

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

**EFEITO DA ESPERMIDINA SOBRE A PERSISTÊNCIA
DA MEMÓRIA EM RATOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Cristiane Signor

Santa Maria, RS, Brasil

2013

EFEITO DA ESPERMIDINA SOBRE A PERSISTÊNCIA DA MEMÓRIA EM RATOS

Por

Cristiane Signor

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

Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

Orientadora: Dr^a. Maribel Antonello Rubin

Santa Maria, RS, Brasil

2013

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

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

**EFEITO DA ESPERMIDINA SOBRE A PERSISTÊNCIA DA
MEMÓRIA EM RATOS**

elaborada por
Cristiane Signor

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Maribel Antonello Rubin (UFSM)

(Presidente/Orientadora)

Prof^a. Dr^a. Ana Flavia Furian (UFSM)

Dr. Rafael Porto Ineu (UFSM)

Santa Maria, 22 de fevereiro de 2013.

“A principal impressão, a mais forte e a mais constante, que se tem a estudar a atividade nervosa superior pelo nosso método, é a extrema plasticidade dessa atividade, as suas imensas possibilidades: nela, nada permanece na imobilidade, nada é inflexível, tudo pode ser conseguido e aperfeiçoado, desde que sejam satisfeitas certas condições necessárias”.

(Ivan Pavlov)

AGRADECIMENTOS

À Professora Dr^a. Maribel Antonello Rubin, e o professor Dr. Carlos Fernando Mello, por confiar e oferecer a oportunidade de ingressar neste mundo da pesquisa e permitir desenvolver este trabalho.

Agradeço a minha família, em especial meus pais (Idalino Signor e Nelci Signor), pelo apoio, orientação, por ser a base dos meus princípios e da minha formação.

Às minhas ajudantes de experimento, Geresa Paz Porto e Daniela Aymone Ribeiro por estarem sempre dispostas a me ajudar.

Ao grupo da memória que me ajudou a crescer e ampliar meus conhecimentos ao longo desses anos. Em especial ao Gustavo Petri Guerra que sanou minhas dúvidas e me auxiliou em meus questionamentos.

À CAPES pelo apoio financeiro, permitindo uma melhor execução deste trabalho.

RESUMO

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

EFEITO DA ESPERMIDINA SOBRE A PERSISTÊNCIA DA MEMÓRIA EM RATOS

AUTORA: Cristiane Signor

ORIENTADORA: Maribel Antonello Rubin

Local e data da Defesa: Santa Maria, 22 de fevereiro de 2013.

A memória de longa duração envolve três fases: aquisição, consolidação e evocação. No entanto, recentemente foi descrita uma nova fase de consolidação, denominada de persistência da memória. Nesta fase, ocorrem eventos cruciais 12 horas após a aquisição, na qual a síntese de novas proteínas e do fator neurotrófico derivado do encéfalo, são essenciais. As poliaminas putrescina, espermidina e espermina, atuam como moduladores endógenos de diversos canais iônicos, incluindo o subtipo de receptor glutamatérgico N-metil-D-aspartato. A administração sistêmica e intra-cerebral de espermidina, imediatamente após o treino, melhora a memória em diversas tarefas em ratos. Entretanto, não há estudos demonstrando o efeito da espermidina sobre a persistência da memória. Assim, nós investigamos o efeito da administração sistêmica de espermidina, e de arcaína, antagonista do sítio das poliaminas no receptor N-metil-D-aspartato, na persistência da memória, através da tarefa de medo condicionado contextual. Para este estudo, foram utilizados ratos Wistar machos adultos, os quais, foram submetidos a uma sessão de treino na tarefa de medo condicionado contextual, e 12 horas após o treinamento, receberam uma administração sistêmica de espermidina (0,1-30 mg/kg), arcaína (0,1-10 mg/kg) ou a associação de espermidina e arcaína. No segundo ou no sétimo dia após o treino os ratos foram submetidos ao teste. A administração sistêmica de espermidina melhorou, enquanto que a administração sistêmica de arcaína prejudicou a persistência da memória, quando os ratos foram testados no segundo e no sétimo dia após o treino. A arcaína (0,1 mg/kg) na dose que não possui efeito *per se*, preveniu a melhora da persistência da memória induzida pela espermidina (10 mg/kg), enquanto que a espermidina (1 mg/kg) na dose que não possui efeito *per se*, preveniu a piora da persistência da memória induzida pela arcaína (10 mg/kg), quando os ratos foram testados no segundo e no sétimo dia após o treino. Estes resultados sugerem o envolvimento da espermidina na persistência da memória em ratos.

Palavras chave: memória de longa duração, persistência da memória, poliaminas, arcaína, espermidina, medo condicionado contextual.

ABSTRACT

Dissertation of Master's degree
Graduation Program in Biological Sciences: Toxicologic Biochemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

EFFECT OF THE SPERMIDINE IN THE MEMORY PERSISTENCE IN RATS

Author: Cristiane Signor

Advisor: Maribel Antonello Rubin

Place and date of defense: Santa Maria, February 22th, 2013

The long-term memory involves three stages: acquisition, consolidation and extinction. However was recently described a new phase of consolidation, called the persistence of memory. At this stage, crucial events occur 12 hours after the acquisition, in which the synthesis of new proteins and brain derived neurotrophic factor, are essential. The polyamines putrescine, spermidine and spermine, they act as endogenous modulators of various ion channels, including the glutamatergic receptor subtype N-methyl-D-aspartate. Systemic and intra-cerebral spermidine, immediately after training, improves memory in various tasks in rats. However, no studies demonstrating the effect of spermidine on the persistent memory. Thus, we investigated the effect of systemic administration of spermidine, and arcaine, antagonist of polyamine site on the N-methyl-D-aspartate, the persistence of memory, through the task of contextual fear conditioning. For this study, were used adult male Wistar rats, which underwent a training session on the task of contextual fear conditioning, and 12 hours after training, received a systemic administration of spermidine (0.1-30 mg/kg), arcaine (0.1-10 mg/kg) or the combination of spermidine and arcaine. In the second or the seventh day after training the mice were tested. Systemic administration of spermidine improved, whereas systemic administration of impaired arcaine the persistence of memory, when the rats were tested in the second and seventh day after training. The arcaine (0.1 mg/kg) in a dose that has no effect *per se* prevented improved stary induced by spermidine (10 mg/kg), whereas spermidine (1 mg/kg) dose not effect *per se* has prevented the worsening of stary arcaine induced (10 mg/kg), when the rats were tested in the second and seventh day after training. These results suggest the involvement of spermidine in persistent memory in rats.

Keywords: long-term memory, persistence of memory, polyamines, arcaine, spermidine, contextual fear conditioning.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADC	Arginina descarboxilase
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
AP5	Ácido D-2-amino-5-fosfonopentanóico
BHE	Barreira hematoencefálica
CamKII	Proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina do tipo II
CREB	Proteína ligante do elemento responsivo ao AMPc
CS	Estímulo condicionado
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
MLD	Memória de longa duração
MCD	Memória de curta duração
mRGLU	Receptor Glutamatérgico metabotrópico
MAPK	Proteína ativada por mitógeno
MTA	Metiltioadenosina
MK-801	(+)-5-Metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,b]-ciclohepteno-5-10-amino
NMDA	<i>N</i> -metil-D-aspartato
NOS	Óxido nítrico sintase
ODC	Ornitina descarboxilase
PAO	Poliamina oxidase
PKA	Proteína quinase dependente de AMPc
PKG	Proteína quinase dependente de GMPc
PKC	Proteína quinase dependente de cálcio
SAM	S-adenosilmetionina
SAMDC	S-adenosil-metionina descarboxilase
SPD	Espermidina
SPM	Espermina
SSAT	Espermidina/espermina N ¹ acetil-transferase
US	Estímulo incondicionado

LISTA DE FIGURAS E TABELA

Figura 1- Cascata de eventos que ocorrem na formação da memória.....	16
Figura 2- Medo condicionado contextual.....	18
Figura 3- Receptor N-metil D-Aspartato.....	20
Figura 4- Estrutura química das poliaminas.....	21
Tabela 1- Concentrações de poliaminas no encéfalo de ratos adultos.....	22
Figura 5- Metabolismo das poliaminas.....	25
Figura 6- Esquema de ação das poliaminas no receptor NMDA.....	27
Figura 7- Estrutura química da arcaína.....	29
Figura 8- Representação esquemática das fases da memória.....	30

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE FIGURAS E TABELA	ix
APRESENTAÇÃO	xi
1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Memória.....	13
1.2 Mecanismo de formação da memória.....	14
1.3 Medo condicionado contextual.....	16
1.4 Receptor N-metil-D-aspartato.....	18
1.5 Poliaminas.....	20
1.6 Função das poliaminas.....	23
1.7 Metabolismo das poliaminas.....	23
1.8 Poliaminas, NMDAr e memória.....	26
1.9 Persistência da memória.....	29
1.10 BDNF e persistência da memória.....	30
2. OBJETIVOS	33
3. MANUSCRITO	35
4. CONCLUSÕES	53
5. PERSPECTIVAS DE CONTINUIDADE DO ESTUDO	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

APRESENTAÇÃO

Na introdução, estão brevemente descritos os temas abordados nesta dissertação. Os métodos, resultados e discussão, que fazem parte dessa dissertação, estão apresentados sob forma de manuscrito, submetido para publicação no periódico *Neurobiology of Learning and Memory*. A sessão conclusão apresenta interpretações gerais sobre a mesma. As referências bibliográficas, encontradas ao final desta dissertação, referem-se somente as citações que aparecem na introdução.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Memória

A memória é uma das funções cognitivas mais complexas que a natureza produziu, e as evidências científicas sugerem que o aprendizado de novas informações e o seu armazenamento causa alterações estruturais no sistema nervoso (IZQUIERDO, 2002). No caso específico dos seres humanos, a memória exerce um papel ainda mais nobre, funcionando como um arcabouço que armazena nossa história pessoal, e torna possível que crescamos e mudamos ao longo da vida (KANDEL, 2001).

A formação da memória de longa duração (MLD) depende de processos neuronais que iniciam com a aquisição de uma nova informação, seguida por um processo de consolidação/armazenamento em várias áreas cerebrais. Seu armazenamento é um processo dinâmico que depende da estabilização de uma rede neuronal (MEDINA et al., 2008). Durante o processo de estabilização, as MLD necessitam de síntese protéica e de expressão gênica em áreas restritas do hipocampo e da amígdala basolateral (BEKINSCHTEIN et al., 2007), sendo assim necessário um tempo para que a memória torne-se mais permanente (MCGAUGH, 1966). E por fim, o processamento da memória passa por uma fase denominada de evocação, pelo qual a memória está apta a ser lembrada (ABEL and LATTAL, 2001).

De acordo com seu conteúdo, as memórias podem ser classificadas em: memória declarativa ou explícita e memória não declarativa ou implícita. As memórias declarativas consistem em registrar fatos e eventos facilmente adquiridos com plena intervenção da consciência (recordação), no entanto, são memórias facilmente esquecidas (IZQUIERDO, 2002). As memórias declarativas também podem ser classificadas em: memórias episódicas ou memórias semânticas. Enquanto as memórias episódicas referem-se a eventos que assistimos ou que participamos, as memórias semânticas referem-se a conhecimentos gerais (EICHENBAUM, 2001; IZQUIERDO, 2002).

De outro modo, as memórias não-declarativas ou implícitas referem-se àquelas memórias para habilidades ou procedimentos, pelo qual não conseguimos verbalizar e não envolvem evocação consciente. Elas são adquiridas através de prática e repetições, persistem por um período maior de tempo e possuem uma menor probabilidade de esquecimento (BEAR et al., 2002; IZQUIERDO, 2002; SQUIRE and KANDEL, 2003).

Além disso, as memórias também podem ser classificadas de acordo com o seu critério temporal em: memória imediata, que mantém as informações por apenas alguns segundos, memória de curta duração (MCD) que duram minutos ou poucas horas (3-6 horas), e a MLD (RANGANATH and BLUMENFELD, 2005). Dependendo da força e/ou proeminência da informação a ser lembrada, a MLD pode persistir por 24-48 horas, por dias, semanas (ANAGNOSTARAS et al., 1999; BARCO et al., 2006), ou até mesmo uma vida inteira (ALBERINI, 2005; ALONSO et al., 2004; BEKINSCHTEIN et al., 2007).

1.2 Mecanismos de formação da memória

Um substancial número de estudos demonstram que a formação da memória de medo ao contexto depende da atividade integrada da amígdala (GOOSENS and MAREN, 2001; MAREN et al., 1996), hipocampo (ANAGNOSTARAS et al., 2001; DAUMAS et al., 2005) e regiões corticais (BURWELL et al., 2004; GILMARTIN and HELMSTETTER, 2010; QUINN et al., 2008; SACCHETTI et al., 1999).

