

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

**ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE ESPERMIDINA E  
ARCAÍNA ALTERA A MEMÓRIA DA TAREFA DE  
ESQUIVA INIBITÓRIA EM RATOS:  
ENVOLVIMENTO DA DEPENDÊNCIA DE ESTADO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Ana Paula Chiapinotto Ceretta**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2006**

**ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE ESPERMIDINA E  
ARCAÍNA ALTERA A MEMÓRIA DA TAREFA DE ESQUIVA  
INIBITÓRIA EM RATOS: ENVOLVIMENTO DA  
DEPENDÊNCIA DE ESTADO**

por

**Ana Paula Chiapinotto Ceretta**

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

**Orientador: Prof<sup>a</sup>. Maribel Antonello Rubin**

**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 ESPERMIDINA E ARCAÍNA  
ALTERA A MEMÓRIA DA TAREFA DE ESQUIVA INIBITÓRIA EM  
RATOS: ENVOLVIMENTO DA DEPENDÊNCIA DE ESTADO**

elaborada por  
**Ana Paula Chiapinotto Ceretta**

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

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Maribel Antonello Rubin**  
(Presidente/Orientadora)

**Marino Muxfeldt Bianchin, Dr.(UFRGS)**

**Kátia Padilha Barreto, Dr<sup>a</sup> (UFSM)**

Santa Maria, 06 de dezembro de 2006.

## DEDICATÓRIA

Dedico a conquista desta etapa e de todas as outras, profissionais e pessoais, aos meus queridos pais, Ivo e Orilde, pelo apoio, incentivo, dedicação, pela presença constante na minha formação acadêmica e por me ensinarem valores morais de lealdade, humildade, respeito e valorização do estudo, o único bem precioso que não se vende, se compra ou se empresta.

À minha irmã, pelo apoio e companheirismo nas horas de descontração e mesmo não expressando, pela torcida pelo meu sucesso.

Ao meu noivo, Eduardo, pela compreensão e incentivo durante todo o tempo de elaboração desta dissertação, por estar sempre ao meu lado apoiando nas horas mais difíceis, pelo seu amor que me dá forças para continuar sempre em frente com meus objetivos e por me tornar uma pessoa melhor. À ele, companheiro amado para sempre.

## **AGRADECIMENTOS**

À Professora Maribel Antonello Rubin, por confiar e oferecer a oportunidade de ingressar neste mundo da pesquisa e permitir desenvolver este trabalho.

Aos amigos Alessandra, Carine, Camila, Flávia, Lia, Juliana, Mateus, Sara, Vivi, agradeço pelas conversas descontraídas, pelas palavras de apoio em certos momentos e pela amizade. Com certeza sempre serão lembradas com carinho.

À Keli, uma pessoa convicta, dedicada e amiga, que sempre compartilhou entusiasticamente de várias idéias, apoiando-me em todas as horas, pela sinceridade de uma amizade que não se formou somente por uma hora, dia ou mês, e sim por uma vida inteira.

*“A estrada para o sucesso não é uma reta. Há uma curva chamada fracasso, um trevo chamado confusão, um quebra-molas chamado amigos, faróis de advertência chamados família e pneus furados chamados empregos. Mas... se você tiver um estepe chamado determinação, um motor chamado perseverança, um seguro chamado fé e um motorista chamado Jesus, você chegará a um lugar chamado sucesso.”*

(Autor Desconhecido)

## RESUMO

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

### **ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA DE ESPERMIDINA E ARCAÍNA ALTERA A MEMÓRIA DA TAREFA DE ESQUIVA INIBITÓRIA EM RATOS: ENVOLVIMENTO DA DEPENDÊNCIA DE ESTADO**

Autora: Ana Paula Chiapinotto Ceretta

Orientadora: Maribel Antonello Rubin

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 06 de dezembro de 2006.

As poliaminas, putrescina, espermidina e espermina estão presentes em altas concentrações no sistema nervoso central e, por sua natureza policatiônica, podem interagir com sítios aniônicos de macromoléculas (ácidos nucléicos e proteínas) e modulam o aprendizado e a memória interagindo com o sítio de ligação das poliaminas no receptor N-metil-D-aspartato. Neste estudo nós investigamos os efeitos da administração sistêmica de espermidina e arcaína sobre a memória da tarefa de esquiva inibitória em ratos. Também foi determinado se os efeitos da espermidina e arcaína envolvem dependência de estado. Os animais foram treinados em um aparelho de esquiva inibitória (0,4 mA, 3 seg) e testados no mesmo aparelho, 24 horas depois. A administração imediatamente após o treino de espermidina (50 mg/kg, i.p.) melhorou, enquanto que arcaína (10 e 30 mg/kg, i.p.) prejudicou a latência de descida da plataforma no teste da esquiva inibitória. A administração de espermidina (50 mg/kg, i.p.) 15 minutos antes do teste não afetou a performance dos ratos que foram injetados com espermidina (50 mg/kg, i.p.) ou veículo imediatamente após o treino. Entretanto, a administração de arcaína (30 mg/kg, i.p.) 15 minutos antes do teste reverteu o prejuízo da memória causado pela administração de arcaína (30 mg/kg, i.p.) imediatamente após o treino. A administração de arcaína (30 mg/kg, i.p.) ou MK-801 (0,03 mg/kg, i.p.) antes do teste reverteu parcialmente o prejuízo da memória causado pela administração de arcaína (30 mg/kg) ou MK-801 (0,03 mg/kg) imediatamente após o treino, caracterizando dependência de estado cruzada. Estes resultados sugerem que a melhora da memória causada pela administração de espermidina imediatamente após o treino não é devido à dependência de estado. Em contraste, o prejuízo da memória induzido pela arcaína é devido a uma dependência de estado. A dependência de estado cruzada entre arcaína e MK-801 sugere que a dependência de estado induzida pela arcaína envolve a hipofunção do receptor NMDA.

Palavras-chave: Poliaminas, espermidina, arcaína, receptor NMDA, memória, dependência de estado.

## **ABSTRACT**

Dissertation of Master's degree  
Post-Graduate Course in Toxicological Biochemistry  
Federal University of Santa Maria

### **SYSTEMIC ADMINISTRATION OF SPERMIDINE AND ARCAINE ALTERS MEMORY OF THE INIBITORY AVOIDANCE TASK IN RATS: STATE DEPENDENCE INVOLVIMENT.**

Author: Ana Paula Chiapinotto Ceretta

Advisor: Maribel Antonello Rubin

Date and place of defense: Santa Maria, December 6<sup>th</sup> 2006.

The polyamines, putrescine, spermidine and spermine, are present in high concentrations in the central nervous system and, because of their policationic nature, they can interact with diverse cellular anionic targets (nucleic acids and proteins) and modulate the learning and memory by interacting with the polyamine binding site at N-methyl-D-aspartate receptor. In this study we investigated the effects of the systemic administration of spermidine and arcaine on the memory of the inhibitory avoidance task in rats. It was also determined whether the effects of the spermidine and arcaine involve state dependence. The animals were trained in an inhibitory avoidance apparatus (0.4 mA, 3s) and tested in the same apparatus 24 hours later. Immediate post-training administration of spermidine (50 mg/kg, i.p.) improved, while arcaine (10 and 30 mg/kg, i.p.) impaired step-down latencies in the inhibitory avoidance test. Administration of spermidine (50 mg/kg, i.p.) 15 minutes before testing did not alter the performance of rats which were injected with spermidine (50 mg/kg, i.p.) or vehicle immediately after training. However, administration of arcaine (30 mg/kg, i.p.) 15 minutes before testing reverted the impairment of memory caused by the administration of arcaine (30 mg/kg, i.p.) immediately after training. Administration of arcaine (30 mg/kg, i.p.) or MK-801 (0.03 mg/kg, i.p.) before testing partially reverted the impairment of memory caused by the administration of arcaine (30 mg/kg, i.p.) or MK-801 (0.03 mg/kg, i.p.) immediately after training, characterizing a crossed state dependence. The results suggest that memory improvement caused by the administration of spermidine immediately after training is not due to state dependence. In contrast, the impairment of memory induced by arcaine is due to state dependence. The crossed state dependence between arcaine and MK-801 supports that state dependence induced by arcaine is related to NMDA receptor hypofunction.

Keywords: Polyamines, spermidine, arcaine, NMDA receptor, memory, state dependence.



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Esquema da seqüência de modificações de um terminal sináptico glutamatérgico envolvido na formação da memória .....	21
FIGURA 2 – Representação esquemática da estrutura química das poliaminas.....	26
FIGURA 3 – Metabolismo das poliaminas.....	28
Figura 4 – Esquema de ações modulatórias da espermina sobre o receptor NMDA.....	31
FIGURA 5 – Efeito da administração imediatamente após o treino de espermidina (1, 10, 50 e 100 mg/kg, i.p.) sobre a latência de descida dos ratos da plataforma na sessão de teste na tarefa de esquiva inibitória. Os dados são mostrados como mediana ± intervalo interquartil. n=12–15 para cada grupo. SPD (espermidina). *Indica diferença significativa (p<0,05) comparado com o grupo controle .....	42
FIGURA 6 – Efeito da administração imediatamente após o treino de arcaína (1, 10, e 30 mg/kg, i.p.) sobre a latência de descida dos ratos da plataforma na sessão de teste na tarefa de esquiva inibitória. Os dados são mostrados como mediana ± intervalo interquartil. n=14 para cada grupo. ARC (arcaína). *Indica diferença significativa (p<0,05) comparado com o grupo controle. ....	43
FIGURA 7 – Efeito da administração de espermidina (50 mg/kg, i.p.) ou veículo (PBS, i.p.) imediatamente após o treino e 15 minutos pré-teste sobre a latência de descida dos ratos da plataforma na sessão de teste na tarefa de esquiva inibitória. Os dados são mostrados como mediana ± intervalo interquartil. n=12 para cada grupo. SPD (espermidina). *Indica diferença significativa (p<0,05) comparado com o grupo controle (PBS/PBS). ....	45
FIGURA 8 – Efeito da administração de arcaína (30 mg/kg, i.p.) ou veículo (PBS, i.p.) imediatamente após o treino e 15 minutos pré-teste sobre a latência de descida dos ratos da plataforma na sessão de teste na tarefa de esquiva inibitória. Os dados são mostrados como mediana ± intervalo interquartil. n=12	

para cada grupo. ARC (arcaína). \*Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) comparado com o grupo controle (PBS/PBS).....46

Figura 9 – Efeito da administração de arcaína (30 mg/kg, i.p.), MK-801 (0,03 mg/kg, i.p.) ou veículo (PBS, i.p.) imediatamente após o treino e 15 minutos (ARC) ou 30 minutos (MK) pré-teste sobre a latência de descida dos ratos da plataforma na sessão de teste na tarefa de esquiva inibitória. Os dados são mostrados como mediana  $\pm$  intervalo interquartil.  $n=14-17$  para cada grupo. ARC (arcaína), MK (MK-801). \*Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ), #Indica diferença significativa ( $p < 0,001$ ) comparado com o grupo controle (PBS/PBS).....47

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Efeito da administração imediatamente após o treino de espermidina (1, 10, 50 e 100 mg/kg, i.p.) e arcaína (1, 10 e 30 mg/kg, i.p.) sobre o comportamento dos ratos no teste do campo aberto. ....	44
TABELA 2 – Efeito da administração de espermidina (50 mg/kg, i.p.) ou veículo (PBS, i.p.) imediatamente após o treino e 15 minutos pré-teste sobre o comportamento dos ratos no teste do campo aberto. ....	45
TABELA 3 – Efeito da administração de arcaína (30 mg/kg, i.p.) ou veículo (PBS, i.p.) imediatamente após o treino e 15 minutos pré-teste sobre o comportamento dos ratos no teste do campo aberto .....	46
TABELA 4 – Efeito da administração de arcaína (30 mg/kg, i.p.), MK-801 (0,03 mg/kg, i.p.) ou veículo (PBS, i.p.) imediatamente pós-treino e 15 minutos (ARC) ou 30 minutos (MK) pré-teste sobre o comportamento dos ratos no teste do campo aberto. ....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AMPA – Ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico
- AMPc – Adenosina monofosfato cíclica
- ANOVA – Análise de variância
- AP5 – Ácido D-2-amino-5-fosfonopentanóico
- ARC – Arcaína
- Ca<sup>2+</sup> - cálcio
- CaMKII – Proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina do tipo II
- CPG – Ácido DL-beta-clorofenil glutâmico
- CPP – (3-(-2-carboxipiperazina-4-propil)1-fosfato)
- CREB – Proteína ligante do elemento responsivo ao AMPc
- dcSAM – S-adenosilmetionina descarboxilase
- DNA – Ácido desoxirribonucléico
- GABA – Ácido  $\delta$ -aminobutírico
- GAP-43 – Proteína do terminal axônico associado ao crescimento
- K<sup>+</sup> – Potássio
- L-NAME – N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina metil éster
- LTP – Potencialização de longa duração
- mRGLU – Receptor glutamatérgico metabotrópico
- MAPK – Proteína ativada por mitógenos
- MK – MK-801 ou dizolcipina
- MK-801 – (+)5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,b]-ciclohepteno-5-10-amino
- MTA – Metiltioadenosina
- Na<sup>+</sup> – Sódio
- NMDA – N-metil-D-aspartato
- ODC – L- ornitina descarboxilase
- PAF – fator de agregação plaquetária

PBS – Tampão fosfato em salina

PCP – fenciclidina

PKA – Proteína quinase dependentes de AMPc

PKG – Proteína quinase dependente de GMPc

PKC – Proteína quinase dependente de cálcio

RNA – Ácido ribonucléico

SAM – S-adenosil-metionina

SAMDC – S-adenosil-metionina descarboxilada

SNC – Sistema Nervoso Central

SPD – Espermidina

SPM – Espermina

SSAT – Espermidina/espermina N<sup>1</sup>acetil-transferase

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>1.1 Memória</b> .....	16
1.1.1 Noções sobre os mecanismos da memória.....	18
1.1.2 Dependência de estado.....	21
<b>1.2 Receptores N-metil-D-aspartato</b> .....	22
1.2.1 Envolvimento do receptor NMDA na formação da memória.....	23
<b>1.3 Poliaminas</b> .....	25
1.3.1 Metabolismo das Poliaminas.....	26
1.3.2 Função das Poliaminas.....	28
1.3.3 Poliaminas e Receptor NMDA.....	30
1.3.4 Poliaminas, Receptor NMDA e Memória.....	31
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	34
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	35
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	35
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	36
<b>3.1 Animais</b> .....	37
<b>3.2 Drogas</b> .....	37
<b>3.3 Testes comportamentais</b> .....	37
3.3.1 Esquiva inibitória.....	37
3.3.2 Teste do campo aberto.....	38
<b>3.4 Experimentos</b> .....	38
3.4.1 Experimento 1: Efeito da SPD e ARC sobre a consolidação da memória: Curva dose-efeito .....	38
3.4.2 Experimento 2: Avaliação da possível dependência de estado causada pela SPD sobre a memória.....	39

3.4.3 Experimento 3: Avaliação da possível dependência de estado causada pela ARC sobre a memória.....	39
3.4.4 Experimento 4: Avaliação da possível dependência de estado cruzada causada pela ARC e MK-801.....	39
3.4.5 Análise Estatística.....	40
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>41</b>
<b>4.1 Experimento 1: Efeito da SPD e ARC sobre a consolidação da memória: Curva dose-efeito</b> .....	<b>42</b>
<b>4.2 Experimento 2: Avaliação da possível dependência de estado causada pela SPD sobre a memória</b> .....	<b>44</b>
<b>4.3 Experimento 3: Avaliação da possível dependência de estado causada pela ARC sobre a memória</b> .....	<b>45</b>
<b>4.4 Experimento 4: Avaliação da possível dependência de estado cruzada causada pela ARC e MK-801</b> .....	<b>47</b>
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>49</b>
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>55</b>
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>57</b>





## 1.1 Memória

Como lembramos de um fato ocorrido em determinado tempo passado ou o nome daquela amiga de infância? O que faz nós esquivarmos os dedos das tomadas? Por que não esquecemos de como andar de bicicleta?

