.; WURKER, M.; DURWEN, H. F.; KESSLER, J.; BABINSKY, R.; BRECHTELSBAUER, D.; HEUSER, H.; GEHLEN, W. The amygdala's contribution to memory-a study on two patients with Urbach-Wiethe disease. **Neuroreport**. v. 5(11), p. 1349-52, 1994.

MASUKO, T.; KASHIWAGI, K.; KUNO, T.; NGUYEN, N. D.; PAHK, A. J.; FUKUCHI, J.; IGARASHI, K.; WILLIAMS, K. A regulatory domain (R1-R2) in the amino terminus of the N-methyl-D-aspartate receptor: effects of spermine, protons, and ifenprodil, and structural similarity to bacterial leucine/isoleucine/valine binding protein. **Mol Pharmacol**. v. 55(6), p. 957-969, 1999.

MATSUDA, K.; KAMIYA, Y.; MATSUDA, S.; YUZAKI, M. Cloning and characterization of a novel NMDA receptor subunit NR3B: a dominant subunit that reduced calcium permeability. **Mol Brain Res**. v. 100, p. 43-52, 2002.

MATTHEWS, H. P.; KORBAY, J.; WILKINSON, D. G.; ROWDEN, J. Donepezil in Alzheimer's disease: eighteen month results from Southampton Memory Clinic. **Neurology**. v. 59(1), p. 123-5, 2002.

MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I. Retrograde messengers, long-term potentiation and memory. **Brain Res Rev**. v. 21, p. 185- 194, 1995.

MEYER, R. C.; KNOX, J.; PURWIN, D. A.; PURWIN, A.; SPANGLER, E. L.; INGRAN, D. K. Combined stimulation of the glycine and polyamines sites of the NMDA blockade-induced learning deficits of rats in a 14-unit T-maze. **Psychopharmacology**. v. 135, p. 290-295, 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. **Eur J Pharmacol.** v. 444, p. 83–96, 2002.

MIZUNO, K.; GIESE, K. P. Hippocampus-dependent memory formation: do memory type-specific mechanisms exist? **J Pharmacol Sci.** v. 98, p. 191-7, 2005.

MOINARD, C.; CYNOBER, L.; de BANDT, J. P. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. **Clin Nutr.** v. 24, p. 184-197, 2005.

MORGAN, D. M. L. **Methods in molecular biology. Polyamine protocols.** Totowa, New Jersey: Human Press Inc., 1998.

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.** v. 319, p. 774–776, 1986.

MORRISON, L. D.; BECKER, L.; ANG, L. C.; KISH, S. J. Polyamines in Human Brain - Regional Distribution and Influence of Aging. **J Neurochem.** v. 65, p. 636-642, 1995.

MOTT, D. D.; WASHBURN, M. S.; ZHANG, S.; DIGLENDINE, R. J. Subunit-Dependent Modulation of Kainate Receptors by Extracellular Protons and Polyamines. **J Neurosci.** v. 23(4), p. 1179 –1188, 2003.

NICOLL, R. A.; KAUER, J. A.; MALENKA, R. C. The current excitement in long-term potentiation. **Neuron.** v. 1(2), p. 97-103, 1988.

NISHIGA, M.; KAMEI, C. Ameliorative effects of histamine on 7-chlorokynurenic acid-induced spatial memory deficits in rats. **Psychopharmacology.** v. 166, p. 360-365, 2003.

O'BRIEN, M.; NUTT, D. Loss of consciousness and post-traumatic stress disorder. A clue to aetiology and treatment. **Br J Psychiatric.** v. 173, p. 102-104, 1998.

PATAT, A.; MOLINIER, P.; HERGUETA, T.; BROHIER, S.; ZIELENIUK, I.; DANJOU, P.; WAROT, D.; PUECH, A. Lack of Amnestic, Psychotomimetic or Impairing Effect on Psychomotor Performance of Eliprodil, a New NMDA Antagonist. **Int Clin Psychopharmacol.** v. 9, p. 155-162, 1994.

PELLEGRINI-GIAMPIETRO, D. E. An activity-dependent spermidine-mediated mechanism that modulates glutamate transmission. **Trends Neurosci.** v. 26, p. 9–11, 2003.

PLATENIK, J.; KURAMOTO, N.; YONEDA, Y. Molecular mechanisms associated with long-term consolidation of the NMDA signals. **Life Sci.** v. 67(4), p. 335-364, 2000.

PRYBYLOWSKI, K.; WENTHOLD, R. J. *N*-methyl-D-aspartate receptors: subunit assembly and trafficking to the synapse. **J Biol Chem.** v. 279, p. 9673–9676, 2004.

QUEVEDO, J.; FEIER, G.; AGOSTINHO, F.R.; MARTINS, M.R.; ROESLER, R. Memory consolidation and posttraumatic stress disorder. **Rev Bras Psiquiatr.** v. 25, p. 25-30, 2003.

RAN, I.; MIURA, R. M.; PUIL, E. Spermine modulates neuronal excitability and NMDA receptors in juvenile gerbil auditory thalamus. **Hear Res.** v. 176, p. 65-79, 2003.