Uma seqüência de eventos bioquímicos no hipocampo dos ratos é necessária para a formação da memória (Figura 1). A cascata de reações para a formação da MLD inicia quando o glutamato é liberado, se liga nos receptores específicos na membrana pós-sináptica: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA), cainato, receptor N-metil-D-aspartato (NMDAr) e receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mRGLU) (MCGAUGH, 2000; MCGAUGH and IZQUIERDO, 2000).

A ligação do glutamato nesses receptores ocasiona uma despolarização persistente na membrana pós-sináptica [influxo de cálcio (Ca^{+2}), e sódio (Na^{+}), através de receptores do tipo AMPA] promovendo o deslocamento do íon magnésio

(Mg⁺²) do NMDAr, que passa a responder ao glutamato, permitindo assim o influxo de Na⁺ e Ca⁺² para o interior do terminal pós-sináptico.

Este aumento na concentração de Ca⁺² intracelular estimula enzimas como: proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina do tipo II (CaMKII), proteína quinase dependente de GMPc (PKG), e a proteína quinase dependente de cálcio (PKC). Após 3-4 horas, também são ativadas a proteína quinase dependente de AMPc (PKA) e a proteína ativada por mitógeno (MAPK). Estas juntamente com a PKC e CaMKII, fosforilam fatores de transcrição protéicos no núcleo, dos quais o principal é a proteína ligante do elemento responsivo ao AMPc (CREB). Em seguida, a CREB estimula a síntese de novas proteínas e o aumento da efetividade da transmissão de informações entre os neurônios (plasticidade sináptica) (BLISS and COLLINGRIDGE, 1993; IZQUIERDO, 2002; IZQUIERDO et al., 2006; IZQUIERDO and MEDINA, 1995; IZQUIERDO and MEDINA, 1997a; MCGAUGH and IZQUIERDO, 2000), além de ser responsável pelo aumento na expressão de alguns genes como C-fos, Zif 268, e do BDNF (HALL et al., 2001; HERTZEN and GIESE, 2005; LIU et al., 2004; SUZUKI et al., 2011) e dos genes de expressão imediata vesl-1S ou Homer-1a (INOUE et al., 2009).

Essas etapas podem ser moduladas através da aplicação de agonistas, antagonistas, moduladores dos diversos receptores glutamatérgicos, e inibidores específicos das enzimas mencionadas. Alguns deles favorecem ou melhoram a memória como no caso de agonistas e moduladores positivos (poliaminas) do NMDAr e ativadores das enzimas PKA, PKG e CaMKII. Por outro lado, antagonistas destes receptores e inibidores destas enzimas provocam amnésia em diversas tarefas comportamentais (IZQUIERDO and MEDINA, 1995;1997b; MCGAUGH and IZQUIERDO, 2000).

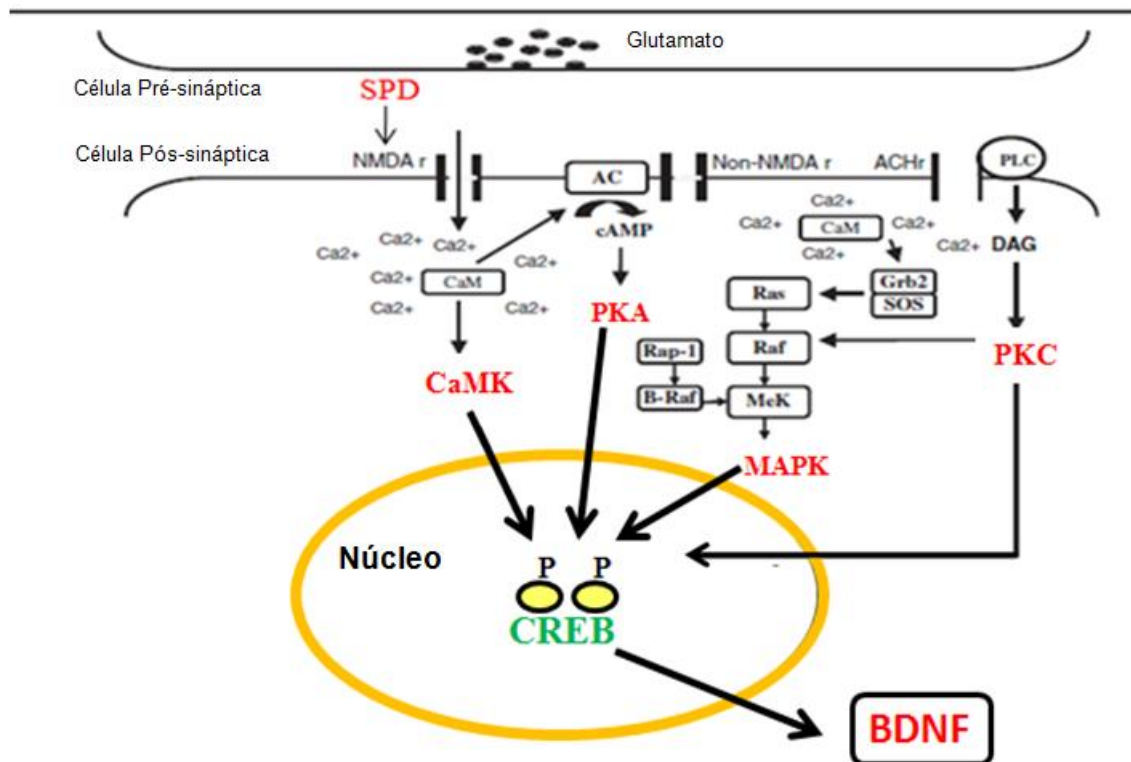


Figura 1. Esquema da seqüência de modificações de um terminal sináptico glutamatérgico envolvido na formação da memória. Fonte: Adaptado de (ROSEN, 2004). SPD (espermidina); NMDAr (receptor N-metil-D-aspartato); AC (adenilato ciclase); AMPc (adenosina monofosfato cíclico); PKA (Proteína quinase dependente de AMPc); PKC (proteína quinase dependente de cálcio); MAPK (proteína ativada por mitógeno); CaM (calmodulina); CaMK (Proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina); PLC (fosfolipase C); DAG (diacilglicerol); BDNF (fator neurotrófico derivado do encéfalo); CREB (proteína ligante do elemento responsivo ao AMPc).

1.3 Medo condicionado contextual

Pesquisas na área da memória empregam tarefas de estímulos aversivos como ferramentas experimentais úteis no estudo da aquisição e da consolidação da memória. As tarefas de aprendizado mais empregadas são: medo condicionado e esquia inibitória (ou esquia passiva) (HARTLEY et al., 2011).

O medo condicionado é um dos paradigmas mais estudados para avaliar a base neural da memória emocional. Esta tarefa envolve o condicionamento Pavloviano de um estímulo aversivo (normalmente um choque fraco sendo considerado o estímulo

incondicionado – US) com associação a um estímulo neutro (estímulo condicionado – CS). O estímulo neutro deve ser mais discreto como uma luz ou tom ou mesmo o contexto a que o animal é submetido quando exposto ao US. Quando o CS for o contexto, o condicionamento Pavloviano recebe a denominação de medo condicionado contextual (Figura 2) (HARTLEY et al., 2011).

As respostas evocadas frente à associação do CS-US englobam uma série de mudanças comportamentais como: alterações autonômicas, que envolvem o aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial (IWATA and LEDOUX, 1988) alterações neuroendócrinas, que abrangem a liberação dos hormônios adrenocorticotróficos e corticosterona (GUIJARRO et al., 2007) e alterações comportamentais como a vocalização ultrassônica (HOLMSTROM et al., 2007), sobressalto e o congelamento (DAVIS et al., 1986; FENDT and FANSELOW, 1999).

A tarefa de medo condicionado envolve ativação do NMDAR na amígdala, enquanto a tarefa de medo condicionado contextual envolve a ativação do NMDAR no hipocampo (FANSELOW et al., 1991; HARTLEY et al., 2011; KIM and JUNG, 2006; SCHENBERG et al., 2005). A ativação hipocampal deste receptor parece ser essencial para a consolidação da memória (BURGOS-ROBLES et al., 2007; CAMERA et al., 2007; GOMES et al., 2010; KALISCH et al., 2009; LIU et al., 2009; SANTINI et al., 2001). A consolidação torna os traços de memória mais duradouros (ABEL and LATTAL, 2001), de forma que memórias de medo podem persistir por meses, anos ou até por toda vida (MAREN, 2005).

As respostas emocionais a situações aversivas, constrangedoras ou ameaçadores são bastante comuns em seres humanos e possuem grande importância para os indivíduos. No entanto, em certos momentos elas podem se tornar exageradas ou ocorrerem em situações inapropriadas, caracterizando um distúrbio de ansiedade, tal como o transtorno de estresse pós-traumático (LEDOUX, 1998). Assim, o condicionamento Pavloviano ou medo condicionado pode ser utilizado para investigar, além dos mecanismos de aprendizado e memória, como as origens dos distúrbios relacionados ao medo em humanos (KIM and JUNG, 2006)

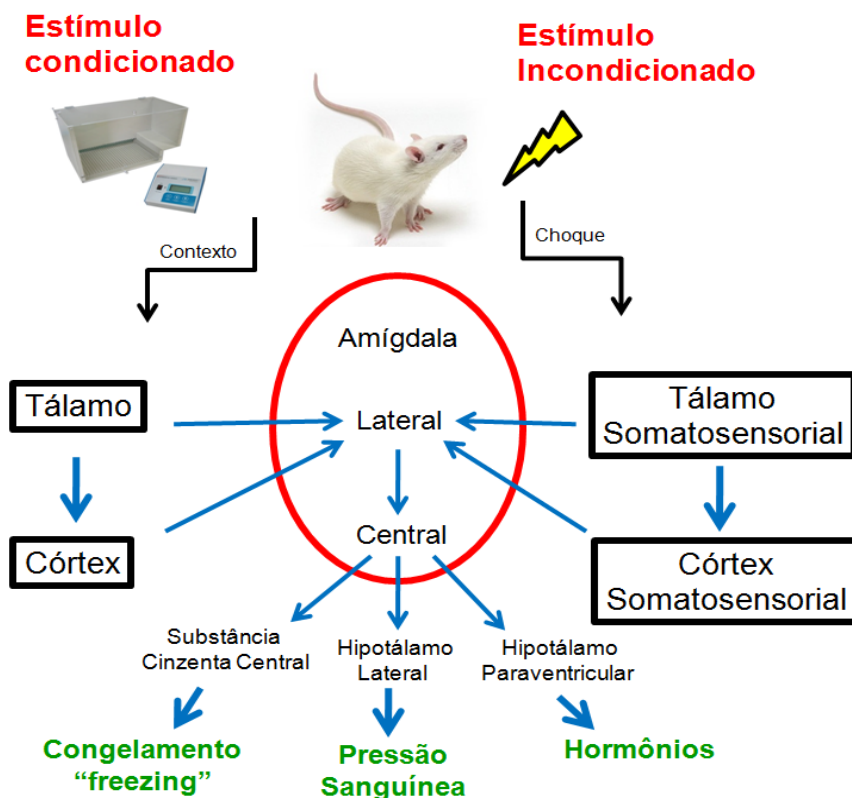


Figura 2. Circuitos neurais envolvidos no medo condicionado. O estímulo condicionado e o estímulo incondicionado chegam na amígdala através do núcleo lateral onde ocorre a associação destes estímulos. Este núcleo é interconectado com o núcleo central da amígdala o qual envia projeções para vários centros somatomotores e autonômicos, que controlam a expressão das respostas do medo e respostas relacionadas com o sistema nervoso autonômico e endócrino, via projeções para o tronco cerebral e hipotálamo. Adaptado de (SIGURDSSON et al., 2006).

1.4 Receptor N-metil-D-aspartato (NMDAr)

O receptor N-metil-D-aspartato (NMDAr) é um subtipo de receptor glutamatérgico, amplamente distribuído no sistema nervoso central (SNC), sendo encontrado em altas densidades nas camadas superficiais de diferentes estruturas, como córtex cerebral, hipocampo, estriado, e amígdala (RIEDEL et al., 2003; SCATTON, 1993). Desempenha um importante papel em várias funções fisiológicas, destacando-se na plasticidade sináptica, aprendizagem e memória (SCHWARTZ et al., 1996; WHETSELL, 1996).

O NMDAr consiste de um complexo protéico com quatro domínios transmembranas, um domínio extracelular N-terminal e um intracelular C-terminal.