O que faz sermos quem somos e que nos difere entre si são justamente as diferentes memórias de fatos vividos. Como diz o professor Dr. Iván Izquierdo : “...somos aquilo que recordamos, literalmente. Não podemos fazer aquilo que não sabemos como fazer, nem comunicar nada que desconhecamos, isto é, nada que não esteja na nossa memória...”

Desde a infância temos experiências que ficam armazenadas na forma de lembranças e que, muito tempo depois, podemos relembrar e partilhar essas vivências com nossos amigos, filhos e netos. Essas experiências adquiridas em segundos, semanas ou anos podem ser muito visuais (casa de infância), outras só olfativas (cheiro de um perfume) outras completamente motoras ou musculares (nadar ou andar de bicicleta). Algumas nos dão prazer ao lembrar e outras são tão terríveis que preferimos esquecer (Izquierdo, 2002).

Assim, a memória envolve um complexo mecanismo que abrange armazenar informações que possam ser recuperadas e utilizadas posteriormente (Lent, 2004). O aprendizado e memória são então fundamentais para a experiência humana, uma vez que aquilo que é aprendido modifica nossos encéfalos de uma maneira tal que é possível mantermos o novo conhecimento em nossa memória por um tempo bastante longo (Squire & Kandel, 2003).

O conjunto destas memórias determina a nossa personalidade e a forma de ser, de viver e de agir de cada um, e por isso somos únicos e completamente diferentes. A perda da memória leva à perda de si mesmo, à perda da história de uma vida e das interações duradouras com outros seres humanos (Izquierdo, 2002; Squire & Kandel, 2003).

As memórias podem ser classificadas quanto à sua natureza em memória declarativa ou explícita e não-declarativa ou implícita. A **memória declarativa** ou **explícita** é aquela memória que registra fatos e eventos que tenham ocorrido e que podemos evocar por meio de palavras. É aquela memória para o nome de um amigo, as últimas férias do verão. É facilmente adquirida com plena intervenção da

consciência (recordação), mas também é facilmente esquecida. A memória de **trabalho** é uma memória declarativa que não forma "arquivos", ela é necessária para manter uma informação durante poucos segundos ou minutos até o momento de utilizá-la (se é uma informação nova e convém guardá-la) ou descartá-la (se já existe) (Izquierdo, 2002; Ashby & O'Brien, 2005). A **memória não-declarativa** ou **implícita** refere-se àquela memória que não conseguimos verbalizar e não envolve evocação consciente, são aquelas memórias para habilidades ou procedimentos, como habilidades para dirigir um automóvel, tocar piano ou andar de bicicleta. Ela é adquirida através de prática e requer repetições, é expressa como uma mudança no comportamento, persiste por mais tempo com menor probabilidade de esquecimento (Bear et al., 2002; Izquierdo, 2002; Squire & Kandel, 2003).

As memórias também podem ser classificadas quanto ao tempo de retenção em memória de curta e longa duração e memória remota. As **memórias de curta duração** duram pouco tempo (minutos ou 3 a 6 horas) enquanto a **memória de longa duração** está sendo formada, se estas memórias durarem muitos meses ou anos costumam ser denominadas de **memórias remotas** (Lees & Jones, 2000; Bear et al., 2002; Izquierdo, 2002; Izquierdo, 2004).

O aprendizado e a formação desses tipos de memória dependem de estruturas cerebrais diferentes. A memória de trabalho parece depender da atividade elétrica de células de uma região cerebral denominada córtex pré-frontal (Izquierdo, 2002; Izquierdo, 2004). As memórias declarativas são processadas por estruturas do lobo temporal e suas conexões enquanto a memória não declarativa parece envolver estruturas como estriado e o diencéfalo (Izquierdo & Medina, 1995).

As memórias de curta e de longa duração requerem as mesmas estruturas nervosas, mas envolvem mecanismos separados (Izquierdo et al., 1998, Izquierdo, 2002) como, por exemplo, ativação de genes e produção de novas proteínas (Lee & Jones, 2000).

Na determinação da seqüência de processos envolvidos na formação, consolidação e evocação de memórias tem-se utilizado uma tarefa muito simples, a tarefa de esquivar inibitória, onde se pode claramente diferenciar as fases da memória. Ela envolve a formação de uma memória declarativa onde o animal aprende que ao descer de uma plataforma ele recebe um choque. Numa exposição subsequente, o animal ficará mais tempo acima da plataforma em vez de descer.

Ou seja, o animal inibe uma resposta (descer de uma plataforma) para não receber um estímulo aversivo (um choque elétrico) (Izquierdo et al, 2006). Esta tarefa é adquirida muito rapidamente em um único treino e envolve a repressão específica da tendência natural dos ratos para explorar além da plataforma. Esta memória corresponde àquela em que nós evitamos colocar os dedos na tomada ou evitamos entrar numa rua perigosa (Izquierdo & Medina, 1997; Izquierdo, 2002, Izquierdo et al, 2006). Estudos demonstram que este tipo de memória declarativa envolve estruturas encefálicas como hipocampo, amígdala, septo medial e córtex entorrinal, cada estrutura estaria envolvida em tempos diferentes no processo de consolidação da memória (Izquierdo & Medina, 1995).

### **1.1.1 Noções sobre os mecanismos da memória**

O período em que ocorre o aprendizado de uma informação (treino) é a fase de aquisição da memória. Após, essa informação acompanha um período de armazenamento onde passa de um estado lábil a um estado mais fixo, a fase de consolidação da memória, que pode durar horas ou até mesmo dias. Na fase de consolidação, as memórias são bastante suscetíveis a interferências por drogas ou por outras perturbações como trauma, eletrochoque, etc. No momento de lembrar essa informação adquirida (teste) denominamos fase de evocação da memória (McGaugh, 2000; Abel & Lattal, 2001; Bear et al., 2002; Izquierdo, 2002; Squire & Kandel, 2003).

Tarefas como esquiva inibitória, que são aprendidas muito rapidamente, fornecem informações sobre qual fase da memória está sendo modulada por um determinado tratamento. Assim, se drogas são administradas antes do treino é difícil determinar se essa droga está agindo sobre a memória ou sobre outros aspectos inespecíficos (atividade locomotora, atenção, ansiedade) que poderiam afetar o aprendizado e a evocação. Por outro lado, o uso de tratamentos administrados pouco depois do treino para melhorar ou prejudicar a memória, fornece um método usado extensivamente e altamente efetivo de influenciar a consolidação da memória sem afetar a aquisição ou a evocação da memória (McGaugh, 1973, McGaugh, 1989, McGaugh & Izquierdo, 2000).

Há evidências de que os mecanismos bioquímicos pelos quais formamos a memória são diferentes dos mecanismos pelos quais a evocamos (Abel & Lattal, 2001; Izquierdo, 2004) e envolvem uma miríade de eventos moleculares que ocorrem em locais, estruturas e em tempos diferentes no sistema nervoso central (Izquierdo et al, 2006).

O mecanismo celular de aprendizado e memória envolve a plasticidade sináptica como a potencialização de longa duração – LTP. A LTP é um aumento duradouro na efetividade sináptica de uma dada via, ocasionado pela sua estimulação (Bliss & Collingridge, 1993). A LTP está comumente associada com a consolidação da memória, porém a formação da memória e a LTP compartilham alguns passos semelhantes, como por exemplo, o envolvimento do receptor glutamatérgico N-metil-D-aspartato (NMDA) (Izquierdo & Medina, 1995; Izquierdo, 2002) uma vez que a administração de antagonistas desses receptores, CPP (3-(-2-carboxipiperazina-4-propil)1-fosfato), AP5 (ácido-2-amino-5-fosfonopentanóico) e o bloqueador do canal iônico MK-801, impedem a formação da LTP em ratos (Wayner et al., 2000; Fathollahi & Salami, 2001; Escobar et al., 2002).

Assim, alterações na liberação de neurotransmissores pelos neurônios, e eficiência na comunicação entre tais neurônios no hipocampo, amígdala, córtex cerebral e outras estruturas encefálicas, parecem ser eventos neuroquímicos primários para a formação da memória (McGaugh, 2000; McGaugh & Izquierdo, 2000). No caso da tarefa de esquiva inibitória, evidências experimentais sugerem que estruturas como hipocampo, amígdala e córtex entorrinal estão envolvidos nesta forma de aprendizado e, além disso, os eventos moleculares parecem envolver ativação de receptores glutamatérgicos NMDA (Jerusalinsky et al, 1992, Liang et al, 1994, Zanatta et al, 1996, Roesler et al, 1998, Roesler et al, 2000, Roesler et al, 2003, Lalumiere et al, 2004).

A consolidação da memória de longa duração da tarefa de esquiva inibitória começa imediatamente após a aquisição e dura muitas horas. Isto leva a uma seqüência de eventos bioquímicos na região do hipocampo que é muito similar àquelas envolvendo LTP na mesma região (Izquierdo & Medina, 1997; McGaugh, 2000).

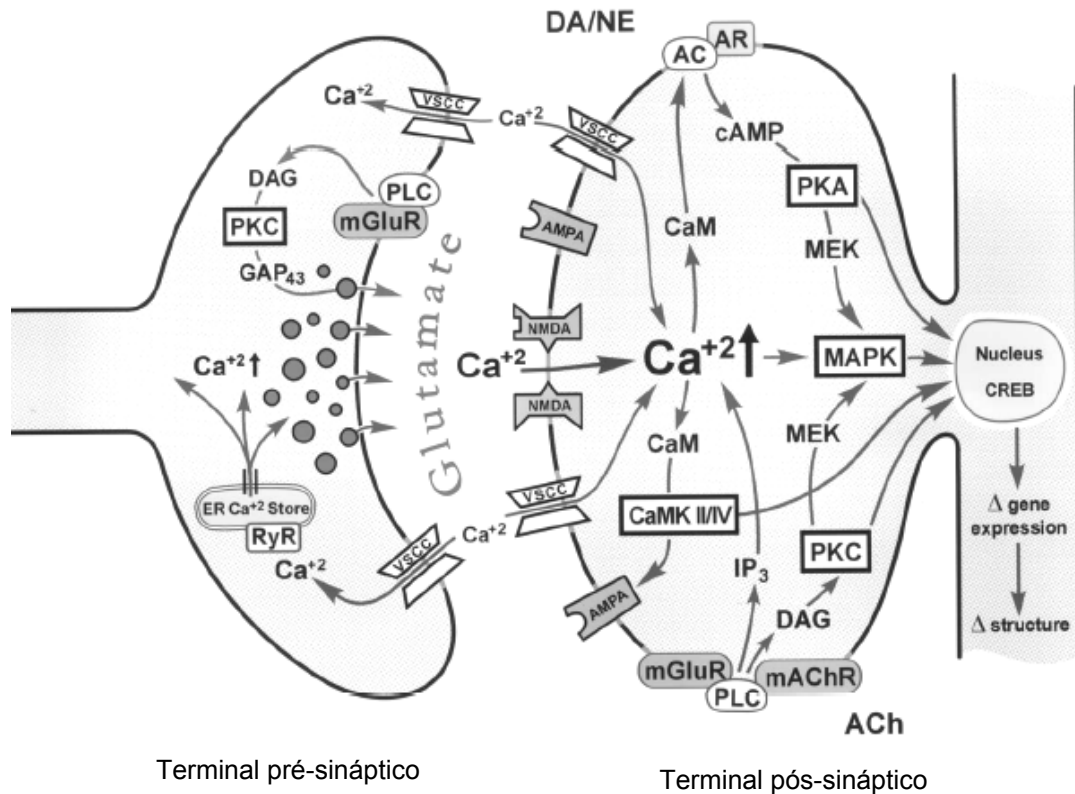
A cascata de reações para a formação da memória inicia quando o glutamato é liberado, se liga a receptores específicos na membrana pós-sináptica: ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA), cainato, N-metil-D-

aspartato (NMDA) e receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mRGLU) (Figura 1). Esta ligação leva a uma despolarização persistente da célula (ingresso de  $\text{Na}^+$  através de receptores do tipo AMPA) e assim promove a retirada do  $\text{Mg}^{2+}$  do receptor NMDA, que passa a responder ao glutamato permitindo o ingresso de  $\text{Ca}^{2+}$  na célula. Esse aumento na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular estimula enzimas como: proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina do tipo II (CaMKII - atua fosforilando e ativando os receptores AMPA) e proteínas quinase dependentes de GMPc (PKG). Esta última participa liberando substâncias como óxido nítrico, monóxido de carbono e fator de agregação plaquetária (PAF) as quais aumentam ainda mais a liberação de glutamato. Outra enzima, a proteína quinase dependente de cálcio (PKC), contribui fosforilando a proteína do terminal axônico, a GAP-43, que também mobiliza mais glutamato. Isso mantém por poucas horas a transmissão sináptica ativada. Passado 3-4 horas, são ativadas as proteínas quinase dependentes de AMPc (PKA) e as proteínas ativadas por mitogênio (MAPK). Estas junto com a PKC fosforilam fatores de transcrição protéicos no núcleo, dos quais o principal é a proteína ligante do elemento responsivo ao AMPc (CREB), culminando com a síntese de novas proteínas e com o aumento na efetividade da transmissão de informações entre os neurônios (Bliss & Collingridge, 1993; Izquierdo & Medina 1995, 1997; McGaugh & Izquierdo, 2000; Bear et al, 2002; Izquierdo, 2002; Izquierdo et al, 2006).

Todos esses processos também estão sujeitos à modulação, inclusive por outros neurotransmissores diferentes do glutamato, entre estes, dopamina, noradrenalina, serotonina, acetilcolina, ácido  $\delta$ -aminobutírico (GABA) que são liberados por neurônios presentes na própria estrutura ou em estruturas adjacentes (Bliss & Collingridge, 1993; Izquierdo, 1993; Cahill & McGaugh, 1998, McGaugh, 2000, Abel & Lattal, 2001; McGaugh, 2002).

Além disso, essas etapas podem ser moduladas através da aplicação de agonistas, antagonistas e moduladores dos diversos receptores glutamatérgicos, inibidores específicos das enzimas mencionadas em diferentes estruturas e vários tempos após o treino de uma tarefa de memória. Alguns deles favorecem ou melhoram a memória como no caso de agonistas e moduladores positivos (poliaminas) de receptores glutamatérgicos NMDA e ativadores das enzimas PKA, PKG e CaMKII. Por outro lado, antagonistas destes receptores e inibidores destas

enzimas provocam amnésia em diversas tarefas (Izquierdo & Medina 1995, 1997; McGaugh & Izquierdo, 2000).