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

RANSON, R. W.; STEC, N. I. Cooperative modulation of [³H]MK-801 binding to the *N*-methyl-D-aspartate receptor-ion channel complex by L-glutamate, glycine and polyamines. **J Neurochem.** v. 51, p. 830–836, 1988.

RICHARDSON, R.; LEDGERWOOD, L; CRANNEY, J. Facilitation of fear extinction by D-cycloserine: theoretical and clinical implications. **Learn Mem.** v.11(5):510-516, 2004.

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

REYNOLDS, I.J.; MILLER, R. J. Ifenprodil is a novel type of *N*-methyl-D-aspartate receptor antagonist: interaction with polyamines. **Mol Pharmacol.** v. 36, p. 758-65, 1989.

ROCK, D. M.; MACDONALD, R. L. Polyamine regulation of *N*-methyl-D-aspartate receptor channels. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.** v. 35, p. 463–482, 1995.

RODRIGUES, S. M.; SCHAFE, G. E.; LeDOUX, J. E. Intra-amygdala blockade of the NR2B subunit of the NMDA receptor disrupts the acquisition but not the expression of fear conditioning. **J Neurosci.** v. 21, p. 6889-6896, 2001.

ROESLER, R.; VIANNA, M. R. M., de-Paris F.; QUEVEDO, J.; WALZ, R.; IZQUIERDO, I. Infusions of AP5 into the basolateral amygdala impair the formation, but not the expression, of step-down inhibitory avoidance. **Braz j Med Biol Res.** v. 33, p. 829- 34, 2000.

ROESLER, R.; SCHRODER, N.; VIANNA, M. R.; QUEVEDO, J.; BROMBERG, E.; KAPCZINSKI, F.; FERREIRA, M. B; Differential involvement of hippocampal and amygdalar NMDA receptors in contextual and aversive aspects of inhibitory avoidance memory in rats. **Brain Res.** v. 975(1-2), p. 207-213, 2003.

ROSE, S. P. R. 'Smart Drugs': do they work? Are they ethical? Will they be legal? **Nat Rev Neurosci.** v. 53, p. 289-92, 2002.

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. **Neuro Report.** v. 8, p. 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. **Behav Pharmacol.** v. 11, p. 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. **Eur J Pharmacol.** v. 423, p. 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. Intra-amygdala administration of polyamines modulates fear conditioning in rats. **J Neurosci.** v. 24(9), p. 2328-2334, 2004.

RUSSELL, D; SYDER, S. H. Amine synthesis in rapidly grow-ing tissues: ornithine decarboxylase activity in regenerat-ing rat liver, chick embryo, and various tumors. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 60, p. 142. **Physiol Behav.**0–1427, 1968.

SANDERS, M. J.; WILTGEN, B.J.; FANSELOW, M.S. The place of the hippocampus in fear conditioning. **Eur J Pharmacol.** v. 463, p. 217-223, 2003.

SCHAFE, G. E.; NADER, K.; BLAIR, H. T.; LeDOUX, J. E. Memory consolidation of Pavlovian fear conditioning: a cellular and molecular perspective. **Trends Neurosci.** v. 24, p. 540-546, 2001.

SCHENBERG, E. E.; SOARES, J. C.; OLIVEIRA, M. G. Effects of pre- or post-training entorhinal cortex AP5 injection on fear conditioning v. 86(4), p. 508-515, 2005.

SEILER, N.; KNODGEN, B.; GITTO, M. W.; CHAN, W. Y.; GRIESMANN, G.; RENNERT, O. M. On the formation of amino acids deriving from spermidine and spermine. **Biochem J.** v. 200(1), p. 123-32, 1981.

SEILER, N.; KNÖDGEN, B. N-(3-aminopropyl)pyrrolidin-2-one: a physiological excretory product deriving from spermidine. **Int J Biochem.** v. 15(7), p. 907-915, 1983.

SEILER, N.; BOLKENIUS, F. N.; KNÖDGEN, B. The influence of catabolic reactions on polyamine excretion. **Biochem J.** v. 255, p. 319–322, 1985.

SEILER, N.; DELCROS, J. G.; MOULINOX, J. P. Polyamine transport in mammalian cells. An update. **Int J Biochem Cell Biol.** v. 28(8), p. 843-61, 1996.

SEILER, N. Catabolism of polyamines. **Amino Acids.** v. 26, p. 217-233, 2004.

SEILER, N.; RAUL, F., Polyamines and apoptosis. **J. Cell. Med.** v. 9(3), p. 623-642, 2005.

SIGURDSSON, T.; DOYÈRE, V.; CAIN, C.K.; LeDOUX, J.E. Long-term potentiation in the amygdala: A celular mechanism of fear learning and memory. **Neuropharmacology.** (*in press*), 2006.

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. . **Eur J Pharmacol.** v. 262, p. 293–300, 1994.

SHIN, W. W.; FONG, W. F.; PANG, S. F.; WONG, P.C. Limited blood-brain barrier transpot of polyamines. **J Neurochem.** v. 44(4), p. 1056-9, 1985.