Assim como os outros receptores glutamatérgicos, o NMDAr apresenta diferentes sítios de ligação para compostos endógenos e exógenos (Figura 3). Dentre os principais agonistas do NMDAr destaca-se: glutamato, glicina (co-agonista) e as poliaminas, e como antagonistas destaca-se: o Ácido D-2-amino-5-fosfonopentanóico (AP5), e o (+)5-Metil-10,11-5H-dibenzo[a,b]-cicloheptano-5-10-amino (MK-801) (BONACCORSO et al., 2011; CASTELLANO et al., 2001; CASTELLANO et al., 1999; CERETTA et al., 2008a; CESTARI and CASTELLANO, 1997; HEDEGAARD et al., 2011; JACKSON et al., 1992; LIU et al., 2009; MEYER et al., 1998; MIKOLAJCZAK et al., 2002; MONAGHAN and COTMAN, 1985; QUEVEDO et al., 1997; RANSOM and STEC, 1988; RAYMOND et al., 2011)

O NMDAr possui várias subunidades heteroméricas: NR1 (A-G), NR2 (A-D) e NR3 (A-B), que agrupadas formam um canal iônico de condutância seletiva para íons Ca^{+2} , Na^+ e K^+ , através da membrana neuronal (FLORES-SOTO et al., 2012; HEDEGAARD et al., 2011; MONYER et al., 1992).

No potencial de repouso, este canal iônico encontra-se bloqueado pelo íon Mg^{2+} . Sendo assim, o NMDAr só é ativado quando três fatores ocorrem simultaneamente: 1) ligação do neurotransmissor glutamato na subunidade NR2B; 2) ligação de glicina (co-agonista obrigatório) na subunidade NR1; e 3) despolarização da membrana pós-sináptica. Estes três fatores provocam uma mudança na conformação alostérica do NMDAr, o qual diminui sua afinidade pelo Mg^{2+} que é então deslocado, facilitando assim, o influxo de íons Ca^{2+} e Na^+ bem como o efluxo de íons K^+ . Esse aumento de íons Ca^{2+} no meio intracelular é extremamente importante para que mensageiros intracelulares possam ativar muitas enzimas envolvidas na consolidação da memória (KERCHNER and NICOLL, 2008; NEWPHER and EHLERS, 2009).

Portanto, tem sido proposto que o NMDAr desempenha um papel fundamental nos processos de aprendizagem e memória, destacando-se nas fases iniciais da consolidação da memória, utilizando tarefas como a esQUIVA inibitória (CAMMAROTA et al., 2008; IZQUIERDO and MEDINA, 1997b; ROESLER et al., 2005; ROESLER et al., 2003) e o medo condicionado (BURGOS-ROBLES et al., 2007; CAMERA et al., 2007; GOMES et al., 2010; KALISCH et al., 2009; LIU et al., 2009; SANTINI et al., 2001).

A administração de antagonistas do NMDAr como o MK-801 e o AP5 provocam prejuízo no desempenho de diversas tarefas de memória (DE LIMA et al., 2005; JAFARI-SABET, 2006; ROSSATO et al., 2009). Por outro lado, agonistas do NMDAr, como o glutamato (IZQUIERDO and 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 (FLOOD et al., 1990).

De forma notável, a super ativação do NMDAr está relacionada com uma variedade de estados patológicos, incluindo isquemia, trauma, epilepsia e estados crônicos degenerativos como a doença de Huntington, Alzheimer, transtornos psiquiátricos e síndrome de dor neuropática (EGERTON et al., 2011; HU et al., 2011; NICHOLSON et al., 2011; RAYMOND et al., 2011; SALMINA et al., 2011; SALTER and PITCHER, 2011; XIAOPING et al., 2011).

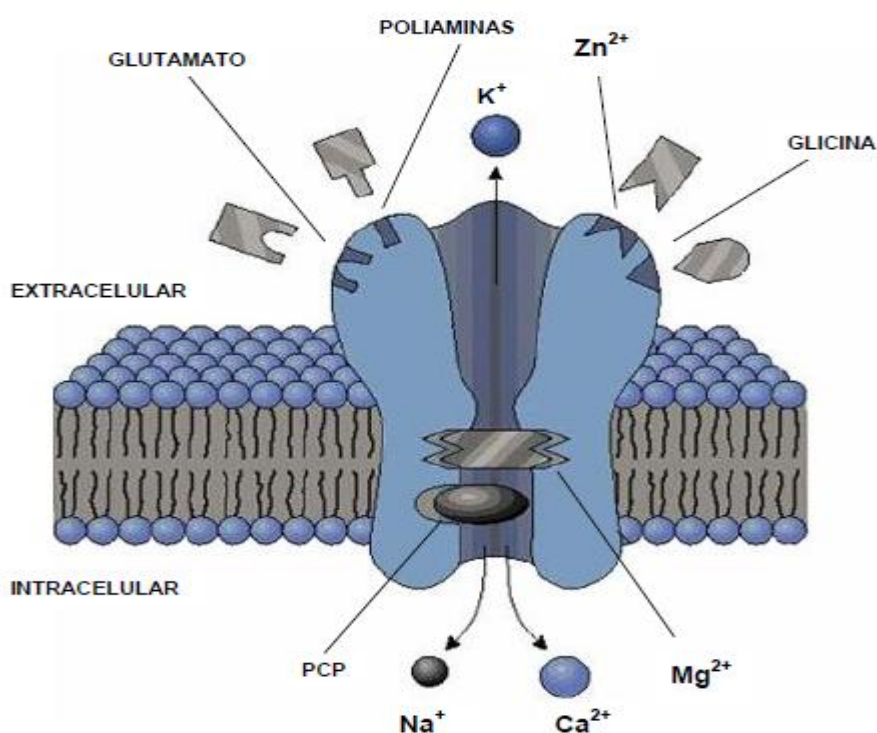


Figura 3. Representação esquemática do receptor NMDA. Adaptado de (ZIGMOND et al., 1999).

1.5 Poliaminas

As poliaminas putrescina, espermidina (SPD) e espermina (SPM), são aminas alifáticas simples, compostas por uma, duas ou três cadeias carbonadas flexíveis, respectivamente. As extremidades das cadeias carbonadas são conectadas por grupamento amino primário (figura 4), o qual é responsável por seu caráter fortemente básico. Além disso, em pH fisiológico as poliaminas encontram-se totalmente protonadas, resultando em cátions orgânicos de baixo peso molecular e solúveis em água (CARTER, 1994).

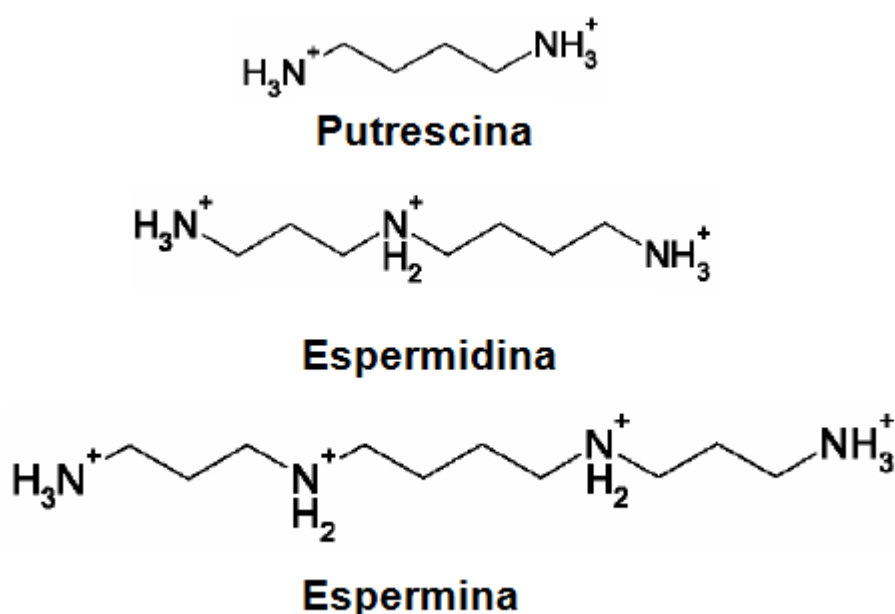


Figura 4. Estrutura química das três poliaminas endógenas, putrescina, espermidina e espermina (KALAC P, 2005).

Essas aminas alifáticas são encontradas em todas as células, incluindo células procarióticas e eucarióticas (plantas e animais) (THOMAS and THOMAS, 2001). São amplamente distribuídas no SNC (COFFINO, 2001; GUGLIUCCI, 2004; WANG et al., 2003), sendo encontradas principalmente em regiões do encéfalo como: hipotálamo, bulbo, hipocampo e cerebelo. A SPD destaca-se por ser a poliamina que possui maior concentração na região hipocampal de ratos, seguida da SPM, e em concentrações significativamente menores de putrescina (tabela 1) (SEILER and SCHMIDT-GLENEWINKEL, 1975).

Os níveis intracelulares de poliaminas são mantidos em um limite muito estreito, isto é, enquanto uma diminuição acarreta em prejuízo no crescimento celular, um excesso pode ser excitotóxico (DAVIS, 1990). Estudos recentes demonstraram que o plasma de pacientes com câncer, apresenta: (Putrescina: 108,0 (ng/ml⁻¹); SPD: 22,37 (ng/ml⁻¹); e SPM: 9,10 (ng/ml⁻¹), enquanto o plasma de pacientes normais apresenta: Putrescina: 16,55 (ng/ml⁻¹); SPD: 8,03 (ng/ml⁻¹); e SPM: 3,91 (ng/ml⁻¹) (LIU. et al., 2012).

Devido a sua natureza polar, as poliaminas dificilmente atravessam a barreira hematoencefálica (BHE). De fato, cerca de 5% da concentração das poliaminas encontradas na corrente sanguínea conseguem atingir o encéfalo (ANDERSON et al., 1975; SHIN et al., 1985). Diler e colaboradores sugerem que a passagem de poliaminas para o SNC possa envolver carreadores em nível de BHE (DILER et al., 2002).

Tabela 1. Concentrações de poliaminas no encéfalo de ratos adultos

	Putrescina (nmol g ⁻¹)	Espermidina (nmol g ⁻¹)	Espermina (nmol g ⁻¹)
Córtex frontal	9,4 ± 1,3	235 ± 22	221 ± 20
Hipocampo	7,1 ± 1,2	420 ± 107	334 ± 64
Hipotálamo	22,9 ± 2,0	591 ± 109	253 ± 54
Bulbo	3,7 ± 0,8	1016 ± 77	157 ± 33
Cerebelo	13,0 ± 1,3	674 ± 58	381 ± 47

Valores expressos como média ± desvio padrão.

Dados retirados de Seiler & Schmitd-Glenewinkel, 1975.

1.6 Funções das poliaminas

Em pH fisiológico, as poliaminas encontram-se totalmente protonadas, implicando em seu caráter fortemente básico, o qual possibilita a sua interação com ânions. Essa interação eletrostática 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 (PATOCKA and KUEHN, 2000; TABOR and TABOR, 1984; URDIALES et al., 2001; WILLIAMS, 1997).

Sendo assim, as poliaminas destacam-se na: modulação do crescimento, diferenciação celular (TABOR and TABOR, 1984), apoptose (THOMAS and THOMAS, 2001) estabilização do DNA e RNA (IGARASHI and KASHIWAGI, 2000), regulação da expressão gênica (CELANO et al., 1989), síntese de proteínas (LENZEN et al., 1986; YOSHIDA et al., 1999), sinalização celular (BACHRACH et al., 2001; JOHNSON and MCCORMACK, 1999) e diminuição da lipoperoxidação (BELLÉ et al., 2004).

Alguns estudos também apontam as poliaminas como importantes neurotransmissores e neuromoduladores (ALEXANDER et al., 1992; CARTER, 1994; WILLIAMS et al., 1991). Isso deve-se ao fato de que as poliaminas são armazenadas em vesículas sinápticas e liberadas de maneira cálcio-dependente, seguindo um estímulo químico ou elétrico. Além disso, há um sistema de alta afinidade para a recaptação de poliaminas que regulam o seu nível extracelular e o tempo do seu efeito (WILLIAMS, 1997; WILLIAMS et al., 1991; WILLIAMS et al., 1989). Também está descrito que as poliaminas estão envolvidas nos processos de aprendizado e memória, como será relatado posteriormente no item 1.8 desta introdução.

1.7 Metabolismo das poliaminas

Os níveis intracelulares de poliaminas podem ser regulados por mecanismos envolvendo três passos no seu metabolismo: síntese de novo, rota de interconversão e catabolismo (SEILER, 2004).

As poliaminas endógenas são sintetizadas no organismo a partir do seu principal precursor, o aminoácido ornitina (CARTER, 1994), ou ainda podem ser

obtidos através da flora gastrintestinal, que é capaz de metabolizar aminoácidos provenientes da dieta (TETI et al., 2002).

A ornitina pode ser originada 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 (CARTER, 1994). A elevação da concentração de ornitina no encéfalo causa, portanto, o aumento da formação das poliaminas (SEILER and SCHMIDT-GLENEWINKEL, 1975).