**Figura 1** – Esquema da seqüência de modificações de um terminal sináptico glutamatergico envolvido na formação da memória (adaptado de Gilbert & Lasley, 2002).

### 1.1.2 Dependência de estado

Em muitos casos, as memórias adquiridas sob uma situação estressante, como a aquisição de uma esQUIVA inibitória, incorporam ao seu conjunto de estímulos componentes da situação em que foram adquiridas. A evocação da memória não é somente a "reativação" da memória. No momento da evocação, o encéfalo deve recriar, em instantes, memórias que levaram horas para serem formadas (Izquierdo, 2002). Além disso, o processo de evocação da memória implica também em uma "reconsolidação" da memória prévia, uma vez que a informação armazenada é modificada durante a sua evocação (McGaugh, 2000, Abel & Lattal, 2001; Izquierdo, 2002; Squire & Kandel, 2003; Dalmaz & Netto, 2004).

Para que haja uma boa evocação de qualquer memória é conveniente apresentar o maior número possível de componentes da situação em que a memória foi adquirida, fenômeno este chamado de dependência de estado (Jackson et al., 1992; Slot & Colpaert, 1999; Shulz et al., 2000). As memórias ficam inacessíveis à evocação, a menos que as vias de acesso a elas sejam ativadas por alguma experiência que cause as mudanças neuroquímicas apropriadas para esse determinado contexto, estas memórias requerem certos estímulos que compreendam pelo menos parte da reprodução do estado em que foram originalmente adquiridas (Izquierdo, 2004).

Então, o aprendizado e a memória dependem da relação entre o estado endógeno desenvolvido após o treino e o estado endógeno que está presente no momento da evocação. Considerando que as memórias podem depender não só de estados neuro-humorais ou hormonais internos do indivíduo, mas também de estados causados pela administração de algumas drogas, quanto mais esse estado se pareça com aquele em que a memória foi adquirida, melhor será sua evocação (Izquierdo, 2004). Sob algumas condições, a modulação da memória (melhora ou prejuízo) pode ser resultado de uma dependência de estado em vez do que a influência de um tratamento farmacológico específico nos processos de consolidação da memória (Izquierdo, 1984, 1986).

Harrod e colaboradores (2001) mostraram que o prejuízo da memória causado pela administração pré-treino de MK-801 usando a tarefa de esQUIVA passiva é devido à dependência de estado, uma vez que a administração pré-teste de MK-801 reverte o prejuízo da memória causado pela administração pré-treino de MK-801. Outros antagonistas do receptor NMDA como fenciclidina, quetamina, CPP também provocam déficits de memória que produzem um estado sobre o qual a evocação da memória é dependente de estado (Jackson et al., 1992, Harrod et al., 2001). Outros estudos revelam ainda que o receptor NMDA estaria envolvido com a dependência de estado induzido pela morfina (Jafari-Sabet et al., 2005).

## **1.2 Receptores N-Metil-D-aspartato (NMDA)**

Os receptores glutamatérgicos, especialmente o receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), medeiam a maioria da neurotransmissão excitatória do SNC e são encontrados em alta densidade nas camadas superficiais de diferentes estruturas

como córtex cerebral, hipocampo, estriado, amígdala entre outras (Scatton, 1993; Ozawa et al., 1998, Riedel et al., 2003).

O receptor NMDA é formado por subunidades heteroméricas denominadas NR1, NR2 (A-D) e NR3 (A-B) que agrupadas formam um poro central com condutância seletiva para cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e sódio ( $\text{Na}^+$ ). No potencial de repouso o poro está bloqueado por íons  $\text{Mg}^{2+}$  impedindo a passagem de outros íons através do canal NMDA. Após uma despolarização prévia dos receptores glutamatérgicos pós-sinápticos do tipo AMPA, o  $\text{Mg}^{2+}$  sai do poro resultando no influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$  bem como no efluxo de potássio ( $\text{K}^+$ ). O influxo de cálcio que acompanha a ativação do receptor NMDA também é responsável pela ativação de proteínas quinases dependentes de cálcio como proteína quinase C e a proteína quinase dependente de cálcio-calmodulina II, as quais são responsáveis por algumas respostas celulares mediadas pelo receptor NMDA, que inclui formas de plasticidade sináptica (Bliss & Collingridge, 1993; Scatton, 1993; Izquierdo & Medina, 1995, 1997; Ozawa et al., 1998; Yamakura & Shimoji, 1999; McGaugh & Izquierdo, 2000; Riedel et al., 2003).

O receptor NMDA possui múltiplos sítios de ligação, tanto para compostos endógenos quanto exógenos. Dentre estes, existem sítios de ligação para agonistas tais como glutamato/NMDA e antagonistas deste sítio como AP5 (Ácido D-2-amino-5-fosfonopentanóico), sítio para a glicina (co-agonista) que liga serina e D-cicloserina como agonistas e ácido 7-cloroquinurênico como antagonista. Antagonistas como  $\text{Mg}^{2+}$ , MK-801(dizocilpina), quetamina, fenciclidina (PCP) entre outros podem se ligar bloqueando o canal NMDA. Além disso, existem sítios de ligação para agentes redox, prótons, zinco e poliaminas que podem modular a atividade do receptor (Ranson & Stec, 1988; Ozawa et al, 1998; Yamakura & Shimoji, 1999; Riedel et al., 2003).

### **1.2.1 Envolvimento do Receptor NMDA na formação da memória**

O receptor NMDA desperta alto interesse para pesquisa em relação a plasticidade sináptica e formação da memória como: altas concentrações em áreas corticais envolvidas na memória, alta permeabilidade a íons cálcio e bloqueio voltagem dependente (Izquierdo & Medina, 1995, 1997; Riedel et al., 2003). Estudos farmacológicos *in vivo* têm demonstrado que ambos antagonista competitivo ácido-



D-2-amino-5-fosfonopentanóico (AP5) administrado via intracerebroventricular e o antagonista não-competitivo do receptor NMDA dizolcipina (MK-801) administrado via sistêmica, causam prejuízo no desempenho dos ratos no labirinto aquático de Morris e na tarefa de esquiva inibitória, respectivamente (Morris et al., 1986; Harrod et al., 2001). Por outro lado, agonistas do receptor NMDA, como o glutamato (Izquierdo & Medina, 1995; Rubin et al., 1997) e o ácido DL-beta-clorofenil glutâmico (CPG) melhoram a performance dos ratos na tarefa de esquiva inibitória e de camundongos no labirinto em T, respectivamente (Flood et al., 1990).

Além disso, o número de receptores NMDA está reduzido em diferentes regiões do SNC de animais mais velhos comparados com animais mais jovens e também em pacientes com doença de Alzheimer, correlacionando assim a expressão de receptores NMDA com a habilidade de aprender. Esses trabalhos são corroborados com experimentos que demonstraram que a superexpressão de receptores NMDA em camundongos transgênicos produz um melhor desempenho desses animais em testes comportamentais de memória enquanto que animais que não expressam ou tem níveis diminuídos da subunidade NR1 ou NR2B do receptor NMDA que ocorre por processos como envelhecimento e doença de Alzheimer, apresentam um pior desempenho nestes testes (Magnusson, 1998; Tang et al, 1999; Shimizu et al, 2000; Riedel et al, 2003).

O receptor NMDA obviamente não trabalha sozinho. Neurônios colinérgicos, opióides e noradrenérgicos da amígdala e neurônios colinérgicos no hipocampo e GABAérgicos em ambos também têm sido apontados no processo de consolidação da memória (Izquierdo, 1991; McGaugh, 2002). A administração intra-amígdala de oxotremorina (agonista colinérgico muscarínico), e propranolol (bloqueador  $\beta$ -adrenérgico), facilitam e prejudicam, respectivamente, o desempenho dos ratos em tarefas de memória (Salinas et al., 1997). Contudo a injeção intracerebroventricular do agonista GABAérgico baclofen prejudica a retenção de memória em ratos (Zarrindast et al., 2001).

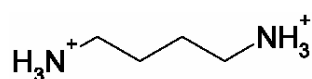
Contudo, a memória pode ser melhorada ou prejudicada através de manipulações na fase de consolidação (fase lábil) por administração de drogas administradas imediatamente pós-treino ou até 3 ou 6 horas depois. Há evidência de que o receptor NMDA é crítico para a aquisição e o início da consolidação de algumas tarefas (Izquierdo et al., 1992, Jerusalinsky et al., 1992, Izquierdo e Medina, 1995, 1997, Abel & Lattal, 2001). Receptores NMDA de estruturas como

hipocampo e amígdala são essenciais na fase inicial de consolidação da esquia inibitória uma vez que a administração intra-hipocampal ou intra-amigdalár de AP5 imediatamente após o treino, porém 30, 90, 180 ou 360 minutos após o treino, prejudica a memória. Por outro lado, os receptores NMDA do córtex entorrinal estão envolvidos na fase tardia da consolidação, onde AP5 piora a memória da esquia inibitória quando administrado no córtex entorrinal somente 30 a 180 minutos depois do treino, mas não imediatamente pós-treino (Jerusalinsky et al, 1992; Liang et al, 1994; Roesler et al, 1998; Roesler et al, 2000; Roesler et al, 2003; LaLumiere et al, 2004).

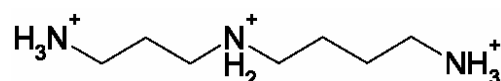
### 1.3 Poliaminas

Em 1678 Antoni van Leuwenhoek descreveu a presença de cristais de fosfato de espermina em amostras resfriadas de sêmen humano. Putrescina, espermidina e espermina são encontradas em todas as células eucarióticas, incluindo células do sistema nervoso de vertebrados. Também são constituintes de muitos compostos encontrados em plantas e insetos (Van Leuwenhoek, 1678; Carter, 1994; Morgan, 1998).

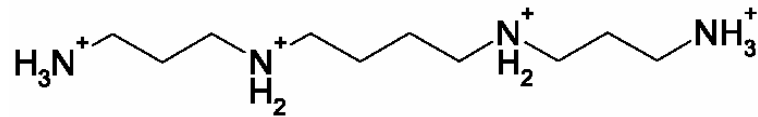
As poliaminas são moléculas alifáticas lineares de baixo peso molecular, compostas por uma, duas ou três cadeias carbonadas flexíveis, as quais são conectadas por átomos de nitrogênio. Elas também apresentam grupamentos amino primário nas extremidades da cadeia carbonada. Como mostra a figura 2, putrescina (1,4-diaminobutano) é uma di-amina primária, espermidina (mono-*N*-3-aminopropil-1,4-diaminobutano) é uma tri-amina e espermina (bis-*N*-3-aminopropil-1,4-diaminobutano) é uma tetra-amina, todas contêm grupamentos aminos primários ou secundários (Figura 2)(Carter, 1994; Teti et al., 2002).



**Putrescina**



**Espermidina**



**Espermina**

**Figura 2** – Representação esquemática da estrutura química das poliaminas (adaptado de Kalac & Krausová, 2005).

### 1.3.1 Metabolismo das poliaminas

As poliaminas encontradas nos seres humanos são sintetizadas no organismo ou provém da flora gastrintestinal capaz de metabolizar aminoácidos provenientes da dieta (Teti et al, 2002).

Distinguem-se duas maiores rotas de metabolismo das poliaminas: a via da produção (sínteses *de novo*) ou da interconversão e a via do catabolismo final das poliaminas. Nos vertebrados, a via de interconversão é um processo cíclico que controla o turnover das poliaminas e regula a homeostase das poliaminas intracelulares (Seiler et al, 1985; Seiler, 1987; Carter, 1994).

A figura 3 ilustra o metabolismo das poliaminas, que se inicia pela formação da putrescina a partir da ornitina por uma reação catalisada pela enzima ornitina descarboxilase (ODC), uma enzima limitante na síntese das poliaminas (Tabor & Tabor, 1984). A ornitina pode ser originada da dieta, como um produto do ciclo da uréia ou ainda, pode ser formada a partir da clivagem hidrolítica do aminoácido arginina em uma reação catalisada pela arginase (Seiler, 1981; Carter, 1994; Seiler, 1994; Morgan et al, 1998). A elevação da concentração de ornitina no encéfalo causa, portanto, o aumento da formação das poliaminas (Seiler et al., 1989). As outras duas poliaminas derivam da putrescina por adições sucessivas de dois grupos aminopropil pela ação de aminopropil-transferases, denominadas espermidina e espermina sintetase (Moinard et al, 2005). O grupamento aminopropil provém da S-adenosil-metionina descarboxilada (dcSAM) a qual foi obtida da metionina convertida em S-adenosilmetionina (SAM) que subseqüentemente é descarboxilada pela S-adenosilmetionina descarboxilase (SAMDC) formando a dcSAM (Casero & Pegg, 1993).

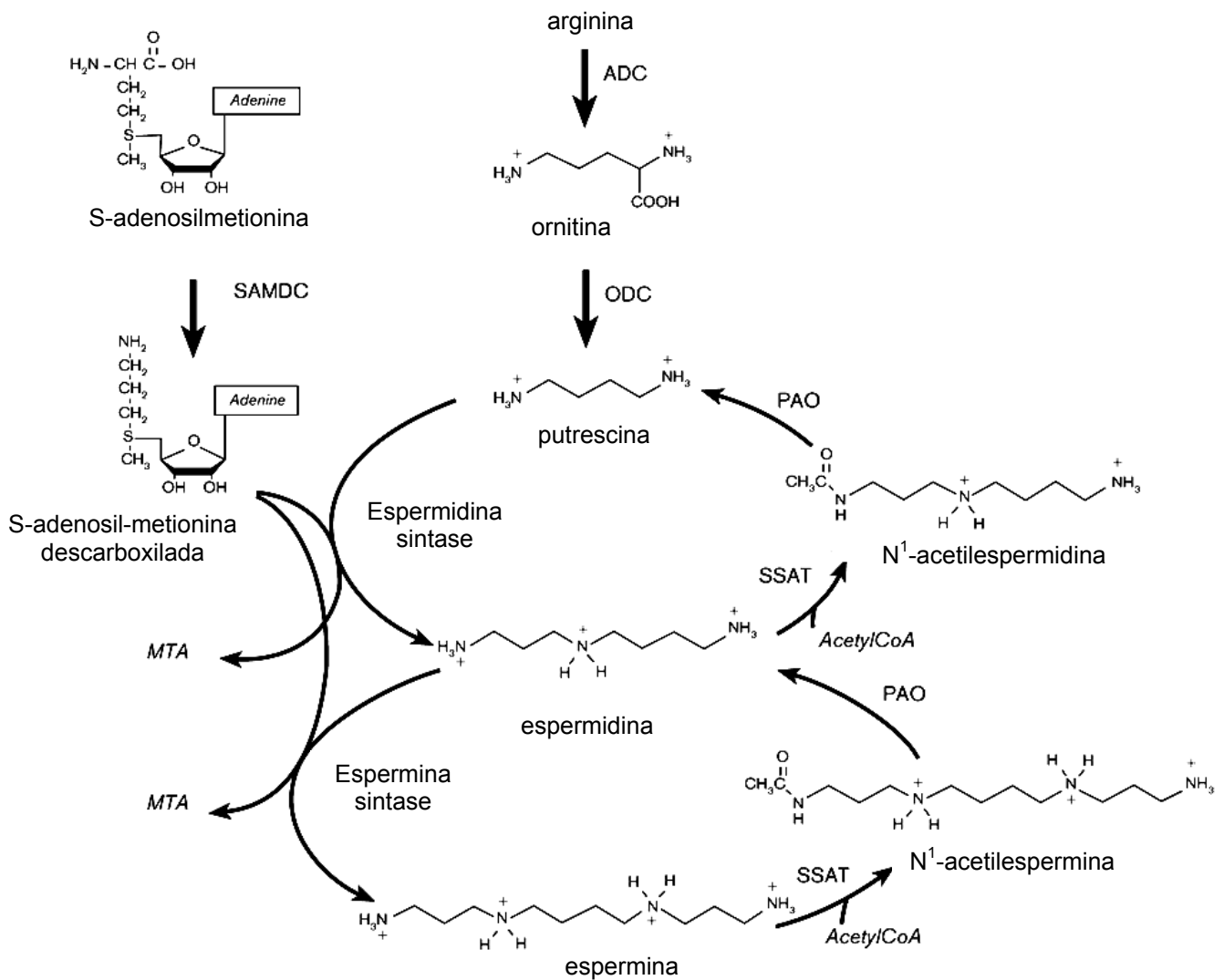
A espermidina é formada a partir da putrescina pela transferência de um grupamento aminopropil transferido da dcSAM, uma reação catalisada pela espermidina sintase. A espermidina formada pode vir a sofrer ação da enzima espermina sintase, a qual transfere um segundo grupo aminopropil de outra molécula de dcSAM para a espermidina originando a espermina. A síntese de espermidina e espermina depende da disponibilidade de doadores de grupamentos aminopropil, assim outra enzima limitante é a S-adenosilmetionina descarboxilase que cliva o resíduo carboxil da SAM formando S-adenosilmetionina descarboxilada disponível para as reações (Tabor & Tabor, 1984; Seiler, 1994, Moinard et al, 1998).