SHIN, J.; SHEN, F.; HUGUENARD, J. R., Polyamines modulate AMPA receptor-dependent synaptic responses in immature layer v pyramidal neurons. **J Neurophysiol.** v. 93(5), p. 2634-2643, 2005.

SQUIRE, L. R.; ZOLA, S. M. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 93, p. 13515–13522, 1996.

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

STECHER, J.; MUELLER, W. E.; HOYER, S. Learning abilities depend on NMDA-receptor density in hippocampus in adult rats. **J Neural Transm.** v. 104, p. 281-289, 1997.

STICKGOLD, R. Sleep-dependent memory consolidation. **Nature.** v. 437, p. 1272-1278, 2005.

TABOR, C. W.; TABOR, H. Polyamines. **Annu Review Biochem.** v. 53, p. 749–790, 1984.

TADANO, T.; HOZUMI, S.; YAMADERA, F.; MURATA, A.; NIIJIMA, F.; TAN-NO, K.; NAKAWASAI, O.; KISARA, K. Effects of NMDA receptor-related agonists on learning and memory impairment in olfactory bulbectomized mice. **Methods Find Exp Clin Pharmacol.** v. 26(2), p. 93-97, 2004.

THOMAS, T.; THOMAS, T. J. Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. **Cell Mol Life Sci.** v. 58, p. 244-258, 2001.

TRAYNELIS, S. F.; HARTLEY, M.; HEINEMANN, S. F. Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines. **Science.** v. 268, p. 873-876, 1995.

ULAS, J.; BRUNNER, L. C.; GEDDES, J. W.; CHOE, W.; COTMAN, C. W. N-methyl-D-aspartate receptor complex in the hippocampus of elderly, normal individuals and those with Alzheimer's disease. **Neuroscience.** v. 49, p. 45-61, 1992.

URDIALES, J. L.; MEDINA, M. A. Â.; SANCHEZ-JIMENEZ, F. Polyamine metabolism revisited. **Eur J Gastroenterol Hepato.** v. 13, p. 1015-1019, 2001.

USHERWOOD, P. N. R. Natural and synthetic polyamines: modulators of signalling proteins. **IL Farmáco**. v. 55, p. 202-205, 2000.

WALKER, D. L. RESSLER, K. J.; LU, K.T., DAVIS, M. Facilitation of conditioned fear extinction by systemic administration or intra-amygdala infusions of D-cycloserine as assessed with fear-potentiated startle in rats. **J Neurosc**. v. 22(6), p. 2343–2351, 2002.

WALKER, D. L.; DAVIS, M. Are fear memories made and maintained by the same NMDA receptor-dependent mechanisms? **Neuron**. v. 41, p. 680-682, 2004.

WILLIAMS, K.; ROMANO, C.; MOLINOFF, P. B. Effects of polyamines on the Binding of [³H]MK-801 to the *N*-methyl-D-aspartate receptor: Pharmacological evidence for the existence of a polyamine recognition site. **Mol Pharmacol**. v. 36, p. 575–581, 1989.

WILLIAMS, K.; DAWSON, V. L.; ROMANO, C.; DICHTER, M. A.; MOLINOFF, P. B. Characterization of polyamines having agonist, antagonist, and inverse agonist effects at the polyamine recognition site of the NMDA receptor. **Neuron**. v. 5, p. 199–208, 1990.

WILLIAMS, K. Modulation of the *N*-methyl-D-aspartate receptors by polyamines: molecular pharmacology and mechanisms of action. **Biochem Soc Trans**. v. 22, p. 884-887, 1994.

WILLIAMS, K. Modulation and block of ion channels: a new biology of polyamines. **Cell Signal**. v. 9(1), p. 1-13, 1997a.

WILLIAMS, K. Interactions of polyamines with ion channels. **BiochemJ**. v. 325(2), p. 289-297, 1997b.

YAMAKURA, T.; SHIMOJI, K. Subunit- and site-specific pharmacology of the NMDA receptor channel. **Prog Neurobiol**. v. 59, p. 279–298, 1999.

YOSHIDA, M.; MEKSURIYEN, D.; KASHIWAGI, K.; KAWAI, G.; IGARASHI, K. Polyamine stimulation of the synthesis of oligopeptide-binding protein (OppA) involvement of a structural change of the shine-dalgarno sequence and the initiation codon aug in OppA mRNA*. **J Biol Chem**. v. 274 (32), p. 22723–22728, 1999.

YESAVAGE, J. A.; MUMENTHALER, M. S.; TAYLOR, J. L.; FRIEDMAN, L.; O' HARA, R.; SHEIKH, J.; TINKLENBERG, J.; WHITEHOUSE, P. J. Donepezil and flight simulator performance: effects on retention of complex skills. **Neurology**. v. 61(5), p. 721, 2002.

ZIGMOND, M. J.; BLOOM, F. E.; LANDIS, S. C.; ROBERTS, J. L.; SQUIRE, L. R. **Fundamental Neuroscience**, London: Academic Press, 1999.