A putrescina é sintetizada pela descarboxilação da ornitina, numa reação catalisada pela ornitina descarboxilase (ODC) (MORGAN, 1999). Sendo assim, a putrescina serve como um precursor imediato da síntese de SPD e SPM. Esta síntese requer o grupamento aminopropil que é fornecido por duas enzimas: S-adenosilmetionina descarboxilase (SAMDC), que descarboxila a S-adenosilmetionina (SAM), e a espermidina sintase uma enzima que catalisa a transferência do grupamento aminopropil da SAM para a putrescina ou espermina sintase que catalisa a transferência de um segundo grupamento aminopropil para a SPD, formando a SPD e a SPM, respectivamente (Figura 5) (MARTON and PEGG, 1995).

Esta rota de síntese de proteínas é reversível, ou seja, a SPM pode ser convertida em SPD, e esta em putrescina. No ciclo de interconversão, ocorre uma acetilação da SPM ou SPD na posição N¹, catalisada pela enzima espermidina/espermina acetiltransferase (SSAT). Em seguida, a poliamina acetilada sofre quebra oxidativa por ação da enzima poliamina oxidase (PAO), liberando os grupamentos aminopropil provenientes da S-adenosilmetionina descarboxilase (SAM-D), para formar SPD e putrescina (MARTON and PEGG, 1995).

Estas reações de acetilação são fisiologicamente importantes, pois é uma maneira da célula diminuir a interação das poliaminas com diferentes poliânions. Um aumento ou diminuição na excreção de poliaminas acetiladas é um dos mecanismos de controle das concentrações intracelulares de poliaminas (MOINARD et al., 2005; MORGAN, 1999).

As três enzimas que regulam a biosíntese de poliaminas são ODC, SAMDC e SSAT. A atividade destas enzimas regulam os três passos do metabolismo das poliaminas: síntese, rota de interconversão e catabolismo (MORGAN, 1999; SEILER, 2004; SEILER and RAUL, 2005).

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

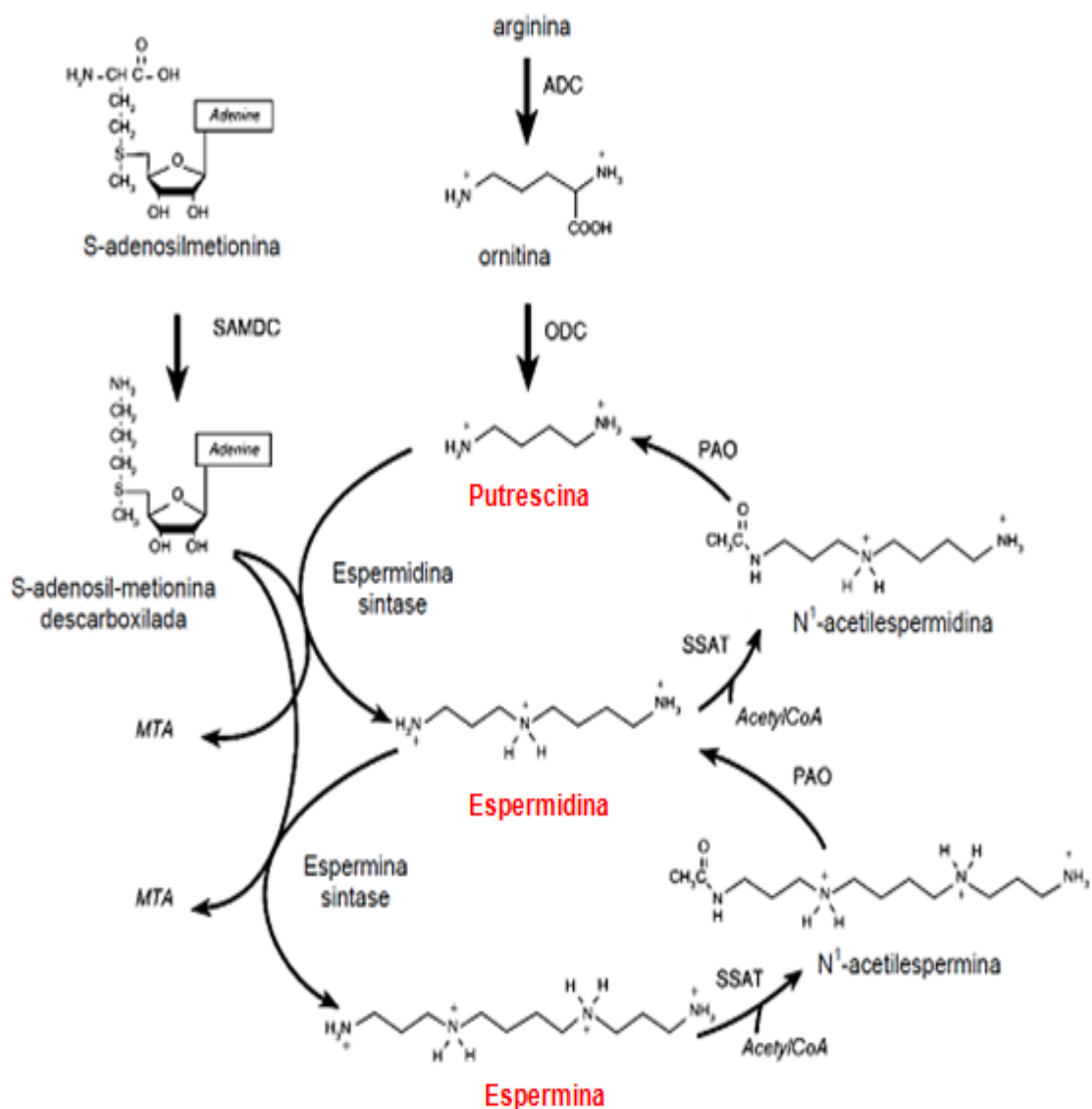


Figura 5. Metabolismo das poliaminas. Arginina descarboxilase (ADC); ornitina descarboxilase (ODC); S-adenosil-metionina descarboxilase (SAMDC); espermidina/espermina N¹ acetil-transferase (SSAT); poliamina oxidase (PAO); metiltioadenosina (MTA) (URDIALES et al., 2001).

1.8 Poliamina, NMDAr e memória

As poliaminas são importantes moduladores de alguns canais iônicos, podendo interagir com subtipos específicos de canais de K⁺ e receptores glutamatérgicos, incluindo o NMDAr (BURBAN et al.; GOMES et al., 2010; MASUKO et al., 2010; MONY et al., 2011; WILLIAMS, 2009).

Evidências indicam que muitos efeitos biológicos das poliaminas, tais como modulação de aprendizagem e de memória (KISHI et al., 1998a;b; RUBIN et al., 2004; RUBIN et al., 2000; RUBIN et al., 2001), envolvam a interação com o NMDAr (COUGHENOUR and BARR, 2001; GOMES et al., 2010; GUERRA et al., 2011; GUERRA et al., 2006; MARIANI et al., 2011; WALLACE, 2009).

Ramson e Stec mostraram que SPD e SPM aumentam a afinidade do NMDAr pelo MK-801, efeito constatado na presença ou na ausência de concentrações saturantes de glutamato e de glicina, sugerindo assim que o efeito estimulatório das poliaminas deve-se a sua ligação com o NMDAr (RANSOM and STEC, 1988).

As poliaminas atuam sobre o NMDAr de maneira bifásica, ou seja, em baixas concentrações potencializam a ligação do MK-801 no NMDAr, aumentando a condutância e a frequência de abertura do canal, enquanto que em altas concentrações inibem a ligação do MK-801. Estes efeitos podem ser mediados pela ligação das poliaminas em diferentes sítios de ligação no NMDAr (RANSOM and STEC, 1988; ROCK and MACDONALD, 1995; WILLIAMS, 1997; WILLIAMS et al., 1989).

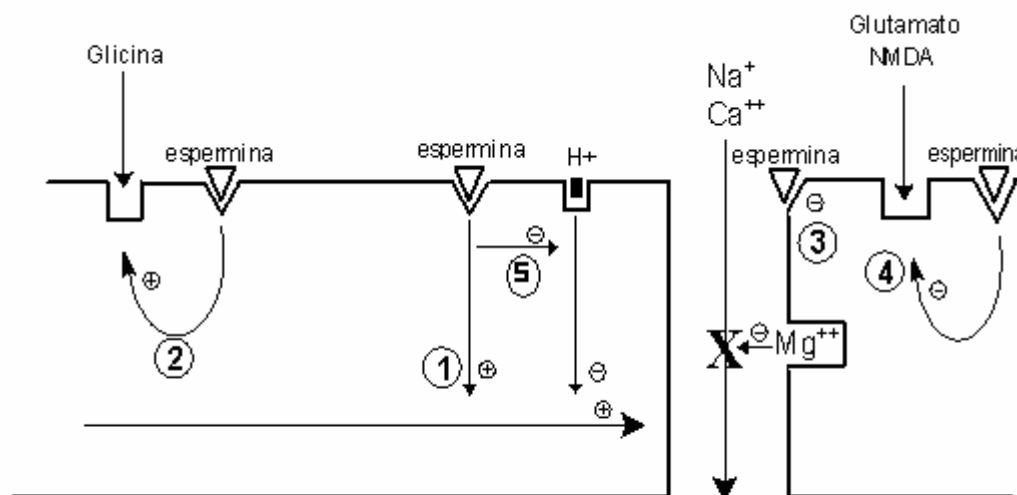
A ação das poliaminas sobre o NMDAr consiste em componentes estimulatórios e inibitórios. Quatro efeitos diferentes são propostos para a ação das poliaminas (Figura 6).

- 1- Estimulação independente de glicina: as poliaminas aumentam as correntes induzidas pelo glutamato na presença de concentrações saturantes de glicina.
- 2- Estimulação dependente de glicina: as poliaminas aumentam a afinidade do receptor pela glicina na presença de concentrações sub-saturantes de glicina.

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

4- Inibição da afinidade do receptor pelo glutamato.

EXTRACELULAR



INTRACELULAR

Figura 6. Esquema das ações modulatórias da espermina sobre o receptor NMDA (adaptado de Williams, 1997). (+) Ação estimulatória das poliaminas; (-) ação inibitória das poliaminas.

Alguns estudos tentaram esclarecer o mecanismo de ação das poliaminas, partindo da ideia de que os prótons extracelulares são potentes inibidores alostéricos do NMDAr, e pequenas variações no pH extracelular podem impactar significativamente nas amplitudes deste receptor. Sendo assim, estes estudos demonstraram que a SPM é capaz de potencializar as subunidades NR2B do NMDAr, através da inibição tônica de prótons (indicado pelo número 5 na figura 6) (TRAYNELIS et al., 1995).

Estudos bioquímicos e eletrofisiológicos recentes sugerem um mecanismo de modulação alostérica positiva das poliaminas no NMDAr. As poliaminas ligam-se a uma interface dos domínios das subunidades N-terminais (DNT) entre os dímeros NR1 e NR2B, através de interações com resíduos b6-b8 de ambas as subunidades. Isso é baseada no fato de que as poliaminas agem estabilizando as cargas negativas presentes nos DNT dos lobos inferiores dos dímeros, impedindo o

fechamento do DNT. Observou-se também que a potenciação induzida pela SPM aumenta significativamente com a diminuição do pH extracelular. Bem como, o NMDAr que contém as subunidades NR2B é fortemente potencializado (Oito vezes) no pH ácido, enquanto o NMDAr que contém as subunidades NR2A, NR2C e NR2D não foram potencializadas (MONY et al., 2011).

Além disso, estudos demonstraram que a administração sistêmica (CAMERA et al., 2007), intra-hipocampal (BERLESE et al., 2005; GOMES et al., 2010; GUERRA et al., 2006; RUBIN et al., 2000) e intra-amígdala (RUBIN et al., 2004; RUBIN et al., 2001) de SPD, melhorou o desempenho de ratos em tarefas como a esquiva inibitória, medo condicionado, reconhecimento social (CAMERA et al., 2007; MIKOLAJCZAK et al., 2002) e facilitou a extinção de memória (GOMES et al., 2010).

O efeito facilitador da SPD na memória parece depender da ativação do óxido nítrico sintase (GUERRA et al., 2006) da PKA e da CREB no hipocampo de ratos (GUERRA et al., 2011) bem como, da ativação seqüencial de vias da PKC e da PKA/CREB (GUERRA et al., 2012).

Também é notável que os efeitos facilitadores da SPD na memória são antagonizados por quantidades diminutas de arcaína, um antagonista do sítio de ligação das poliaminas no NMDAr (RUBIN et al., 2004; RUBIN et al., 2000; RUBIN et al., 2001). A arcaína é um análogo das poliaminas, composta por uma cadeia carbonada. Nas extremidades de cada cadeia carbonada, possui grupamentos amino e uma molécula de ácido sulfúrico (Figura 7) (REYNOLDS, 1990).

A administração sistêmica e intra-amígdala de arcaína em doses mais altas do que as necessárias para bloquear os efeitos facilitadores da SPD, prejudica a memória na tarefa de esquiva inibitória (CERETTA et al., 2008; RUBIN et al., 2001) e condicionamento do medo ao contexto (CAMERA et al., 2007; RUBIN et al., 2004), sugerindo a modulação das poliaminas no processamento da memória através do NMDAr.