Embora as reações catalisadas pelas aminopropil-transferases sejam irreversíveis, espermina e espermidina podem ser recicladas em espermidina e putrescina na rota de interconversão. O encéfalo contém SPD/SPM N<sup>1</sup>-acetiltransferase (SSAT) que transforma as poliaminas em derivados monoacetil. Ambas enzimas utilizam acetilCoA como doador do grupo acetil. Pela ação da SSAT na espermina e espermidina, ocorre a formação da N1-acetilespermina e N1-acetilespermidina, os quais apresentam afinidade pela enzima poliamina oxidase, que rompe as ligações C-N entre os resíduos aminopropil e os grupos amino secundário para formar espermidina e putrescina respectivamente. Isso leva a uma diminuição da energia eletrostática levando a remoção das poliaminas dos seus sítios de ligação (Seiler, 1987; Seiler, 1994; Moinard et al, 2005).

O catabolismo final das poliaminas é feito por amino-oxidases dependentes de cobre. Pela desaminação oxidativa do grupamento amino primário, cada intermediário do ciclo da interconversão pode ser transformado em um aldeído, que é posteriormente oxidado em um aminoácido ou em um grupamento gama-lactâmico. Os produtos finais do catabolismo das poliaminas não podem ser reconvertidos em poliaminas novamente, assim podem ser excretadas via renal como poliaminas inalteradas, na forma de produtos acetilados e oxidados (Seiler, 1990; Carter, 1994; Urdiales et al., 2001; Teti et al., 2002).

Os níveis intracelulares de poliaminas podem ser regulados por mecanismos envolvendo os três passos de seu metabolismo: síntese de novo, rota de interconversão e catabolismo terminal pela interferência da atividade das enzimas chave: ornitina descaboxilase, S-adenosilmetionina descarboxilase e espermidina/espermina N<sup>1</sup>acetil-transferase, além da disponibilidade de acetilCoA,

pela regulação da acetilação de poliaminas, ou pela regulação da desaminação oxidativa (Seiler, 2004; Moinard et al, 2005).



**Figura 3** – Metabolismo das poliaminas. arginina descarboxilase (ADC); ornitina descarboxilase (ODC); S-adenosil-metionina descarboxilase (SAMDC); espermidina/espermina N<sup>1</sup>acetil-transferase (SSAT); poliamina oxidase (PAO); metiltioadenosina (MTA) (modificado de Urdiales et al., 2001).

### 1.3.2 Função das poliaminas

O caráter fortemente básico das poliaminas implica na protonação de todos os grupos amino em pH fisiológico, possibilitando que as poliaminas interajam com ânions. Essas interações eletrostáticas das poliaminas com sítios aniônicos de macromoléculas (ácidos nucleicos, proteínas, lipídios de membrana) é a base do mecanismo para a maioria das suas funções biológicas.

Níveis intracelulares de poliaminas são necessários para um ótimo crescimento e diferenciação celular (Tabor & Tabor, 1985, Pegg, 1988) e apoptose (Thomas & Thomas, 2001). Em concentrações fisiológicas elas regulam a replicação e estabilização do DNA e RNA (Igarashi & Kashiwagi, 2000), expressão gênica e síntese protéica (Celano et al., 1989), estabilizam membranas, modulam funções neurofisiológicas e podem agir como mensageiros intracelulares (Gugliucci, 2004). Estudos recentes mostram ainda que a espermina e a espermidina diminuem a lipoperoxidação induzida por alguns agentes pró-oxidantes (Bellé et al., 2004).

Porém, altas concentrações de poliaminas são tóxicas, pois facilitam a morte celular principalmente por mecanismos oxidativos (Morgan, 1998, Moinard et al., 2005). O possível papel das poliaminas como marcadores clínicos bioquímicos tem sido sugerido uma vez que foi reportada a presença de grandes quantidades de poliaminas na urina de pacientes com câncer (Russell, 1971). Assim, não é surpreendente o fato de suas concentrações estarem também aumentadas no encéfalo em casos de tumores cerebrais (Seiler, 1981). Além disso, têm-se mostrado elevados níveis de poliaminas em outras doenças envolvendo processos proliferativos ou outros processos patológicos, como também em pacientes com doença de Alzheimer (Seidl et al., 1996; Morrison & Kish, 1995; Teti et al., 2002). Isto sugere que o uso de análogos de poliaminas junto com inibidores da síntese de poliaminas, como inibidor da atividade da ornitina descarboxilase, representa uma estratégia terapêutica para o tratamento de tumores (Teti et al., 2002).

Acredita-se que as poliaminas por sua natureza policatiônica, especialmente espermina e espermidina, podem interagir com sítios aniônicos de macromoléculas, e regulem, entre outras funções fisiológicas, o fluxo de íons por canais iônicos no SNC (Tabor & Tabor, 1984; Johnson, 1996; Williams, 1997a, 1997b; Patocka & Kuehn, 2000; Urdiales et al., 2001), em particular, causam inibição de certos canais de potássio (envolvidos na manutenção do potencial de membrana) e modulação dos receptores glutamatérgicos do subtipo AMPA, cainato e NMDA (Williams, 1997a, 1997b; Pellegrini-Giampietro, 2003).

### 1.3.3 Poliaminas e Receptor NMDA

O principal foco de estudo das poliaminas se deve a sua interação com o receptor glutamatérgico do subtipo NMDA, ou ainda com os receptores glutamatérgicos do tipo AMPA e cainato (Williams et al., 1990, 1991; Scott et al., 1993; Williams, 1997a, 1997b; Pellegrini-Giampietro, 2003).

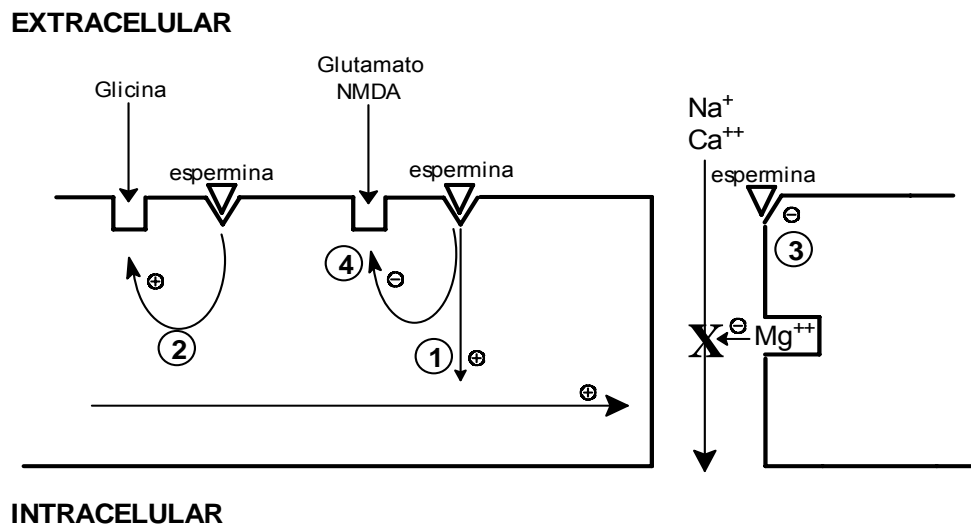
O efeito das poliaminas no receptor NMDA foi primeiro registrado por Ransom e Stec em 1988 que mostraram que a espermina e a spermidina aumentavam a afinidade do receptor NMDA pelo [<sup>3</sup>H]MK-801, na presença e na ausência de concentrações saturantes de glutamato e glicina. Foi então proposto que o efeito estimulatório das poliaminas deve-se a sua ligação no receptor NMDA (Ransom e Stec, 1988; Williams et al, 1991).

A curva dose-efeito da espermina mostrou ser bifásica. Em altas concentrações ela não potencializa a ligação do [<sup>3</sup>H]MK-801 enquanto que baixas concentrações de espermina aumentam a condutância do receptor NMDA, por aumentar a frequência de abertura do canal (Rock & MacDonald, 1995; Johnson, 1996; Williams, 1997a, 1997b).

Esta ação complexa das poliaminas sobre o receptor NMDA sugere que possa haver mais de um sítio de ligação de poliaminas associado a este receptor (Yoneda & Ogita, 1991; Johnson, 1996; Worthen et al., 2001). Estudos eletrofisiológicos com receptores recombinantes têm demonstrado que as poliaminas não agem diretamente nos receptores NMDA, mas agem potencializando ou inibindo as respostas mediadas pelo glutamato (Johnson, 1996).

As poliaminas podem apresentar efeito estimulatório e inibitório sobre o receptor NMDA (Figura 4). O efeito estimulatório das poliaminas pode ser dividido em estimulação glicina-independente, no qual as poliaminas aumentam as correntes induzidas por glutamato na presença de concentrações saturantes de glicina (sítio 1); e estimulação glicina-dependente, o qual as poliaminas aumentam a afinidade do receptor pela glicina (sítio 2). O efeito inibitório das poliaminas pode ser dividido em inibição dependente de voltagem, por diminuição da condutância do canal, como resultado de seu caráter catiônico na entrada do poro, ou por um bloqueio do canal aberto em um sítio dentro do poro como faz o magnésio (sítio 3); e inibição da afinidade do receptor pelo glutamato (sítio 4) (Johnson, 1996, Williams, 1997a).

Porém, os efeitos das poliaminas sobre o receptor NMDA pode variar conforme a expressão de diferentes combinações de subunidades do receptor (Williams et al., 1994; Johnson, 1996; Williams, 1997a).



**Figura 4** – Esquema de ações modulatórias da espermina sobre o receptor NMDA. + efeito estimulatório das poliaminas; – efeito inibitório das poliaminas. 1 – 4: sítios 1 – 4 (adaptado de Johnson, 1996).

### 1.3.4 Poliaminas, Receptor NMDA e Memória

Como as poliaminas estão envolvidas na modulação dos receptores NMDA e, existem níveis elevados de receptores NMDA e de poliaminas durante o desenvolvimento neonatal, sugere-se que elas poderiam modular o aprendizado e a memória (Johnson, 1996; Williams, 1997a).

Além disso, há estudos que corroboram essa associação entre as poliaminas na modulação da memória (Shimada et al., 1994; Khish et al., 1998a, 1998 b; Meyer et al., 1998; Rubin et al., 2000, 2001, 2004; Berlese et al., 2005; Guerra et al., 2006). Assim, altas doses de poliaminas (125-250 nmol), administradas por via intracerebroventricular, causam dano hipocampal, déficit de aprendizado e também potencializam a diminuição do aprendizado induzida por dizocilpina em ratos nas tarefas do labirinto aquático de Morris e do labirinto de 14 braços em T (Shimada et al., 1994; Conway, 1998). Estes dados apoiam outros estudos que têm demonstrado



que altos níveis de poliaminas cerebrais são neurotóxicas (Anderson et al., 1975; Halonen et al., 1993) e, conseqüentemente, reduzem a memória.

Por outro lado, a espermidina é capaz de atenuar o déficit de memória induzido por antagonistas NMDA (Kishi et al., 1998a; Meyer et al., 1998), bem como, por antagonistas muscarínicos e glutamatérgicos metabotrópicos (Kishi et al., 1998b). Mikolajczac e colaboradores (2002) também demonstraram que a espermidina administrada sistemicamente melhora a memória de curta duração na tarefa de memória social em ratos.

A administração intra-hipocampal e intra-amigdalár de baixas doses de espermidina (0,02-20 nmol) imediatamente após o treino, melhora a memória dos ratos na tarefa de esQUIVA inibitória (Rubin et al., 2000, 2001). Enquanto que a arcaína (antagonista do sítio das poliaminas no receptor NMDA) (Reynolds, 1990; Araneda et al., 1999) é capaz de reduzir a memória e reverter o efeito facilitatório causado pela espermidina nesta tarefa (Rubin et al., 2000, 2001). No entanto, esse efeito facilitatório de baixas doses de espermidina na memória da tarefa de esQUIVA inibitória é tempo-dependente, uma vez que a espermidina modula a aquisição e início da consolidação, não apresentando efeito sobre a consolidação tardia e evocação da memória (Berlese et al., 2005).

Além disso, a espermidina também modula a aquisição e consolidação da memória da tarefa de medo condicionado, uma vez que administrada via intra-amigdalár pré e pós-treino causa melhora da memória. Enquanto que, a arcaína prejudica a memória e previne o efeito facilitatório da espermidina sobre a memória desta tarefa (Rubin et al., 2004). Isto apóia as evidências que o efeito facilitatório da espermidina é devido à interação da espermidina no sítio das poliaminas no receptor NMDA. Este efeito facilitatório da SPD sobre a memória parece depender também da atividade da enzima óxido nítrico sintase hipocampal, uma vez que a administração intra-hipocampal de N<sup>G</sup> - Nitro -L-arginina metil éster (L-NAME) um inibidor não específico da enzima óxido nítrico sintase, imediatamente após o treino previne a melhora da memória causada por SPD na tarefa de esQUIVA inibitória. Isto também envolve a produção de óxido nítrico, pois a injeção de L-NAME preveniu o aumento de níveis de nitrato e nitrito induzidos pela espermidina (Guerra et al., 2006).

Assim, certos estudos estão sendo feitos para o desenvolvimento de novas drogas que agissem na melhora da memória e estas seriam boas escolhas como

agentes terapêuticos no tratamento de déficits de memória associados à doença de Alzheimer entre outras. Em outras situações, como no stress pós-traumático, drogas que prejudicassem a consolidação da memória teriam bom emprego.

Contudo, não há na literatura, estudos sobre os efeitos da administração sistêmica de espermidina e arcaína no aprendizado e memória e se esses efeitos são devido a dependência de estado, pois estas drogas poderiam modular a memória de uma maneira dependente do estado farmacológico criado pela sua administração em vez da influência da droga no processo de formação da memória.

---



## 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da administração sistêmica de espermidina e arcaína sobre a memória da tarefa de esquiva inibitória em ratos envolvendo dependência de estado.

## 2.2 Objetivos Específicos

- Verificar o efeito da administração sistêmica após o treino de espermidina sobre a consolidação da memória da tarefa da esquiva inibitória em ratos;
- Verificar o efeito da administração sistêmica após o treino de arcaína sobre a consolidação da memória na tarefa da esquiva inibitória em ratos;
- Verificar se a administração de espermidina causa dependência de estado na tarefa de esquiva inibitória;
- Verificar se a administração sistêmica de arcaína causa dependência de estado na tarefa de esquiva inibitória;
- Verificar se a administração sistêmica de arcaína causa dependência de estado cruzada com MK-801.
- Verificar se algum dos diferentes tratamentos altera a atividade locomotora ou exploratória dos animais no teste do campo aberto.



### 3.1 Animais

Foram usados um total de 323 ratos Wistar machos adultos (200-250 g), fornecidos pelo biotério central da Universidade Federal de Santa Maria. Os animais foram colocados cinco em cada caixa e mantidos em ciclo claro-escuro natural, temperatura constante de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , com alimento e água *ad libitum*. Os procedimentos comportamentais foram executados entre 9:00 e 16:00h. Os ratos foram mantidos e utilizados de acordo com as normas do Comitê de Bioética da Universidade Federal de Santa Maria (Processo 0206).

### 3.2 Drogas

Sulfato de 1,4-diguanidinobutano (Arcaína), trihidrocloreto de N-[3-aminopropil]-1,4-butanodiamina (Espermidina) e MK-801 (dizolcipina) foram obtidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, E.U.A.). Todas as soluções de drogas foram preparadas diariamente com PBS 100 nmol (tampão fosfato em salina, pH 7,4) como veículo. As drogas foram administradas intraperitonealmente (i.p.) em um volume de 1 ml/kg de peso corporal. A seleção das doses foi feita com base em estudos piloto.

### 3.3 Testes comportamentais

#### 3.3.1 Esquiva inibitória

Os animais foram submetidos a uma única sessão de treino em um aparelho de esquiva inibitória, e foram testados 24 horas depois. O aparelho consiste de uma caixa de 30 X 25 X 25 cm com o assoalho formado por barras de metal (3 mm diâmetro, 1 cm de distância entre elas) que conduzem a corrente elétrica, a caixa possuía uma plataforma de madeira no lado esquerdo (7 X 25 X 2,5 cm) que isolava o animal das grades. Durante a sessão de treino, os animais foram colocados gentilmente sobre a plataforma com a face voltada para o canto esquerdo da caixa e imediatamente após o rato descer da plataforma e colocar as quatro patas sobre as grades, recebia um choque elétrico de 0,4 mA durante 3 segundos. Imediatamente

depois, eles retornavam à caixa de criação e ao biotério. A medida da retenção da memória foi avaliada em uma sessão de teste feita 24 h depois do treino. Na sessão de teste, os animais eram recolocados na plataforma do aparelho em que foram treinados e era medida a latência de descida (em segundos) como um indicador de retenção de memória. Um tempo limite (teto) estabelecido para o teste foi de 300 ou 600 segundos. A caixa de esquiva inibitória foi limpa com álcool etílico a 30% antes e depois de cada rato ocupá-la.

### **3.3.2 Teste do Campo aberto**

Imediatamente depois da sessão de teste da tarefa de esquiva inibitória, os animais foram transferidos para um campo aberto para analisar a atividade locomotora e exploratória. Os animais foram colocados em um campo aberto circular (56 cm de diâmetro X 40 cm de altura), com seu assoalho dividido em 11 áreas iguais. Um observador, que não sabia qual tratamento farmacológico foi utilizado, registrou o número de cruzamentos e respostas de levantar manualmente por 5 minutos. Este teste foi feito para identificar inaptidões motoras que poderiam influenciar o desempenho dos animais na tarefa de esquiva inibitória.

## **3.4 Experimentos**

### **3.4.1 Experimento 1: Efeito da SPD e ARC sobre a consolidação da memória: Curva dose-efeito.**

Imediatamente após o treino, os animais receberam a administração intraperitoneal de veículo (PBS, pH 7,4) ou espermidina (1, 10, 50, 100 mg/kg) ou arcaína (1, 10, 30 mg/kg). A sessão de teste foi feita 24 h depois do treino e a latência de descida foi obtida. O tempo limite estabelecido para o teste foi de 300 (curva dose-efeito arcaína) ou 600 (curva dose-efeito espermidina) segundos. Imediatamente depois do teste da esquiva inibitória, os animais foram submetidos ao teste de campo aberto como descrito previamente.

### **3.4.2 Experimento 2: Avaliação da possível dependência de estado causada pela SPD sobre a memória.**

Os animais receberam veículo (PBS, pH 7,4) ou espermidina (50 mg/kg) imediatamente após o treino e 15 minutos antes da sessão de teste. Assim, os animais foram divididos em quatro grupos: 1 - veículo após o treino e antes da sessão de teste (PBS/PBS), 2 - veículo após o treino e espermidina antes da sessão de teste (PBS/SPD), 3 - espermidina após o treino e veículo antes da sessão de teste (SPD/PBS) e 4 - espermidina após o treino e antes da sessão de teste (SPD/SPD). O tempo limite estabelecido para o teste foi de 600 segundos. Imediatamente depois do teste da esQUIVA inibitória, os animais foram submetidos ao teste de campo aberto como descrito previamente.

### **3.4.3 Experimento 3: Avaliação da possível dependência de estado causada pela ARC sobre a memória.**

Os animais receberam veículo (PBS, pH 7,4) ou arcaína (30 mg/kg) imediatamente após o treino e 15 minutos antes da sessão de teste. Assim, os animais foram divididos em quatro grupos: 1 - veículo após o treino e antes da sessão de teste (PBS/PBS), 2 - veículo após o treino e arcaína antes da sessão de teste (PBS/ARC), 3 - arcaína após o treino e veículo antes da sessão de teste (ARC/PBS) e 4 - arcaína após o treino e antes da sessão de teste (ARC/ARC). O tempo limite estabelecido para o teste foi de 300 segundos. Imediatamente depois do teste da esQUIVA inibitória, os animais foram submetidos ao teste de campo aberto como descrito previamente.

### **3.4.4 Experimento 4: Avaliação da possível dependência de estado cruzada causada pela ARC e MK-801 sobre a memória.**

Para investigar o mecanismo pelo qual a arcaína induziu dependência de estado, nós fizemos um protocolo de dependência de estado cruzada usando arcaína e MK-801, um antagonista não-competitivo do receptor NMDA. Os animais



receberam veículo (PBS, pH 7,4), arcaína (30 mg/kg) ou MK-801 (0,03 mg/kg) imediatamente após o treino e 15 minutos (arcaína) ou 30 minutos (MK-801) antes da sessão de teste. Os animais foram divididos em sete grupos: 1 - veículo após o treino e antes da sessão de teste (PBS/PBS), 2 - arcaína após o treino e veículo antes da sessão de teste (ARC/PBS), 3 - arcaína após o treino e antes da sessão de teste (ARC/ARC), 4 - MK-801 após o treino e veículo antes da sessão de teste (MK/PBS), 5 - MK-801 após o treino e antes da sessão de teste (MK/MK), 6 - arcaína após o treino e MK-801 antes da sessão de teste (ARC/MK), 7 - MK-801 após o treino e arcaína antes da sessão de teste (MK/ARC). O tempo limite estabelecido para o teste foi de 300 segundos. Imediatamente depois do teste da esQUIVA inibitória, os animais foram submetidos ao teste de campo aberto como descrito previamente.

#### **3.4.5 Análise estatística**

A análise estatística dos dados da latência de descida da plataforma no dia do teste foi feita por análise de variância (ANOVA) não-paramétrica de uma (Kruskal-Wallis) ou duas vias (Teste de Scheirer-Ray-Hare) dependendo do desenho experimental. A análise *post hoc* dos dados foi feita pelo teste não-paramétrico de comparações múltiplas Dunn (tipo-Tukey).

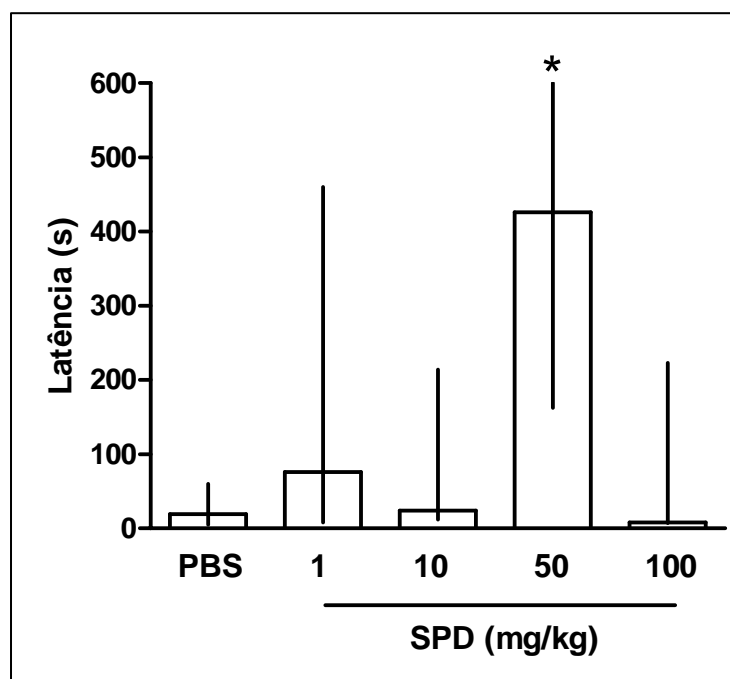
Os números de cruzamentos e respostas de levantar obtidos no teste do campo aberto foram analisados por análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias.

Em todas as avaliações,  $p < 0,05$  foi usado como critério de significância estatística.



#### 4.1 Experimento 1: Efeito da SPD e ARC sobre a consolidação da memória: Curva dose-efeito.

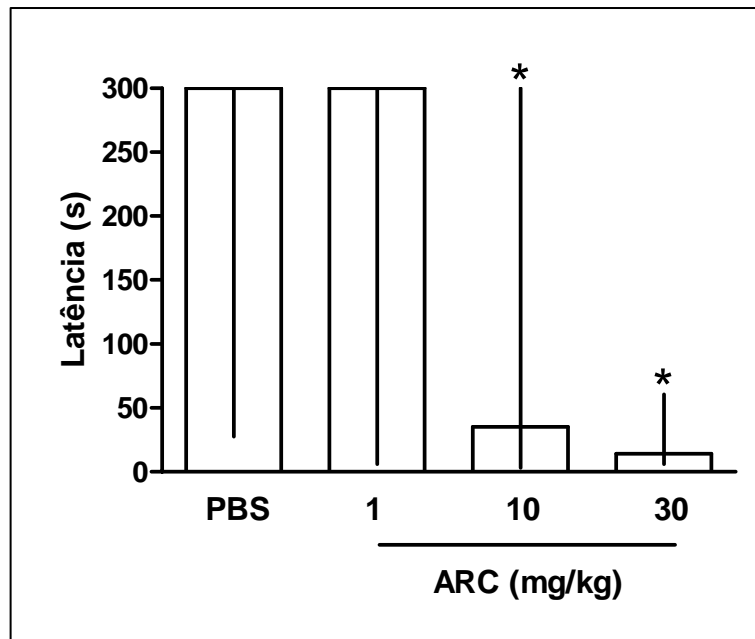
A figura 5 mostra o efeito da administração imediatamente pós-treino de espermidina (1, 10, 50 e 100 mg/kg) sobre a latência de descida da plataforma na sessão de teste na tarefa de esquivas inibitória. A análise estatística (teste de Kruskal-Wallis) revelou que existe diferença significativa entre os grupos ( $H(4)=12,24$ ;  $p<0,05$ ). A análise *post hoc* mostrou que a administração de espermidina (50 mg/kg) aumentou a latência de descida da plataforma dos animais na sessão de teste quando comparado com o controle. As outras doses de espermidina testadas, não tiveram efeito sobre a latência de descida da plataforma dos animais no dia do teste.



**Figura 5** – Efeito da administração imediatamente após o treino de espermidina (1, 10, 50 e 100 mg/kg, i.p.) sobre a latência de descida dos ratos da plataforma na sessão de teste na tarefa de esquivas inibitória. Os dados são mostrados como mediana  $\pm$  intervalo interquartil.  $n=12-15$  para cada grupo. SPD (espermidina). \*Indica diferença significativa ( $p<0,05$ ) comparado com o grupo controle.

A figura 6 mostra o efeito da administração imediatamente pós-treino de arcaína (1, 10 e 30 mg/kg) sobre a latência de descida da plataforma na sessão de teste na tarefa de esquivas inibitória. A análise estatística (teste de Kruskal-Wallis) revelou que existe diferença significativa entre os grupos ( $H(3)=8,35$ ;  $p < 0,05$ ). A

análise *post hoc* mostrou que a administração de arcaína (10 e 30 mg/kg) prejudicou a performance dos animais na tarefa de esquiva inibitória.



**Figura 6** – Efeito da administração imediatamente após o treino de arcaína (1, 10 e 30 mg/kg, i.p.) sobre a latência de descida dos ratos da plataforma na sessão de teste na tarefa de esquiva inibitória. Os dados são mostrados como mediana  $\pm$  intervalo interquartil.  $n=14$  para cada grupo. ARCAÍNA (arcaína) \*Indica diferença significativa ( $p<0,05$ ) comparado com o grupo controle.

Uma preocupação importante em tarefas motivadas pelo choque, particularmente naquelas em que se investiga o efeito de drogas na sua aquisição ou consolidação, é se o tratamento farmacológico afeta aspectos motivacionais do aprendizado, como atividade locomotora e exploratória dos animais. No estudo presente nós avaliamos o comportamento locomotor e exploratório dos animais imediatamente depois da sessão de teste da tarefa de esquiva inibitória para identificar qualquer inaptidão motora que poderia influenciar o desempenho dos animais nesta tarefa. A análise estatística dos dados do teste do campo aberto (ANOVA de uma via) revelou que a administração de espermidina (1, 10, 50 e 100 mg/kg) e arcaína (1, 10 e 30 mg/kg) não alteraram o número de cruzamentos e nem o número de respostas de levantar dos animais (Tabela 1, veja valores de  $F$  mostrado na tabela).

**Tabela 1** – Efeito da administração imediatamente após o treino de espermidina (1, 10, 50 e 100 mg/kg, i.p.) ou arcaína (1, 10 e 30 mg/kg, i.p.) sobre o comportamento dos ratos no teste do campo aberto.