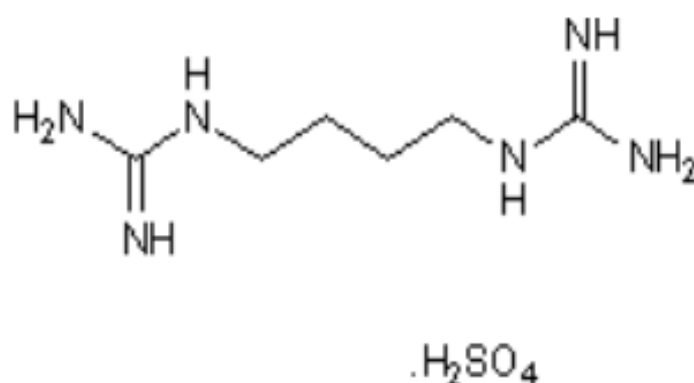


Figura 7. Estrutura química da arcaína (REYNOLDS, 1990).

1.9 Persistência da memória

Recentemente foi descrita por Bekinschtein e colaboradores (2007), uma nova fase de consolidação, denominada de persistência da memória (Figura 8). Na fase da persistência da memória ocorrem eventos cruciais 12h após a aquisição de uma nova informação, na qual a síntese de novas proteínas e do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) são essenciais (BEKINSCHTEIN et al., 2007). Esta nova fase permite a transferência de informações da região CA1 do hipocampo para a região do neocórtex, conduzindo o processo de manutenção das memórias (BEKINSCHTEIN et al., 2007).

Alguns estudos demonstraram que, a administração 12h pós-treino de anisomicina, um inibidor de síntese protéica, não alterou a retenção da memória de dois dias, mas causou uma severa amnésia quando os animais foram testados uma semana após o treino na tarefa de esquivas inibitória e no condicionamento de medo ao contexto. Estes experimentos indicam o envolvimento tardio de síntese protéica e de BDNF no hipocampo de ratos (BEKINSCHTEIN et al., 2007). Em 2008, Bekinschtein e colaboradores, também utilizando experimentos com a tarefa de esquivas passivas, constataram que o BDNF é uma molécula chave envolvida na manutenção do traço de memória (BEKINSCHTEIN et al., 2008).

A persistência da memória também parece envolver o aumento da fosforilação de algumas quinases: MAPK, quinase regulada por sinais extracelulares (ERK) (BEKINSCHTEIN et al., 2007; BEKINSCHTEIN et al., 2008), PKA (ROSSATO et al.,

2009) e CREB (TAUBENFELD et al., 2001). Bem como, parece envolver um aumento tardio, da CamKII (BEKINSCHTEIN et al., 2010; IGAZ et al., 2004), ERK2 (BEKINSCHTEIN et al., 2010; IGAZ et al., 2004), proteína Homer 1a (BEKINSCHTEIN et al., 2010; IGAZ et al., 2004), e dos fatores de transcrição como c-Fos (BEKINSCHTEIN et al., 2007; BEKINSCHTEIN et al., 2010) e Zif268 (BEKINSCHTEIN et al., 2007).

Também foi proposto que o sistema dopaminérgico e o NMDAr, estão envolvidos no estabelecimento da persistência da memória. A administração 12h pós-treino na área tegmental ventral, do antagonista do NMDAr, o AP5, prejudicou a persistência da memória. No entanto, a infusão do agonista do NMDAr, o NMDA, melhorou a persistência da memória em ratos (ROSSATO et al., 2009).

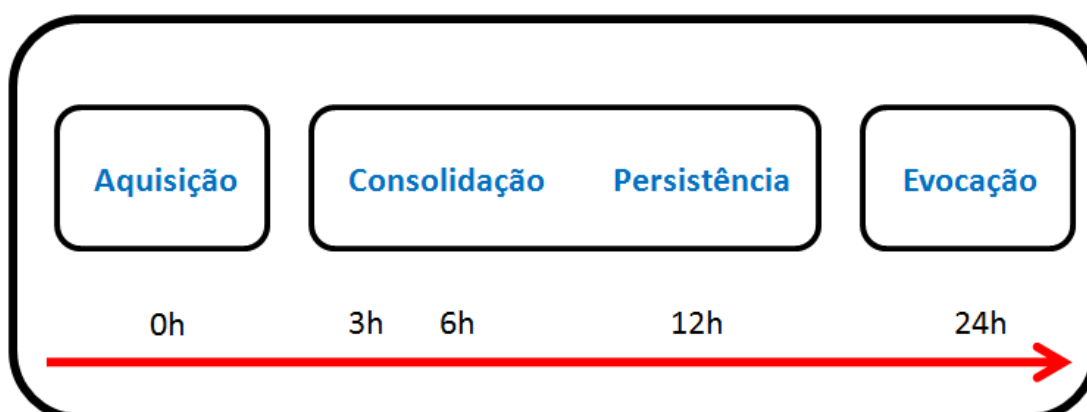


Figura 8. Diferentes fases da memória. O processamento da memória inicia com a aquisição de novas informações, que acontece durante o aprendizado. Logo após a aquisição, começa a fase de consolidação/armazenamento. Em torno de 12h após a aquisição, inicia a fase de persistência da memória. E por fim, as novas informações passam pela fase da evocação/recordação da memória. Fonte: Adaptado de Parfitt e colaboradores (PARFITT et al., 2012).

1.10 BDNF e persistência da memória

O BDNF consiste em uma pequena proteína dimérica, amplamente expresso no cérebro de mamíferos adultos, e estruturalmente relacionado com o fator de crescimento dos neurônios (MURER et al., 2001). Desempenha funções importantes

no SNC, como regulação da memória a longo prazo (BEKINSCHTEIN et al., 2008), proteção da degeneração neuronal (LINDHOLM et al., 1993), e da diferenciação do hipocampo e dos neurônios corticais (CROLL et al., 1994; MARTY et al., 1996).

Recentemente estudos demonstraram que 12h, mas não em 9 ou 24h após um treinamento na esQUIVA inibitória, há um aumento significativo na expressão de BDNF no hipocampo de ratos (BEKINSCHTEIN et al., 2007). Em seguida, observou-se que a administração intra-hipocampal de anisomicina ou do anticorpo anti-BDNF 12h, mas não em 9 ou 24h após o treinamento, prejudicou a MLD quando os ratos foram testados no sétimo dias após o treino (BEKINSCHTEIN et al., 2007).

Para confirmação do essencial papel do BDNF na persistência da memória, verificaram a expressão deste, através da infusão intra-hipocampal do BDNF oligonucleotídeo antisense (BDNF ASO), que antagoniza o seu efeito. Observaram que, no período crítico de 12h após a infusão do BDNF ASO, ocorreu uma redução em torno de 56% da expressão do BDNF em hipocampo de ratos. Assim como, na tarefa comportamental da esQUIVA inibitória, o BDNF ASO, diminuiu a persistência da memória dos animais testados no sétimo dia após o treinamento (BEKINSCHTEIN et al., 2007).

Além disso, dando maior suporte ao essencial papel do BDNF na persistência da memória, outros experimentos relataram que o BDNF exógeno administrado intra-hipocampal 12h após o treinamento, foi capaz de reverter a amnésia do sétimo dia induzida tanto pelo BDNF ASO (BEKINSCHTEIN et al., 2007) quanto pela anisomicina (BEKINSCHTEIN et al., 2008).

Em conjunto, estes resultados sugerem que o BDNF é uma proteína chave requerida durante uma janela de tempo limitada, em torno de 12h após a aquisição da memória (BEKINSCHTEIN et al., 2007; BEKINSCHTEIN et al., 2008). Também é proposto que a indução da expressão do BDNF no crítico tempo de 12h, é importante para a iniciação de uma cascata de eventos moleculares e celulares que levam à remodelação e crescimento de novas conexões sinápticas que estão envolvidas nas várias formas de MLD (BARCO et al., 2006; LAMPRECHT and LEDOUX, 2004).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar o efeito da administração sistêmica de espermidina sobre o processo de persistência da memória, na tarefa de medo condicionado contextual.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Avaliar se a administração sistêmica de espermidina altera a persistência da memória, na tarefa de medo condicionado contextual.

2.2.2 Avaliar se a administração sistêmica de arcaína altera a persistência da memória, na tarefa de medo condicionado contextual.

2.2.3 Avaliar o envolvimento dos receptores NMDA sobre a persistência da memória, na tarefa de medo condicionado contextual.

3. MANUSCRITO

Spermidine improves fear memory persistence

Cristiane Signor ^a, Carlos Fernando Mello ^{b, 1}, Gerusa Paz Porto ^b, Daniela Aymone Ribeiro ^a, Maribel Antonello Rubin ^{a,*, 1}

^aGraduation Program in Biological Sciences: Toxicologic Biochemistry, Center of Exact and Natural Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

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

* Corresponding author. Fax: + 55 55 3220 8978.

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

¹ These authors contributed equally to this work.

ABSTRACT

Persistence is the most characteristic attribute of long-term memory (LTM). For memory persistence, a new event of consolidation is necessary, 12 hours after the acquisition. The N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAr) is involved in the persistence of memory. Spermidine is an endogenous polyamine that modulates NMDAr function, and has been reported to facilitate memory formation. In the current study we investigated whether spermidine and arcaine, antagonist of polyamines binding site of NMDAr, alter the persistence of the memory of contextual fear-conditioning task in rats. While 12 hours post-training administration of spermidine (3, 10 and 30 mg/kg, i.p.) facilitated, arcaine (10 mg/kg, i.p.) impaired the memory of fear assessed 2 and 7 days after training. Arcaine (0.1 mg/kg) prevented the facilitatory effect of spermidine (10 mg/kg, i.p.), and spermidine (1 mg/kg), prevented the memory impairment induced by arcaine (10 mg/kg, i.p.) when tested 2 and 7 days after training. These results suggest that endogenous polyamines improve the formation and the persistence of fear memory.

Keywords: Polyamines; Spermidine; Arcaine; NMDA receptor; Memory persistence; Fear conditioning.

1. Introduction

Several lines of evidence suggest that memories are initially fragile, but become more stable with time. In other words, memory takes time to stabilize or consolidate (McGaugh, 1966; McGaugh, 2000).

Memories may last for hours (short-term memory, STM), days, weeks, and even a lifetime (long-term memory, LTM). LTM requires, whereas STM does not, a gene expression and protein synthesis-dependent stabilization process, named consolidation, that takes place in restricted areas of the brain, particularly in the hippocampus (Alberini, 2005; Alonso, Vianna, Depino, Pereira, and Szapiro, 2002). Depending on the strength and/or saliency of the information to be remembered, consolidated LTMs can persist for just 24–48 hours or for many days or weeks (Anagnostaras, Maren, and Fanselow, 1999; Barco, Bailey, and Kandel, 2006). Little is known, however, about the neurochemical mechanisms that occur for several hours or days after learning, and mediate memory persistence. Current evidence suggests that it depends on a new event of consolidation, which occurs 12 hours after the acquisition. During this phase, *de novo* synthesis of proteins, particularly of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), seems to be required (Bekinschtein, Cammarota, Igaz, Bevilaqua, Izquierdo, and Medina, 2007). In addition, pharmacological manipulation that facilitates memory persistence during this period also increases mitogen activated kinases (MAPKs) and extracellular signal-regulated kinase (ERK) phosphorylation, as well as the synthesis of transcription factors Zif268 and c-Fos (Bekinschtein et al., 2007; Bekinschtein, Cammarota, Igaz, Rossato, Izquierdo, Medina, Goldin, Katche, and 2008). In this regard, delayed (12 hours post-training) activation of dopamine and N-

methyl-D-aspartate receptors (NMDAr), as well as the cAMP-dependent protein kinase (PKA), are also required for memory persistence (Rossato, Bevilaqua, Iván Izquierdo, Medina, and Cammarota, 2009).

Polyamines are known to modulate learning and memory by interacting with the polyamine-binding site at the NMDAr (Gupta, Zhang, and Liu, 2012; Kishi, Ohno, and Watanabe, 1998a; b; Rubin, Berlese, Stiegemeier, Volkweis, Oliveira, dos Santos, Fenili, and Mello, 2004; Rubin, Boemo, Jurach, Rojas, Zanolla, Obregon, Souza, and Mello, 2000; Rubin, Stiegemeier, Volkweis, Oliveira, Fenili, Boemo, Jurach, and Mello, 2001). Accordingly, the systemic (Camera, Mello, Ceretta, and Rubin, 2007), intrahippocampal (Berlese, Sauzem, Carati, Guerra, Stiegemeier, Mello, and Rubin, 2005; Gomes, Mello, Rosa, Bochi, Ferreira, Barron, and Rubin, 2010; Guerra, Mello, Sauzem, Berlese, Furian, Tabarelli, and Rubin, 2006; Rubin et al., 2000), and intra-amygdalar (Rubin et al., 2004; Rubin et al., 2001) administration of spermidine improves the performance of rats in tasks such as inhibitory avoidance, fear conditioning, social recognition (Camera et al., 2007; Mikolajczak, Okulicz-Kozaryn, Kaminska, Niedopad, Polanska, and Gebka, 2002) and facilitates memory extinction (Gomes et al., 2010). In line with this view, the administration of arcaine, an antagonist of the polyamine binding site at the NMDAr, impairs the memory of inhibitory avoidance (Ceretta, Camera, Mello, and Rubin, 2008; Rubin et al., 2001) and fear conditioning tasks (Camera et al., 2007; Rubin et al., 2004), suggesting that endogenous polyamines physiologically modulate memory processing.

However, despite growing evidence suggesting a role for polyamines in learning and memory processes, no study has addressed whether polyamines alter memory persistence. Therefore, in the current study we investigated the effect of the systemic administration of spermidine and arcaine on the fear memory persistence in rats.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

A total of 320 experimentally naive male Wistar rats (180–280 g), from the animal house of the Federal University of Santa Maria were used. The animals were housed four to a cage on a 12-h day/night cycle (lights on at 7:00 A.M.) at a temperature of 21°C with water and standard laboratory chow (Guabi, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil) *ad libitum*. All experimental procedures were conducted in accordance with the policies on the use of animals and humans in neuroscience research, revised and approved by the Society for Neuroscience Research in January 1995 and with the institutional and national regulations for animal research (process 068/2011).

2.2. Drugs

N-(3-aminopropyl)-1,4-butanediamine trihydrochloride (spermidine) was obtained from Sigma-Aldrich Co (St. Louis, MO, USA); 1,4-Diguanidinobutane sulfate (arcaine) was obtained from Pfaltz & Bauer (Waterbury, CT, USA). All

drug solutions were prepared daily in saline (0.9% NaCl) and injections were performed intraperitoneally (i.p.) in a 1-ml/kg injection volume. Doses were selected based on previous studies (Camera et al., 2007) and pilot experiments.

2.3. Apparatus

Contextual fear training and testing took place in an identical observation chamber (30x25x25 cm), located in a well-lit room. The front and ceiling walls of the chamber were made of clear acrylic plastic, whereas the lateral and rear walls were made of opaque plastic. The floor of the chamber consisted of 32 stainless steel rods (3 mm diameter), spaced 1 cm apart and wired to a shock generator. The cage was cleaned with 30% ethyl alcohol before and after each rat occupied it.

2.4. Behavioral and infusion procedures

Each animal was subjected to a single fear conditioning training session as described by Rubin et al. (2004) with some modifications. In brief, the rat was placed in the conditioning chamber and habituated to the apparatus for 3 min. The context constituted the conditioned stimulus (CS), which was followed immediately by an unconditioned stimulus (US), three shocks (US; 1 s-0.4-mA footshock), which were 40 s apart. After the last CS/US pairing, rats were allowed to stay in the chamber for additional 60 s before returning to their home cages. The animals received 12 hours post-training, an intraperitoneal injection of vehicle, spermidine (0.1-30 mg/kg), or arcaïne (0.1-10 mg/kg). In order to

investigate whether arcaine prevents the facilitatory effect of spermidine on the persistence of memory, the animals were injected 11:30 hours post-training with arcaine (0.1 mg/kg, i.p.) and, 12 hours post-training, with spermidine (10 mg/kg) in different flanks. In order to investigate whether spermidine prevents the impairment of memory persistence induced by arcaine, the animals were injected 11:30 hours post-training with spermidine (1 mg/kg, i.p.) and 12 hours post-training with arcaine (10 mg/kg, i.p.) in different flanks.

Two or seven days after training, each rat was placed back in the conditioning chamber and an 8-min test session was performed. During this time, no shock was given, and every 4 s an instantaneous observation of the rat was made to assess whether it was in freezing, or not. Behavior was judged as freezing if there was an absence of any visible movement, except for that required for breathing. The percentage of samples scored as freezing during this 8-min was taken as a contextual fear conditioning measure.

2.5. *Statistics*

Statistical analysis was carried out by one- or two-way analysis of variance (ANOVA), depending on the experimental design. Data were subjected to arc sin transformation before analysis, in order to meet the assumptions for ANOVA. Post hoc analyses were carried out by the Student–Newman–Keuls test, when indicated. A $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results

Figs. 1A and 1B show the effect of the administration of spermidine (0.1-30 mg/kg, i.p., 12 hours post-training) on the memory of fear assessed 2 or 7 days after training, respectively. Statistical analysis (one-way ANOVA) revealed that spermidine, at the doses of 3, 10 and 30 mg/kg, increased the freezing scores of animals tested at 2 days [$F_{6,28} = 27.42$, $p < 0.05$, Fig. 1A] and 7 days after training [$F_{6,56} = 5.705$, $p < 0.05$, Fig. 1B].

Figs. 2A and 2B show the effect of the administration of arcaine (0.1-10 mg/kg, i.p., 12 hours post-training) on the memory of fear assessed 2 or 7 days after training, respectively. Statistical analysis (one-way ANOVA) revealed that arcaine, at the dose of 10 mg/kg, decreased the freezing scores of animals tested at 2 days [$F_{3,16} = 4.94$, $p < 0.05$, Fig. 2A] and 7 days after training [$F_{3,36} = 3.61$, $p < 0.05$, Fig. 2B].

Figs. 3A and 3B show the effect of arcaine (0.1 mg/kg) on spermidine-induced improvement of the memory of fear, assessed 2 or 7 days after training, respectively. Statistical analysis (two-way ANOVA) revealed a significant pretreatment (saline or arcaine) versus treatment (saline or spermidine) interaction at 2 days [$F_{1,16} = 14.18$, $p < 0.05$, Fig. 3A] and 7 days after training [$F_{1,56} = 5.47$, $p < 0.05$, Fig. 3B], indicating that arcaine prevented spermidine-induced increase of freezing scores.

Figs. 4A and 4B show the effect of spermidine (1 mg/kg) on arcaine-induced impairment of the memory of fear assessed 2 or 7 days after training, respectively. Statistical analysis (two-way ANOVA) showed a significant pretreatment (saline or spermidine) versus treatment (saline or arcaine) at 2 days [$F_{1,16} = 25.26$, $p < 0.05$, Fig. 4A] and 7 days after training [$F_{1,36} = 18.21$,

$p < 0.05$, Fig. 4B], revealing that spermidine prevented arcaine-induced decrease of freezing scores.

4. Discussion

In this study we showed that administration 12 hours after training of spermidine and arcaine respectively improved (Fig. 1) and impaired (Fig. 2) the persistence of memory of contextual fear conditioning. We also showed that arcaine, at doses which had no effect per se on memory, prevented the facilitatory effect of spermidine on the memory of fear assessed 2 and 7 days after training (Fig. 3). Accordingly, spermidine prevented the detrimental effect of arcaine on memory persistence (Fig. 4) assessed 2 and 7 days after training.

Current evidence suggests that systemic administration of spermidine immediately after training improves the context memory of fear (Camera et al., 2007). Moreover, the early post-training administration of arcaine, an antagonist of the polyamine binding site at the NMDA receptors, impairs the memory of inhibitory avoidance task (Rubin et al., 2001) and contextual fear conditioning (Camera et al., 2007; Rubin et al., 2004). Since the administration of spermidine six hours post-training does not alter the memory of inhibitory avoidance task (Berlese et al., 2005), it has been proposed that polyamines play a role in early stages of memory consolidation. Nevertheless, whether polyamines alter late stages of memory consolidation, related to persistence, it is still unknown. This question is particularly relevant, considering the existence evidence for a role of

polyamines as physiological modulators of NMDA receptors (Rubin et al., 2004; Rubin et al., 2001).

In this context, Shimizu et al. (2000) have shown that reactivation of CA1 NMDA receptors in the following days and week(s) after learning is crucial for the formation of the long term contextual fear memory (Shimizu, Tang, Rampon, and Tsien, 2000). These findings suggest that persistent activity of NMDAr for the first several days after training is important in establishing remote memories and are in agreement with the findings that LTM persistence requires NMDAr activation in the ventral tegmental area (VTA), late after training. Accordingly, the intra-VTA infusion of the NMDAr antagonist AP5, 12 hours after training, impairs long term memory at day 14, but not at day 2 post- training. Moreover, the intra-VTA infusion of NMDA 12 hours after training enhances long-term retention at day 14, but not at day 2 after training (Rossato et al., 2009). In line with this view, pharmacological manipulation with nicotinic and muscarinic antagonists and protein inhibitors 12 hours after training impairs inhibitory avoidance performance at day 7, but not at day 2, post-training (Parfitt, Campos, Barbosa, Koth, and Barros, 2012). These findings have led investigators to propose that, as a general rule, late molecular events that take place in the rat hippocampus 12 hours after acquisition of inhibitory avoidance memory affect memory persistence at 7–14 days but not at 2 days after training. Our experiments, however, revealed that 12 hours post-training injections of polyamine ligands altered memory at both day 2 and 7 after training, contradicting the previously published results with AP5 and NMDA (Rossato et al., 2009). A possible explanation of these results could be that spermidine and

arcaine respectively improves and impairs the formation of LTM (Berlese et al., 2005; Camera et al., 2007; Ceretta et al., 2008; Gomes et al., 2010; Guerra, Mello, Bochi, Pazini, Fachinetto, Dutra, Calixto, Ferreira, and Rubin, 2011; Guerra, Mello, Bochi, Pazini, Rosa, Ferreira, and Rubin, 2012; Guerra et al., 2006; Rosa, Mello, Camera, Ceretta, Ribeiro, Signor, and Rubin, 2012; Rubin et al., 2004; Rubin et al., 2000; Rubin et al., 2001). Notwithstanding, spermidine administration 6 hours after training does not alter the performance of rats at testing, performed 24 hours after training, in the inhibitory avoidance task (Berlese et al., 2005). Therefore, it seems unlikely that a delayed injection, such as the performed in the current study, improves the formation of LTM. As a consequence, our results do not seem to fit in the current behavioral models and interpretations that 12 hours after training injections do not alter the performance of the animals when they are tested 48 hours after training. The most striking difference between the current study and the literature is that we have used the context fear conditioning task, while most of the other studies have used the inhibitory avoidance task. Therefore, it is possible that, in some aspects, the use of different tasks may have contributed for the current data.

In summary, this study shows that spermidine and arcaine, polyamine binding site ligands at the NMDA receptor, respectively improves and impairs the persistence of memory of contextual fear conditioning. These findings suggest that polyamines modulate memory persistence, opening up a range of possibilities for further studies on the functions of polyamines, including the mechanisms by which spermidine facilitates memory persistence, which seems to involve the NMDA receptor, but are still unknown.

Acknowledgements

This study was supported by CNPq (306164/2010-8, 481664/2010-6, 476551/2009-9). C.F. Mello and M.A. Rubin are recipients of CNPq fellowships. C. Signor and D.A. Ribeiro are recipients of CAPES fellowships. All the experiments comply with the current laws of Brazil.

References

- Alberini, C. M. (2005). Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes *Trends Neurosci*, *28*, 51–56.
- Alonso, M., et al. (2002). BDNF-triggered events in the rat hippocampus are required for both short-and long-term memory formation. *Hippocampus*, *12*, 551–560.
- Anagnostaras, S. G., Maren, S., & Fanselow, M. S. (1999). Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: within subjects examination. *J Neurosci*, *19*, 1106–1114.
- Barco, A., Bailey, C. H., & Kandel, E. R. (2006). Common molecular mechanisms in explicit and implicit memory. *J Neurochem*, *97*, 1520–1533.
- Bekinschtein, P., et al. (2007). Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis-and BDNF-dependent phase in the hippocampus. *Neuron*, *53*, 261–277.
- Bekinschtein, P., et al. (2008). BDNF is essential to promote Persistence of long-term memory storage. *PNAS*, *105*, 2711-2716.
- Berlese, D. B., et al. (2005). Time-dependent modulation of inhibitory avoidance memory by spermidine in rats. *Neurobiol Learn Mem*, *83*, 48-53.
- Camera, K., et al. (2007). Systemic administration of polyaminergic agents modulate fear conditioning in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, *192*, 457-464.
- Ceretta, A. P., et al. (2008). Arcaine and MK-801 make recall state-dependent in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, *201*, 405-411.
- Gomes, G. M., et al. (2010). Polyaminergic agents modulate contextual fear extinction in rats. *Neurobiol Learn Mem*, *93*, 589-595.