<b>Grupo</b>	<b>Cruzamento</b>	<b>Levantar</b>	<b>n</b>
Controle (PBS)	19,46 ± 3,15	8,26 ± 1,90	15
SPD (1 mg/kg)	20,06 ± 3,34	8,20 ± 1,66	15
SPD (10 mg/kg)	16,20 ± 2,85	8,86 ± 1,87	15
SPD (50 mg/kg)	16,41 ± 2,60	4,75 ± 0,90	12
SPD (100 mg/kg)	19,46 ± 3,15	9,13 ± 2,05	15
<b>Análise Estatística</b>	$F_{(4,67)}=0,358; p>0,05$	$F_{(4,67)}=0,866; p>0,05$	
Controle (PBS)	17,35 ± 2,86	6,14 ± 1,11	14
ARC (1 mg/kg)	24,21 ± 4,51	6,71 ± 1,16	14
ARC (10 mg/kg)	22,28 ± 4,27	9,00 ± 1,69	14
ARC (30mg/kg)	28,64 ± 3,12	9,50 ± 1,53	14
<b>Análise Estatística</b>	$F_{(3,52)}=1,53; p>0,05$	$F_{(3,52)}=1,40; p>0,05$	

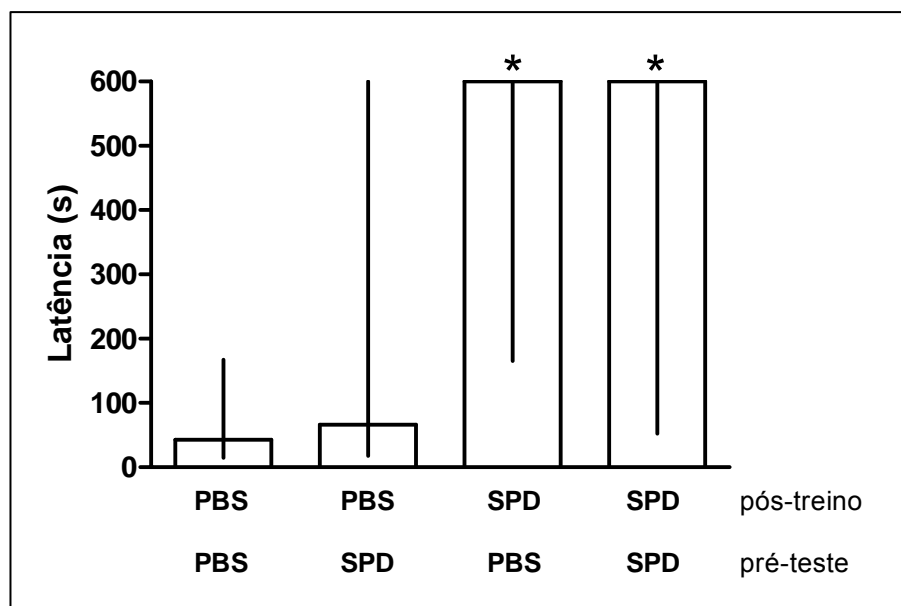
SPD=espermidina; ARC=arcaína

Os dados são mostrados como média ± erro padrão, *n* = número de animais em cada grupo.

#### 4.2 Experimento 2: Avaliação da possível dependência de estado causada pela SPD sobre a memória.

A figura 7 mostra o efeito da administração de espermidina (50 mg/kg) ou veículo (PBS) imediatamente após o treino e 15 minutos pré-teste na latência de descida da plataforma na sessão de teste na tarefa de esquivar inibitória. A análise estatística (teste de Scheirer-Ray-Hare) revelou que existe um efeito significativo da injeção após o treino da SPD ( $H=10,5; p<0,05$ ), uma vez que a administração de espermidina imediatamente após o treino aumentou a latência de descida da plataforma dos animais no dia do teste. A administração de uma segunda dose de espermidina 15 minutos pré-teste não modificou o aumento da latência induzida pela administração de SPD após o treino.

Análise estatística dos dados do teste do campo aberto (ANOVA de duas vias) revelou que os tratamentos utilizados não alteraram o número de cruzamentos e nem o número de respostas de levantar dos animais (Tabela 2, veja valores de *F* na tabela).



**Figura 7** – Efeito da administração de espermidina (50 mg/kg, i.p.) ou veículo (PBS, i.p.) imediatamente após o treino e 15 minutos pré-teste sobre a latência de descida dos ratos da plataforma na sessão de teste na tarefa de esquiva inibitória. Os dados são mostrados como mediana  $\pm$  intervalo interquartil.  $n=12$  para cada grupo. SPD (espermidina). \*Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) comparado com o grupo controle (PBS/PBS).

**Tabela 2** – Efeito da administração de espermidina (50 mg/kg, i.p.) ou veículo (PBS, i.p.) imediatamente após o treino e 15 minutos pré-teste sobre o comportamento dos ratos no teste do campo aberto.

Grupo	Cruzamento	Levantar	<i>n</i>
PBS/PBS	19,75 $\pm$ 2,47	7,91 $\pm$ 1,54	12
PBS/SPD	13,50 $\pm$ 2,24	5,75 $\pm$ 1,23	12
SPD/PBS	13,25 $\pm$ 2,93	6,91 $\pm$ 1,19	12
SPD/SPD	16,83 $\pm$ 4,39	6,16 $\pm$ 1,75	12
Análise Estatística	$F_{(1,44)}=2,478$ ; $p > 0,05$	$F_{(1,44)}=0,238$ ; $p > 0,05$	

PBS= Controle; SPD=espermidina

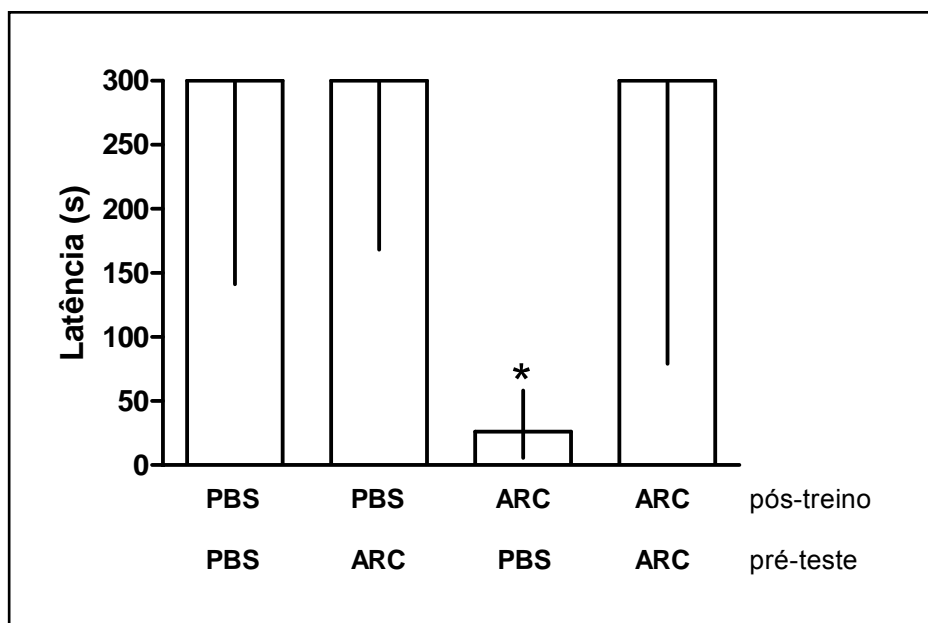
Os dados são mostrados como média  $\pm$  erro padrão,  $n$  = número de animais em cada grupo.

### 4.3 Experimento 3: Avaliação da possível dependência de estado causada pela ARC sobre a memória.

A figura 8 mostra o efeito da administração de arcaína (30mg/kg) ou veículo (PBS) imediatamente após o treino e 15 minutos pré-teste na latência de descida da plataforma na sessão de teste na tarefa de esquiva inibitória. Análise estatística (teste de Scheirer-Ray-Hare) revelou que existe uma interação significativa entre a administração após o treino (PBS ou ARC) e a administração pré-teste (PBS ou

ARC) ( $H=4,4$ ;  $p<0,05$ ), uma vez que a administração de arcaína pré-teste reverteu o efeito amnésico induzido pela administração de arcaína após o treino.

A análise estatística dos dados do teste do campo aberto (ANOVA de duas vias) revelou que os tratamentos utilizados não afetaram o número de cruzamentos e nem o número de respostas de levantar dos animais (Tabela 3, veja valores de  $F$  na tabela).



**Figura 8** – Efeito da administração de arcaína (30 mg/kg, i.p.) ou veículo (PBS, i.p.) imediatamente após o treino e 15 minutos pré-teste sobre a latência de descida dos ratos da plataforma na sessão de teste na tarefa de esquila inibitória. Os dados são mostrados como mediana  $\pm$  intervalo interquartil.  $n=12$  para cada grupo. ARC (arcaína). \*Indica diferença significativa ( $p<0,05$ ) comparado com o grupo controle (PBS/PBS).

**Tabela 3** – Efeito da administração de arcaína (30 mg/kg, i.p.) ou veículo (PBS, i.p.) imediatamente após o treino e 15 minutos pré-teste sobre o comportamento dos ratos no teste do campo aberto.

Grupo	Cruzamento	Levantar	$n$
PBS/PBS	19,66 $\pm$ 3,30	10,83 $\pm$ 2,93	12
PBS/ARC	19,00 $\pm$ 4,59	7,00 $\pm$ 2,34	12
ARC/PBS	20,91 $\pm$ 3,09	8,16 $\pm$ 1,57	12
ARC/ARC	18,66 $\pm$ 3,93	5,16 $\pm$ 1,86	12
Análise Estatística	$F_{(1,44)}=0,038$ ; $p>0,05$	$F_{(1,44)}=0,0349$ ; $p>0,05$	

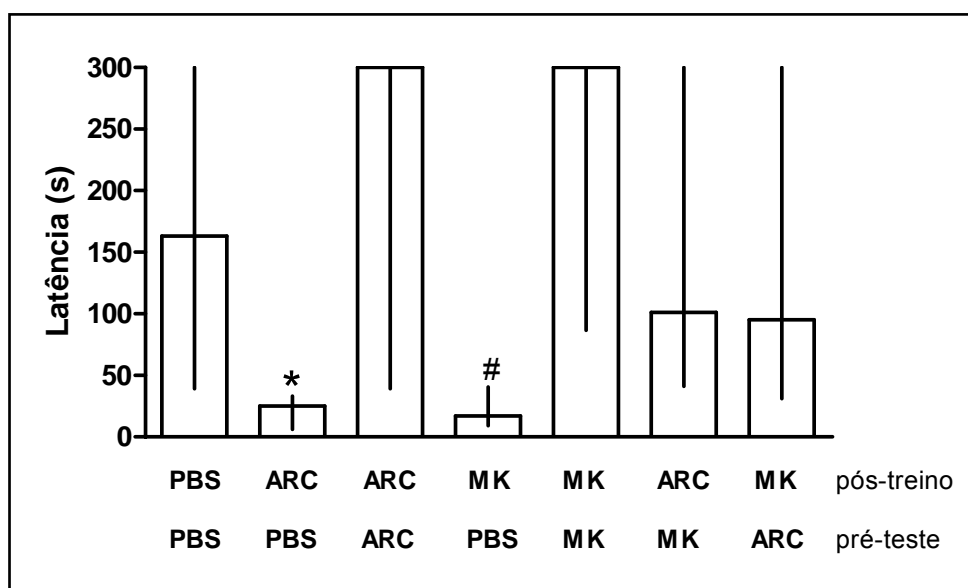
PBS=Controle; ARC=arcaína

Os dados são mostrados como média  $\pm$  erro padrão,  $n$  = número de animais em cada grupo.

#### 4.4 Experimento 4: Avaliação da possível dependência de estado cruzada causada pela ARC e MK-801 sobre a memória.

A figura 9 mostra o efeito da administração de arcaína (30 mg/kg), veículo (PBS) ou MK-801 (0,03 mg/kg) imediatamente após o treino e 15 minutos (arcaína) ou 30 minutos (MK-801) pré-teste na latência de descida dos ratos da plataforma na sessão de teste na tarefa de esquiva inibitória. A análise estatística (Teste de Kruskal-Wallis) revelou um efeito significativo dos tratamentos ( $H=36,918$ ;  $p < 0,05$ ). A análise de comparações múltiplas (teste de Dunn) mostrou que os grupos ARC/PBS e MK/PBS apresentaram latências de descida da plataforma reduzidas na sessão de teste. Os resultados mostram que a arcaína e MK-801 pioraram a consolidação da memória e que estes dois compostos provocaram dependência de estado. Além disso, a administração de MK-801 30 minutos pré-teste reverteu a piora da memória induzida pela injeção pós-treino de arcaína. Da mesma forma, a administração de arcaína 15 minutos pré-teste reverteu a piora da memória induzida pela injeção pós-treino de MK-801, caracterizando o fenômeno de dependência de estado cruzada entre arcaína e MK-801.

A análise estatística dos dados do teste de campo aberto (ANOVA de duas vias) revelou que os tratamentos utilizados não afetaram o número de cruzamentos e nem o número de respostas de levantar (Tabela 4, veja valores de  $F$  na tabela).



**Figura 9.** Efeito da administração de arcaína (30 mg/kg, i.p.), MK-801 (0,03 mg/kg, i.p.) ou veículo (PBS, i.p.) imediatamente após o treino e 15 minutos (ARC) ou 30 minutos (MK) pré-teste sobre a latência de descida dos ratos da plataforma na sessão de teste na tarefa de esquiva inibitória. Os dados são mostrados como mediana  $\pm$  intervalo interquartil.  $n=14-17$  para cada grupo. ARC



(arcaína), MK (MK-801). \*Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ), #Indica diferença significativa ( $p < 0,001$ ) comparado com o grupo controle (PBS/PBS).

**Tabela 4** – Efeito da administração de arcaína (30 mg/kg, i.p.), MK-801 (0,03 mg/kg, i.p.) ou veículo (PBS, i.p.) imediatamente após o treino e 15 minutos (ARC) ou 30 minutos (MK) pré-teste sobre o comportamento dos ratos no teste do campo aberto.

<b>Grupo</b>	<b>Cruzamento</b>	<b>Levantar</b>	<b>n</b>
PBS/PBS	21,17 ± 2,83	11,88 ± 2,09	17
ARC/PBS	24,26 ± 1,25	12,06 ± 1,70	15
ARC/ARC	23,52 ± 2,56	10,94 ± 1,68	17
MK/PBS	25,42 ± 2,58	13,92 ± 1,35	14
MK/MK	25,76 ± 3,62	10,64 ± 2,02	17
ARC/MK	27,64 ± 3,32	16,47 ± 2,30	17
MK/ARC	29,06 ± 3,75	13,76 ± 2,14	17
<b>Análise Estatística</b>	$F_{(2,107)}=0,737; p>0,05$	$F_{(2,107)}=2,990 p>0,05$	

PBS=Controle; ARC=arcaína; MK=MK-801

Os dados são mostrados como média ± erro padrão,  $n$  = número de animais em cada grupo.



No presente estudo, nós investigamos os efeitos da administração sistêmica de espermidina e de arcaína sobre a memória da tarefa de esquiva inibitória e se estes efeitos são devidos à dependência de estado.