- Guerra, G. P., et al. (2011). Hippocampal PKA/CREB pathway is involved in the improvement of memory induced by spermidine in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 96, 324–332.
- Guerra, G. P., et al. (2012). Spermidine-induced improvement of memory involves a cross-talk between protein kinases C and A. *Journal of Neurochemistry*, 122, 363–373.
- Guerra, G. P., et al. (2006). Nitric oxide is involved in the memory facilitation induced by spermidine in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 186, 150–158.
- Gupta, N., Zhang, H., & Liu, P. (2012). Chronic difluoromethylornithine treatment impairs spatial learning and memory in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 100, 464–473.
- Kishi, A., Ohno, M., & Watanabe, S. (1998a). Concurrent activation of hippocampal glycine and polyamine sites of the N-methyl-D-aspartate receptor synergistically reverses working memory deficits in rats. *Neurosci Lett*, 257, 131–134.
- Kishi, A., Ohno, M., & Watanabe, S. (1998b). Spermidine, a polyamine site agonist, attenuates working memory deficits caused by blockade of hippocampal muscarinic receptors and mGluRs in rats. *Brain Res*, 793, 311–314.
- McGaugh, J. L. (1966). Time-dependent processes in memory storage. *Science*, 8, 153:1351.
- McGaugh, J. L. (2000). Memory--a century of consolidation. *Science*, 287, 248–251.
- Mikolajczak, P., et al. (2002). Effects of acamprosate and some polyamine site ligands of NMDA receptor on short-term memory in rats. *European Journal of Pharmacology*, 444, 83–96.
- Parfitt, G. M., et al. (2012). Participation of hippocampal cholinergic system in memory persistence for inhibitory avoidance in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 97, 183–188.
- Rosa, M. M., et al. (2012). Opioid mechanisms are involved in the disruption of arcaine-induced amnesia by context pre-exposure. *Neurobiology of Learning and Memory*, 97, 294–300.
- Rossato, J. I., et al. (2009). Dopamine controls persistence of long-term memory storage. *Science*, 5943, 1017–1020.
- Rubin, M. A., et al. (2004). Intra-amygdala administration of polyamines modulates fear conditioning in rats. *J Neurosci*, 24, 2328–2334.
- Rubin, M. A., et al. (2000). Intrahippocampal spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. *Behavioural Pharmacology*, 11, 57–61.
- Rubin, M. A., et al. (2001). Intra-amygdala spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. *European Journal of Pharmacology*, 423, 35–39.
- Shimizu, E., et al. (2000). NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation. *Science*, 290, 1170–1174.

Figures and legends

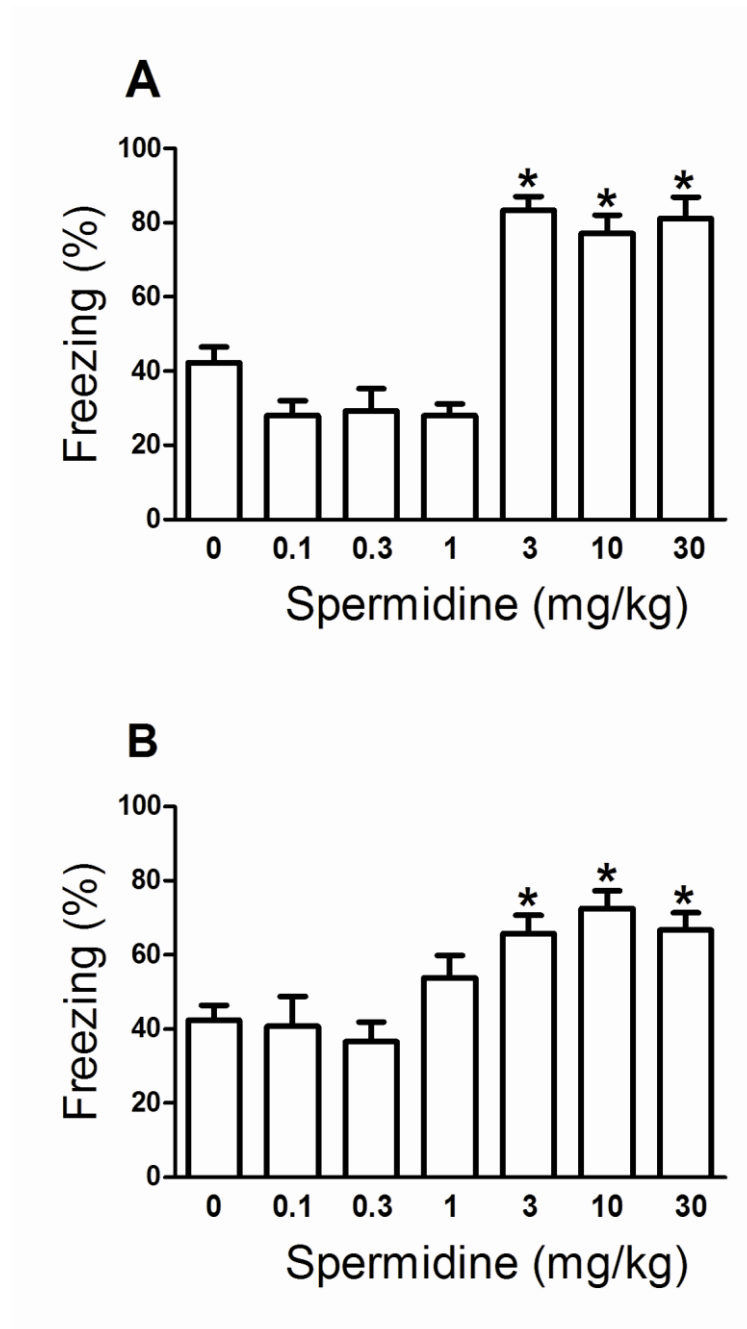


Fig. 1. Effect of 12 hours post-training intraperitoneal administration of spermidine on the memory of fear, assessed 2 (A) or 7 (B) days after training. * $p < 0.05$ compared with vehicle by the SNK. Data are the means+SEM of percentage of freezing for 5 (A) and 5-12 (B) animals in each group.

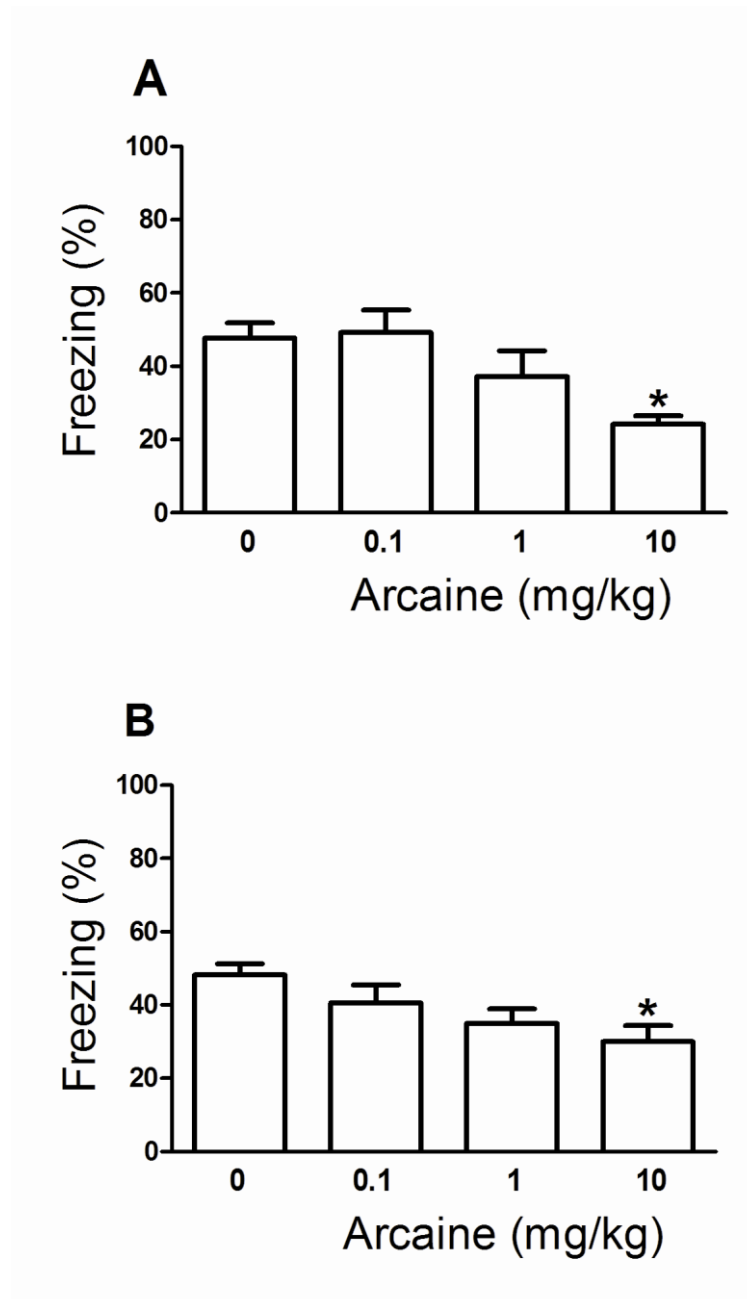


Fig. 2. Effect of 12 hours post-training arcaine on the memory of fear, assessed 2 (A) or 7 (B) days after training. * $p < 0.05$ compared with vehicle by the SNK. Data are the means+SEM of percentage freezing for 5 (A) and 10 (B) animals in each group.

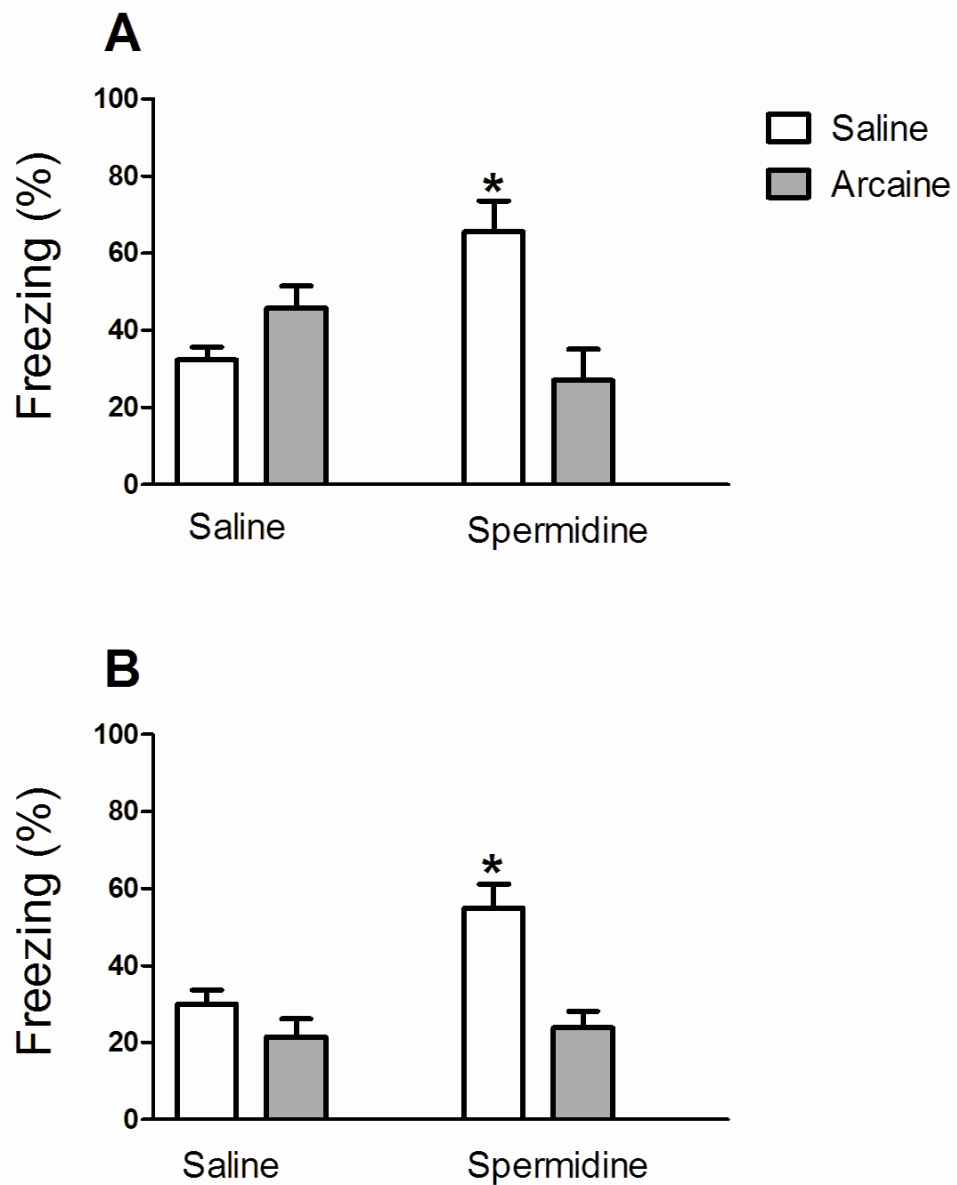


Fig. 3. Effect 11:30 hours post-training arcaine (0.1 mg/kg) and 12 hours post-training spermidine (10 mg/kg) on the memory of fear, assessed 2 (A) or 7 (B) days after training. * $p < 0.05$ compared with vehicle by the SNK. Data are the means+SEM of percentage of freezing for 5 (A) and 15 (B) animals in each group.