Nós mostramos que a injeção intraperitoneal de espermidina, um agonista do sítio de ligação das poliaminas no receptor NMDA, modula o início da consolidação uma vez que sua administração imediatamente pós-treino (50 mg/kg) melhorou o desempenho de ratos na tarefa de esquiva inibitória (Figura 5). Por outro lado, a administração imediatamente pós-treino de arcaína (10 e 30 mg/kg, i.p.), antagonista do sítio das poliaminas no receptor NMDA (Reynolds, 1990), prejudicou o desempenho dos ratos nesta tarefa (Figura 6). O efeito facilitatório sobre a memória induzido pela espermidina foi bifásico. Isto está de acordo com trabalhos que mostram que a administração intra-hipocampal de espermidina imediatamente após o treino melhora a memória da tarefa de esquiva inibitória de maneira bifásica (Rubin et al., 2000; Berlese et al., 2005).

Além disso, os resultados do presente estudo sugerem que o efeito facilitatório sobre a memória induzido pela administração de espermidina imediatamente após o treino não é causado por dependência de estado. Todavia, o prejuízo da memória causado pela administração de arcaína (30 mg/kg) imediatamente após o treino foi revertido pela administração da mesma droga 15 minutos antes do teste, indicando que esse efeito é causado por dependência de estado. Além disso, ocorreu dependência de estado cruzada entre arcaína e MK-801. Nenhum dos tratamentos afetou o número de cruzamentos ou respostas de levantar no campo aberto subsequente a sessão de teste (Tabelas 1, 2, 3 e 4) sugerindo que os tratamentos não alteraram as atividades locomotora e exploratória dos animais.

A dependência de estado é usada para referir respostas comportamentais aprendidas enquanto os animais estiverem sob a influência de uma droga agindo no momento do treino, e estes animais executam depois mais eficazmente a tarefa aprendida só quando o mesmo contexto sensorio e estado fisiológico (condição de droga) é restabelecido (Overton, 1974; Arkhipov, 1999; Shulz et al.; 2000, Arenas et al., 2006). Geralmente a dependência de estado é estudada usando um modelo experimental que diferencia aprendizado dependente de estado de outros efeitos (melhora ou prejuízo) no aprendizado e na memória. Este modelo estabelece que

quatro grupos de animais são treinados e subseqüentemente testados para retenção com condições diferentes das drogas administradas depois do treino (por exemplo, veículo após o treino e droga antes do teste ou droga após o treino e veículo antes do teste) ou em condições inalteradas (veículo após o treino e antes do teste ou droga após o treino e antes do teste) (Arenas et al., 2006). No caso da esQUIVA inibitória, o déficit de memória é caracterizado quando os grupos que receberam drogas imediatamente pós-treino têm latências diminuídas na sessão de teste independente do tratamento pré-teste, enquanto que uma melhora da memória é caracterizada quando a droga provoca um aumento da latência do teste em qualquer situação (Arenas et al., 2006). No caso de uma droga causar dependência de estado, o prejuízo ou melhora da memória induzido pela sua administração após o treino pode ser revertido pela administração da mesma droga antes do teste.

Os resultados obtidos com administração sistêmica logo após o treino de espermidina e arcaína são similares aos resultados encontrados com a administração intra-estrutura-cerebral. Estes estudos demonstram que administração intra-hipocampal ou intra-amígdala de espermidina causa melhora de memória nas tarefas de esQUIVA inibitória (Rubin et al., 2000, 2001; Berlese et al., 2005; Guerra et al., 2006) e medo condicionado (Rubin et al., 2004). Esse efeito facilitatório sobre a memória induzida pela espermidina na tarefa de esQUIVA inibitória é restrito às fases de aquisição e início da consolidação da memória (Berlese et al., 2005) e arcaína prejudica a memória e previne o efeito facilitatório da memória induzido pela espermidina nesta tarefa (Rubin et al., 2000, 2001, 2004).

Além disso, a espermidina é capaz de atenuar o déficit de memória induzido por antagonistas NMDA (Kishi et al., 1998a; Meyer et al., 1998), bem como, por antagonistas muscarínicos e glutamatérgicos metabotrópicos (Kishi et al., 1998b). Mikolajczac e colaboradores (2002) também demonstraram que a espermidina administrada sistemicamente melhora a memória de curta duração na tarefa de memória social em ratos.

No entanto, sob algumas condições, a modulação da memória, com a administração de drogas imediatamente após o treino, pode ser resultado de uma dependência de estado em vez da influência de um tratamento farmacológico específico nos processos de armazenamento de memória (Izquierdo, 1984, 1986). Assim, nenhum estudo foi feito até agora para investigar se os efeitos da

espermidina e arcaína sobre a memória seriam causados por dependência de estado.

Os resultados do presente estudo mostraram que o prejuízo na fase de consolidação da memória induzido pela injeção imediatamente após o treino de arcaína pode ser revertido por uma segunda administração da mesma droga 15 minutos antes do teste (Figura 8). Assim, aqueles animais treinados sob influência de arcaína após o treino não conseguiram evocar a memória numa situação sem o efeito da droga ou depois da administração de veículo. Isto sugere um aprendizado dependente do estado. Os resultados também mostraram que uma única administração intraperitoneal de MK-801 (0,03 mg/kg), imediatamente pós-treino, prejudicou a consolidação de memória na tarefa de esquiva inibitória e este prejuízo foi revertido por outra administração da mesma dose de MK-801 30 minutos antes do teste, indicando também que MK-801 causa dependência de estado. Estes achados confirmam trabalhos anteriores, que mostram que este antagonista não-competitivo do receptor NMDA, prejudica a memória durante a retenção da tarefa de esquiva passiva de maneira dependente de estado (Harrod et al, 2001).

De forma interessante, a administração pré-teste de MK-801 reverteu o prejuízo da memória causado pela administração pós-treino de arcaína e da mesma maneira, a administração pré-teste de arcaína reverteu o prejuízo da memória causado por MK-801 pós-treino. Isto sugere uma dependência de estado cruzada entre arcaína e MK-801 e que estas drogas tenham mecanismos semelhantes, ou seja, o estado endógeno induzido pela administração pós-treino por uma destas drogas (arcaína) pode ser semelhante ao estado endógeno induzido pela outra droga (MK-801) ou vice-versa. Isso sugere que, mesmo o receptor NMDA estando bloqueado, ocorreu a formação da memória, porém os animais não conseguiam evocá-la, e essa evocação foi facilitada pela segunda administração de arcaína e de MK-801.

Esses achados concordam com as afirmativas de que os receptores NMDA têm papel importante no processo de consolidação da memória (Riedel et al., 2003). O prejuízo da memória causado pelo bloqueio dos receptores NMDA por antagonistas como MK-801, PCP, quetamina e CPP são devidos à dependência de estado (Jackson et al., 1992, Harrod et al., 2001). E ainda, outros estudos revelam

o envolvimento do receptor NMDA na dependência de estado induzida pela morfina (Jafari-Sabet et al., 2005).

O mecanismo pelo qual essa dependência de estado se desenvolve não é bem conhecido, porém, uma segunda administração da mesma droga na hora da sessão de teste, poderia estar servindo como dica na hora da evocação da memória, indicando que houve a formação da memória, porém a evocação deste aprendizado fica inacessível no momento do teste se a droga não for administrada novamente (Izquierdo, 1984). Existem teorias para explicar a dependência de estado: uma delas é baseada no estímulo, ela sugere que a droga altera o estímulo do contexto no qual o aprendizado ocorreu sendo incorporado como parte do aprendizado. Considerando que o estímulo do contexto é diferente no estado em que o animal não recebe a droga na hora do teste, a evocação é menos eficiente. A outra teoria seria que as drogas induzem mudanças neurológicas que não ficam acessíveis na hora do teste sem a administração da droga, produzindo assim dependência de estado (Overton, 1974; Sripada et al, 2001).

No entanto, uma única administração intraperitoneal de espermidina (50 mg/kg) imediatamente após o treino causou melhora da memória e a administração da mesma dose de espermidina 15 minutos antes do teste não afetou a retenção da memória de ratos. Resultados prévios de nosso grupo demonstraram que o efeito facilitatório da espermidina sob a memória é tempo-dependente e são restritos à aquisição (injeção 30 minutos antes do treino) e início da consolidação (imediatamente depois do treino) enquanto que a consolidação tardia (6 h depois do treino) e evocação (10 minutos antes do teste) não são afetadas pela espermidina (Berlese et al., 2005). Os efeitos de melhora da memória da espermidina não são dependentes de estado.

De acordo com McGaugh (1992), para uma droga que melhora a memória, a interpretação de uma dependência de estado seria que o estado que normalmente estaria ocorrendo na hora do teste é similar àquele induzido por drogas após o treino. Se isso for verdade, administração da mesma droga antes do teste deveria diminuir a similaridade dos dois estados e então, deveria pelo menos, atenuar a melhora da memória. Adicionalmente, nosso resultado considerado com outros estudos, sugere que drogas com efeitos facilitatórios sobre a memória não causam dependência de estado e indica que elas interagem diretamente no armazenamento da memória uma vez que a administração imediatamente pós-

treino de glicose (Kopf et al., 1993), fisostigmina ou oxotremorina (Baratti & Kopf, 1996) aumentam a retenção da memória sem causar dependência de estado.

Em resumo, no presente estudo nós descrevemos os efeitos da espermidina e arcaína na memória da tarefa de esquiva inibitória envolvendo dependência de estado. O efeito facilitatório da administração após o treino de espermidina sobre a memória foi claramente uma influência do tratamento farmacológico no processo de armazenamento de memória em vez de uma aprendizagem dependente de estado. Entretanto, o prejuízo da memória induzido pela arcaína é devido a uma dependência de estado e este efeito é mantido pela administração de MK-801, sugerindo que esta dependência de estado poderia estar envolvendo o receptor NMDA.





Com base nos resultados obtidos, conclui-se que:

- A administração sistêmica de espermidina imediatamente após o treino melhorou de uma maneira bifásica a consolidação da memória dos animais na tarefa de esquiva inibitória.
  - A administração sistêmica de arcaína imediatamente após o treino prejudicou a consolidação da memória dos animais na tarefa de esquiva inibitória.
  - A administração sistêmica de espermidina não causou dependência de estado nos animais no teste de esquiva inibitória.
  - A administração sistêmica de arcaína causou dependência de estado nos animais no teste de esquiva inibitória.
  - A administração sistêmica de arcaína causou dependência de estado cruzada com o MK-801 nos animais no teste de esquiva inibitória.
  - Nenhum dos tratamentos utilizados alterou as atividades locomotora e exploratória dos animais no teste do campo aberto.
-



ABEL, T.; LATTAL, M. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 11, n. 2, p. 180–187, 2001.

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

ARANEDA, R. C.; LAN, J. Y.; ZHENG, X.; ZUKIN, S.; BENNETT, M. V.L. Spermidine and arcaïne block and permeate N-Methyl-D-Aspartate receptors channels. **Biophysical Journal**, v. 76, n. 6, p. 2899–2911, 1999.

ARENAS, M. C.; VINADER-CAEROLS, C.; MONLEÓN, S.; MARTOS, A. J.; EVERSS, E.; FERRER-AÑÓ, A.; PARRA, A. Are the effects of the antidepressants amitriptyline, maprotiline, and fluoxetine on inhibitory avoidance state-dependent? **Behavioural Brain Research**, v. 166, n.1, p. 150–158, 2006.

ARKHIPOV, V. I. Memory dissociation: the approach to the study of retrieval processes. **Behavioural Brain Research**, v. 106, n. 1-2, p. 39–46, 1999.

ASHBY, F.G.; O'BRIEN, J.B. Category learning and multiple memory systems. **Trends in cognitive sciences**, v. 9, n. 2, p. 83–89, 2005.

BARATTI, C. M.; KOPF, S. R. The post-training memory enhancement induced by physostigmine and oxotremorine in mice is not state-dependent. **Neurobiology of learning and memory**, v. 65, p. 121–124, 1996.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociência**: desvendando o sistema nervoso. 2ª 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 Research**, v. 1008, n. 2, 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. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 83, n. 1, p. 48–53, 2005.

BLISS, T. V. P.; COLLINGRIDGE, G. L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, v. 361, n. 6407, p. 31–39, 1993.

CAHILL, L.; MCGAUGH, J. L. Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory. **Trends in Neurosciences**, v. 21, n. 7, p. 294–299, 1998.

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

CASERO, R. A.; PEGG, A. E. Spermidine/spermine N1-acetyltransferase--the turning point in polyamine metabolism. **The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 7, n. 8, p. 653–661, 1993.

CELANO, P.; BAYLIN, S. B.; CASERO JR., R. A. Polyamines differentially modulate the transcription of growth-associated genes in human colon carcinoma cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 15, p. 8922–8927, 1989.

CONWAY, E. C. Brain lesions and delayed water maze learning deficits after intracerebroventricular spermine. **Brain Research**, v. 800, n. 1, p. 10–20, 1998.

DALMAZ, C.; NETTO, C. A. **A memória**. *Ciência e Cultura*, v. 56, p. 30–31, 2004.

ESCOBAR, M.L.; ALCOCER, I.; BERMUDEZ-RATTONI, F. In vivo effects of intracortical administration of NMDA and metabotropic glutamate receptors antagonists on neocortical long-term potentiation and conditioned taste aversion. **Behavioural brain research**, v. 129, n. 1-2, p. 101–106, 2002.

FATHOLLAHI, Y.; SALAMI, M. The role of N-methyl-D-aspartate receptors in synaptic plasticity of rat visual cortex in vitro: effect of sensory experience. **Neuroscience letters**, v. 306, n. 3, p. 149–152, 2001.

FLOOD, J. F.; BAKER, M. L.; DAVIS, J. L. Modulation of memory processing by glutamic acid receptor agonist and antagonists. **Brain Research**, v. 521, n. 1-2, p. 197–202, 1990.

GILBERT, M. E.; LASLEY, S. M. Long-term consequences of developmental exposure to lead or polychlorinated biphenyls: Synaptic transmission and plasticity in the rodent CNS. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 12, p. 105–117, 2002.

GUGLIUCCI, A. Polyamines as clinical laboratory tools. **Clinica Chimica Acta**, v. 344, n. 1-2, p. 23–35, 2004.

GUERRA, G. P.; MELLO, C. F.; SAUZEM, P. D.; BERLESE, D. B.; FURIAM, A. F.; TABARELLI, Z.; RUBIN, M. A. Nitric oxide is involved in the memory facilitation induced by spermidine in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v.186, n. 2, p. 150–158, 2006.

HALONEN, T.; SIVENIUS, J.; MIETTINEN, R.; HALMEKYTO, M.; KAUPPINEN, R.; SINERVIRTA, R.; ALAKUIJALA, L.; ALHONEN, L.; MACDONALD, E.; JANNE, J.; RIEKKINEN, P.J. Elevated seizure threshold and impaired spatial learning in transgenic mice with putrescine overproduction in the brain. **European Journal of Neuroscience**, v. 5, n. 9, p. 1233–1239, 1993.

HARROD, S. B.; FLINT, R. W.; RICCIO, D. C. MK-801 induced retrieval, but not acquisition, deficits for passive avoidance conditioning. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 69, n. 3-4, p. 585–593, 2001.

IGARASHI, K.; KASHIWAGI, K. Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 271, n. 3, p. 559–564, 2000.

IZQUIERDO, I. Endogenous state dependency: Memory depends on the relation between the neurohumoral and hormonal states present after training and the time of testing. In G. Lynch, J.L. McGaugh, & N.M. Weinberger (Eds), **Neurobiology of learning and memory** (pp 333–350) New York: Guilford Press, 1984.

IZQUIERDO, I. Memory consolidation is not a useful hypothesis in the search for memory-enhancing drugs. **Trends in pharmacological sciences**, v. 7, p. 476–477, 1986.

IZQUIERDO, I. Role of NMDA receptors in memory. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 12, p. 128–129, 1991.

IZQUIERDO, I.; DA CUNHA, C.; ROSAT, R.; JERUSALINSKY, D.; FERREIRA, M.B.C.; MEDINA, J. H. Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. **Behavioural Neural Biology**, v. 58, n. 1, p. 16–26, 1992.

IZQUIERDO, I. Long-term potentiation and mechanisms of memory. **Drug development research**, v. 30, p. 1–17, 1993.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. **Neurobiology of learning and memory**, v. 63, n. 1, p. 19–32, 1995.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. The biochemistry of memory and its regulation by hormones and neuromodulators. **Psychobiology**, v. 25, p. 1–11, 1997.

IZQUIERDO, I.; BARROS, D. M.; MELLO e SOUZA, T.; de SOUZA, M. M.; IZQUIERDO, L. A. Mechanisms for memory types differ. **Nature**, v. 393, n. 6686, p. 635–636, 1998.

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

IZQUIERDO, I. **A arte de esquecer**. Rio de Janeiro: Viera & Lent, 2004.

IZQUIERDO, I.; BEVILAQUA, L.R.M.; ROSSATO, J.I.; BONINI, J.S.; MEDINA, J.H.; CAMMAROTA, M. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. **Trends in neurosciences**, v. 29, n. 9, p. 496–505, 2006.

JACKSON, A.; KOEK, W.; COLPAERT, F. C. NMDA antagonist make learning and recall state-dependent. **Behavioural Pharmacology**, v. 3, n. 4, p. 415–421, 1992.

JAFARI-SABET, M.; ZARRINDAST, M.R.; REZAYAT, M.; REZAYOF, A.; DJAHANGUIRI, B. The influence of NMDA receptor agonist antagonist on morphine state-dependent memory of passive avoidance in mice. **Life sciences**, v. 78, n. 2, p. 157–163, 2005.

JERUSALINSKY, K.; FERREIRA, M. B. C; WALZ, R.; DA SILVA, R. C.; BIANCHIN, 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. **Behavioural neural biology**, v. 58, n. 1, p. 76–80, 1992.

JOHNSON, T. D. Modulation of channel function by polyamines. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 17, n. 1, p. 22–27, 1996.

KALAC, P.; KRAUSOVÁ, P. A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods. **Food chemistry**, 90:219–230, 2005.

KISHI, A.; OHNO, M.; WATANABE, S. Concurrent activation of hippocampal glycine and polyamine sites of the N-methyl-D-aspartate receptor synergistically reverses working memory deficits in rats. **Neuroscience Letters**, v. 257, n. 3, p. 131–134, 1998a.

KISHI, A.; OHNO, M.; WATANABE, S. Spermidine, a polyamine site agonist, attenuates working memory deficits caused by blockage of hippocampal muscarinic receptors and mGluRs in rats. **Brain Research**, v. 793, n. 1-2, p. 311–314, 1998b.

KOPF, S. R.; OPEZZO, J. W.; BARATTI, C. M. Glucose enhancement of memory is not state-dependent. **Behavioral and neural biology**, v. 60, n. 3, p. 192–195, 1993.

LALUMIERE, R.T.; PIZANO, E.; MCGAUGH, J.L. Intra-basolateral amygdala infusions of AP-5 impair or enhance retention of inhibitory avoidance depending on training conditions. **Neurobiology of learning and memory**, v. 81, n. 1, p. 60–66, 2004.

LEES, G. V.; JONES, E. G. Expressive genes Record memories. **Neurobiology of Disease**, v. 7, n. 5, p. 533–536, 2000.

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios**: conceitos fundamentais de neurociências. São Paulo, Editora Atheneu, 2004.

LIANG, K.C.; HON, W.; DAVIS, M. Pre-and posttraining infusion of N-methyl-d-aspartate receptor antagonists into the basolateral amygdala impair memory in an inhibitory avoidance task. **Behavioral Neuroscience**, v. 108, n. 2, p. 241–253, 1994.

MAGNUSSON, K. R. The aging of the NMDA receptor complex. **Frontiers in bioscience**, v. 3, p. 70–80, 1998.

MCGAUGH, J.L. Drug facilitation of learning and memory. **Annual review of pharmacology**, v. 13, p. 229–241, 1973.

MCGAUGH, J.L. Dissociating learning and performance: drug and hormone enhancement of memory storage. **Brain research bulletin**, v. 23, n. 4-5, p. 339–345, 1989.

MCGAUGH, J.L. Neuromodulatory systems and the regulation of memory storage. In L.R.Squire and N.Butters (Eds), **Neuropsychology of memory** (pp. 386–401). New York: Guildford Press, 1992.

MCGAUGH, J. L. Memory - A century of consolidation. **Science**, v. 287, n. 5451, p. 248–251, 2000.

MCGAUGH, J. L.; IZQUIERDO, I. The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. **Trends in pharmacological sciences**, v. 21, n. 6, p. 208–210, 2000.

MCGAUGH, J. Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective. **Trends in neurosciences**, v. 25, n. 9, p. 456–461, 2002.

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, n. 3, 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. **European Journal of Pharmacology**, v. 444, n. 1-2, p. 83–96, 2002.

MOINARD, C.; CYNOBER, L.; DE BANDT, J.P. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. **Clinical Nutrition**, v. 24, n. 2, p. 184–197, 2005.

MORGAN, D.M.L. Methods in molecular biology, vol.79: **Polyamine protocols**. Edited by: D.Morgan, Human Press Inc., Totowa, NJ, pp:1–30, 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, n. 6056, p. 774–776, 1986.

MORRISON, L. D.; KISH, S. J. Brain polyamine levels are altered in Alzheimer's disease. **Neuroscience letters**, v. 197, n. 1, p. 5–8, 1995.

OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Progress in neurobiology**, v. 54, n. 5, p. 581–618, 1998.



OVERTON, D. A. Experimental methods for the study of state-dependent learning. **Federation proceedings**, v. 33, n. 7, p. 1800–1813, 1974.

PATOCKA, J. & KUEHN, G. D. Natural polyamines and their biological consequence in mammals. **Acta Medical**, v. 43, n. 4, p. 119, 2000.

PEGG, A. E. Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and as a target for chemotherapy. **Cancer research**, v. 48, n. 4, p. 759–774, 1988.

PELLEGRINI-GIAMPIETRO, D. E. An activity-dependent spermidine-mediated mechanism that modulates glutamate transmission. **Trends Neuroscience**, v. 26, n. 1, p. 9–11, 2003.

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

REYNOLDS, I.J. Arcaine is a competitive antagonist of polyamines site on the NMDA receptor. **European Journal of Pharmacology**, v. 177, n. 3, p. 215-216, 1990.

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

ROCK, D. M. & MACDONALD, R. L. Polyamine regulation of *N*-methyl-D-aspartate receptor channels. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 35, p. 463–482, 1995.

ROESLER, R., VIANNA, M., SANT' ANNA, M.K., KUYVEN, C.R., KRUEL, A.V.S., QUEVEDO *et al.*, J. Intrahippocampal infusion of the NMDA receptor antagonist AP5 impairs retention of an inhibitory avoidance task: protection from impairment by pre training or preexposure to the task apparatus. **Neurobiology of learning and memory**, v. 69, n. 2, p. 87–91, 1998.

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 the step-down inhibitory avoidance. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 33, n. 7, p. 829–834, 2000.

ROESLER, R.; SCHRÖDER, N.; VIANNA, M.R.M.; QUEVEDO, J.; BROMBERG, E.; KAPCZINSKI *et al.*, F. Differential involvement of hippocampal and amygdala NMDA

receptors in contextual and aversive aspects of inhibitory avoidance memory in rats. **Brain research**, v. 975, n. 1-2, p. 207–213, 2003.

RUBIN, M. A.; JURACH, A.; ZANOLLA, G. R.; BOEMO, R. L.; SOUZA, D. O.; MELLO, C. F. Intrahippocampal GMP administration improves inhibitory avoidance performance through GABAergic and glutamatergic mechanisms in rats. **NeuroReport**, v. 8, n. 17, 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. **Behavioural Pharmacology**, v.11, n. 1, 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. **European Journal of Pharmacology**, v. 423, n. 1, 35–39, 2001.

RUBIN, M. A.; BERLESE, D. B.; STIEGEMEIER, M. A.; VOLKWEIS M. A.; OLIVEIRA, D. M.; SANTOS, T. L. B. DOS; FENILI, A. C.; MELLO, C.F. Intra-amygdala administration of polyamines modulates fear conditioning in rats. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 9, p. 2328–2334, 2004.

RUSSELL, D.H. Increased polyamine concentrations in the urine of human cancer patients. **Nature: New Biology**, v. 233, n. 39, p. 144–145, 1971.

SALINAS, J. A.; INTROINI-COLLISON, I. B.; DALMAZ, C.; MCGAUGH, J. L. Posttraining intra-amygdala infusion of oxotremorine and propranolol modulate storage of memory for reduction in reward magnitude. **Neurobiology of learning and memory**, v. 68, n. 1, p. 51–59, 1997.

SCATTON, B. The NMDA receptor complex. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 7, n. 8, p. 389–400, 1993.

SCOTT, R. H.; SUTTON, K. G.; DOLPHIN, A. C. Interactions of polyamines with neuronal ion channels. **Trends of Neuroscience**, v. 16, n. 4, p. 153–160, 1993.

SEIDL, R.; BENINATI, S.; CAIRNS, N.; SINGEWALD, N.; RISSER, D.; BAVAN, H.; NEMETHOVA, M.; LUBEC, G. Polyamines in frontal cortex of patients with Down syndrome and Alzheimer disease. **Neuroscience letters**, v. 206, n. 2-3, p. 193–195, 1996.

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

SEILER, N.; BOLKENIUS, F. N.; KNODGEN, B. The influence of catabolic reactions on polyamine excretion. **The biochemical journal**, v. 225, n. 1, p. 219–226, 1985.

SEILER, N. Functions of polyamine acetylation. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 65, n. 10, p. 2024–2035, 1987.

SEILER, N.; DAUNE, G.; BOLKENIUS, F. N.; KNODGEN, B. Ornithine aminotransferase activity, tissue ornithine concentrations and polyamine metabolism. **The international journal of biochemistry**, v. 21, n. 4, p. 425–432, 1989.

SEILER, N. Polyamine metabolism. **Digestion**, 46 (suppl. 2):319–330, 1990.

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

SEILER, N. Catabolism of polyamines. **Amino Acids**, v. 26, n. 3, p. 217–233, 2004.

SHIMADA, A.; SPANGLER, E. L.; LONDON, E. D.; INGRAM, D.K. Spermidine potentiates dizocilpine-induced impairment of learning performance by rats in a 14-unit T-maze. **European Journal of Pharmacology**, v. 263, n. 3, p. 293–300, 1994.

SHIMIZU, E.; TANG Y.; RAMPON, C.; TSIEN, J. Z. NMDA Receptor-Dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation. **Science**, v. 290, n. 5510, p. 1170–1174, 2000.

SHULZ, D. E.; SOSNIK, R.; EGO, V.; HAIDARLIU, S.; AHISSAR, E. A neuronal analogue of state-dependent learning. **Nature**, v. 403, n. 6769, p. 549–553, 2000.

SLOT, L. A. B.; COLPAERT, F. C. Recall rendered dependent on an opiate state. **Behavioral Neuroscience**, v. 113, n. 2, p. 337–344, 1999.

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

SRIPADA, S.; GAYTAN, O.; SWANN, A.; DAFNY, N. The role of MK-801 in sensitization to stimulants. **Brain research reviews**, v. 35, n. 2, p. 97–114, 2001.

TABOR, C. W.; TABOR, H. Polyamines. **Annual Review of Biochemistry**, v. 53, p. 749–790, 1984.

TABOR, C. W.; TABOR, H. Polyamines in microorganism. **Microbiological reviews**, v. 49, n. 1, p. 81–89, 1985.

TANG, Y.; SHIMIZU, E.; DUBE, G. R.; RAMPON, C.; KERCHNER, G. A.; ZHUO, M.; LIU, G.; TSIEN, J. Z. Genetic enhancement of learning and memory in mice. **Nature**, v. 401, n. 6748, p. 63–69, 1999.

TETI, D.; VISALLI, M.; MCNAIR, H. Analysis of polyamines as markers of (patho)physiological conditions. **Journal of Chromatography B**, v. 781, n. 1-2, p. 107–149, 2002.

THOMAS, T.; THOMAS, T. J. Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. **Cellular and molecular life sciences**, v. 58, n. 2, p. 244–258, 2001.

URDIALES, J. L.; MEDINA, M. A.; SANCHEZ-JIMENEZ, F. Polyamine metabolism revisited. **European journal of gastroenterology and hepatology**, v. 13, n. 9, p. 1015–1019, 2001.

VAN LEUWENHOEK, A. Observationes D. Anthonii Leuwenhoek, de natis semine genitali animalcules. **Philosophical Transactions**, v. 12, p. 1040–1043, 1678.

WAYNER, M.J.; TRACY, H. A.; ARMSTRONG, D. L.; PHELIX, C. F. Air righting: role of the NMDA receptor channel and hippocampal LTP. **Physiology & behavior**, v. 69, n. 4-5, p. 505–510, 2000.

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, n. 2, p. 199–208, 1990.

WILLIAMS, K.; ROMANO, C.; DICHTER, M. A.; MOLINOFF, P. B. Minireview: Modulation of the NMDA receptor by polyamine. **Life Science**, v. 48, n. 6, p. 469–498, 1991.

WILLIAMS, K.; ZAPPIA, A. M.; PRITCHETT, D. B.; SHEN, Y. M.; MOLINOFF, P. B. Sensitivity of the N-methyl-D-aspartate receptor to polyamines is controlled by NR2 subunits. **Molecular pharmacology**, v. 45, n. 5, p. 803–809, 1994.

WILLIAMS, K. Modulation and block of ion channel: a new biology of polyamines. **Cellular signalling**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 1997a.

WILLIAMS, K. Interactions of polyamines with ion channels. **Biochemical journal**, v. 325, p. 289–297, 1997b.

WORTHEN, D. R.; GIBSON, D. A.; ROGERS, D. T.; BENCE, A. K.; FU, M.; LITTLETON, J. M.; CROOKS, P. A. Endogenous indoles as novel polyamine site ligands at the N-methyl-D-aspartate receptor complex. **Brain Research**, v. 890, n. 2, p. 343–346, 2001.

YAMAKURA, T.; SHIMOJI, K. Subunit- and site-specific pharmacology of the NMDA receptor channel. **Progress in neurobiology**, v. 59, n. 3, p. 279–298, 1999.

YONEDA, Y.; OGITA, K. Novel fourth binding sites of <sup>3</sup>[H]-spermidine within the NMDA receptor complex. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 287, p. 455–475, 1991.

ZANATTA, M.S.; SCHAEFFER, E.; SCHMITZ, P.K.; MEDINA, J.; QUEVEDO, J.A.; QUILLFELDT *et al.*, J.A. Sequential involvement of NMDA receptor-dependent processes in hippocampus, amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in memory processing. **Behavioural pharmacology**, v. 7, n. 4, p. 341–345, 1996.