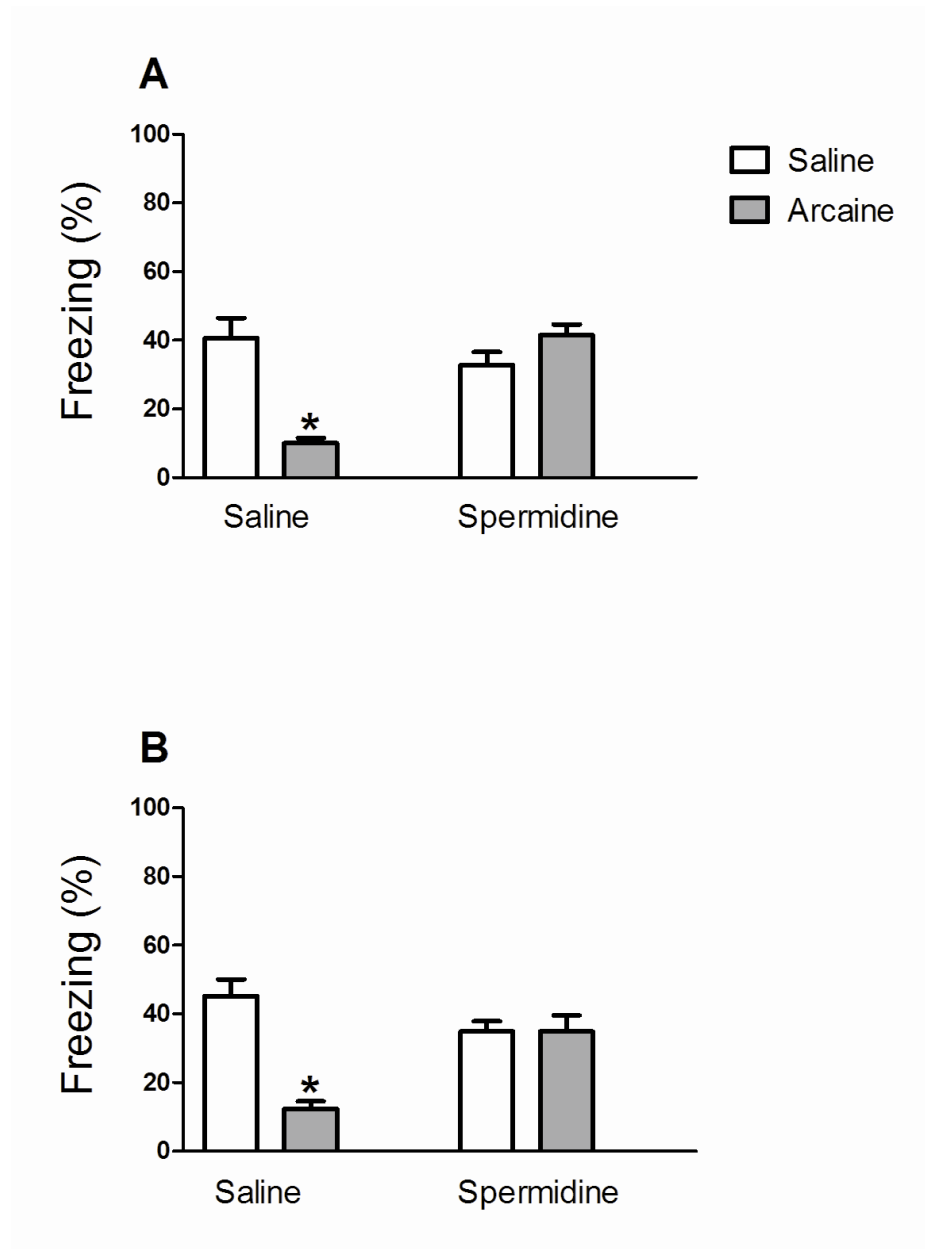


Fig. 4. Effect 11:30 hours post-training spermidine (1 mg/kg) and 12 hours post-training arcaine (10 mg/kg) on the memory of fear, assessed 2 (A) or 7 (B) days after training. * $p < 0.05$ compared with vehicle by the SNK. Data are the means+SEM of percentage of freezing, for 5 (A) and 10 (B) animals in each group.

4. CONCLUSÕES

4. CONCLUSÕES:

Com os resultados do presente estudo podemos concluir que:

1. A administração sistêmica de espermidina melhorou a persistência da memória em ratos, na tarefa de medo condicionado contextual.
2. A administração sistêmica de arcaína prejudicou a persistência da memória em ratos, na tarefa de medo condicionado contextual.
3. Sugerimos um envolvimento dos receptores NMDA na persistência da memória, na tarefa de medo condicionado contextual.

4.2 Conclusão geral

As poliaminas estão envolvidas com a persistência da memória em ratos.

5. PERSPECTIVAS DE CONTINUIDADE DO ESTUDO

5. PERSPECTIVAS DE CONTINUIDADE DO ESTUDO

Estudar o mecanismo de ação das poliaminas na persistência da memória.

5.1. Avaliar o efeito da administração intra-hipocampal de SPD na persistência da memória.

5.2. Avaliar o efeito da administração intra-hipocampal de ARC na persistência da memória.

5.3. Avaliar o efeito da administração intra-hipocampal de AP5 na persistência da memória.

5.4. Investigar envolvimento da atividade e expressão da PKA, CREB e do BDNF sobre o efeito das poliaminas na persistência da memória.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALBERINI, C. M. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes **Trends Neurosci**, 28, 51–56, 2005.

ALEXANDER, S. P. et al. Excitatory amino acid-induced phosphoinositide turnover in guinea pig cerebral cortical slices: selective enhancement by spermine of the response to DL-1-aminocyclopentane-trans-1,3-dicarboxylate. **J Neurochem**, 59, 610-615, 1992.

ALONSO, M. et al. ERK1/2 activation is necessary for BDNF to increase dendritic spine density in hippocampal CA1 pyramidal neurons. **Learn Mem**, 11, 172–178., 2004.

ANAGNOSTARAS, S. G. et al. Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances. **Hippocampus**, 11, 8–17, 2001.

ANAGNOSTARAS, S. G. et al. Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: within subjects examination. **J Neurosci**, 19, 1106–1114., 1999.

ANDERSON, D. J. et al. The actions of spermidine and spermine on the central nervous system. **Neuropharmacology**, 14, 571-577, 1975.

BACHRACH, U. et al. Polyamines: new cues in cellular signal transduction. **News Physiol Sci**, 16, 106-109, 2001.

BARCO, A. et al. Common molecular mechanisms in explicit and implicit memory. **J Neurochem**, 97, 1520–1533., 2006.

BEAR, M. F. et al. Neurociência: desvendando o sistema nervoso. **Artmed Editora S.A**, 2002.

BEKINSCHTEIN, P. et al. Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis-and BDNF-dependent phase in the hippocampus. **Neuron**, 53, 261–277, 2007.

BEKINSCHTEIN, P. et al. BDNF is essential to promote Persistence of long-term memory storage. **PNAS**, 105, 2711-2716, 2008.

BEKINSCHTEIN, P. et al. Persistence of Long-Term Memory Storage: New Insights into its Molecular Signatures in the Hippocampus and Related Structures. **Neurotox Res**, 18, 377–385, 2010.

BELLÉ, N. A. et al. Polyamines reduces lipid peroxidation induced by different pro-oxidant agents. **Brain Res**, 1008, 245-251, 2004.

BERLESE, D. B. et al. Time-dependent modulation of inhibitory avoidance memory by spermidine in rats. **Neurobiol Learn Mem**, 83, 48-53, 2005.

BLISS, T. V. COLLINGRIDGE, G. L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, 361, 31-39, 1993.

BONACCORSO, C. et al. Glutamate Binding-Site Ligands of NMDA Receptors. **Curr Med Chem**, 18, 5483-5506, 2011.

BURBAN, A. et al. Histamine potentiates N-methyl-D-aspartate receptors by interacting with an allosteric site distinct from the polyamine binding site. **J Pharmacol Exp Ther**, 332, 912-921,

BURGOS-ROBLES, A. et al. Consolidation of fear extinction requires NMDA receptor-dependent bursting in the ventromedial prefrontal cortex. **Neuron**, 53, 871-880, 2007.

BURWELL, R. D. et al. Perirhinal and Postrhinal Contributions to Remote Memory for Context. **The Journal of Neuroscience**, 24, 11023-11028, 2004.

CAMERA, K. et al. Systemic administration of polyaminergic agents modulate fear conditioning in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, 192, 457-464, 2007.

CAMMAROTA, M. et al. Parallel memory processing by the CA1 region of the dorsal hippocampus and the basolateral amygdala. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 105, 10279-10284, 2008.

CARTER, C. The neuropharmacology of polyamines. London: 1994. xiv, 318p.

CASTELLANO, C. et al. NMDA receptors and learning and memory processes. **Curr Drug Targets**, 2, 273-283, 2001.

CASTELLANO, C. et al. MK-801-induced disruptions of one-trial inhibitory avoidance are potentiated by stress and reversed by naltrexone. **Neurobiol Learn Mem**, 72, 215-229, 1999.

CELANO, P. et al. Polyamines differentially modulate the transcription of growth-associated genes in human colon carcinoma cells. **J Biol Chem**, 264, 8922-8927, 1989.

CERETTA, A. P. et al. Arcaine and MK-801 make recall state-dependent in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, 201, 405-411, 2008.

CESTARI, V., CASTELLANO, C. MK-801 potentiates morphine-induced impairment of memory consolidation in mice: involvement of dopaminergic mechanisms. **Psychopharmacology (Berl)**, 133, 1-6, 1997.

COFFINO, P. Regulation of cellular polyamines by antizyme. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 2, 188-194, 2001.

COUGHENOUR, L. L., BARR, B. M. Use of trifluoroperazine isolates a [(3)H]ifenprodil binding site in rat brain membranes with the pharmacology of the voltage-independent ifenprodil site on N-methyl-D-aspartate receptors containing NR2B subunits. **J Pharmacol Exp Ther**, 296, 150-159, 2001.

CROLL, S. D. et al. Regulation of neuropeptides in adult rat forebrain by the neurotrophins BDNF and NGF. **Eur. J. Neurosci**, 6, 1343-1353, 1994.

DAUMAS, S. et al. Encoding, consolidation and retrieval of contextual memory: differential involvement of dorsal CA3 and CA1 hippocampal subregions. **Learning & Memory**, 12, 75-82, 2005.

DAVIS, A. T. et al. Effect of enteral feeding bag composition and freezing and thawing upon vitamin stability in an enteral feeding solution. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, 10, 245-246, 1986.

DAVIS, R. H. Management of polyamine pools and the regulation of ornithine decarboxylase. **J Cell Biochem**, 44, 199-205, 1990.

DE LIMA, M. N. et al. Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. **Behav Brain Res**, 156, 139-143, 2005.

DILER, A. S. et al. Passage of spermidine across the blood-brain barrier in short recirculation periods following global cerebral ischemia: effects of mild hyperthermia. 43, 335-342, 2002.

EGERTON, A. et al. Glutamate and Psychosis Risk. **Curr Pharm Des**, 2011.

EICHENBAUM, H. The long and winding road to memory consolidation. **Nat Neurosci**, 4, 1057-1058, 2001.

FANSELOW, M. S. et al. Differential effects of selective opioid peptide antagonists on the acquisition of pavlovian fear conditioning. **Peptides**, 12, 1033-1037, 1991.

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

FLOOD, J. F. et al. Modulation of memory processing by glutamic acid receptor agonists and antagonists. **Brain Res**, 521, 197-202, 1990.

FLORES-SOTO, M. E. et al. Structure and function of NMDA-type glutamate receptor subunits. **Neurologia**, 2012.

GILMARTIN, M. R., HELMSTETTER, F. J. Trace and contextual fear conditioning require neural activity and NMDA receptor-dependent transmission in the medial prefrontal cortex. **Learn. Mem**, 17, 289-296, 2010.

GOMES, G. M. et al. Polyaminergic agents modulate contextual fear extinction in rats. **Neurobiol Learn Mem**, 93, 589-595, 2010.

GOOSENS, K. A., MAREN, S. Contextual and auditory fear conditioning are mediated by the lateral, basal, and central amygdaloid nuclei in rats. **Learning and Memory**, 8, 148-155, 2001.

GUERRA, G. P. et al. Hippocampal PKA/CREB pathway is involved in the improvement of memory induced by spermidine in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, 96, 324–332, 2011.

GUERRA, G. P. et al. Spermidine-induced improvement of memory involves a cross-talk between protein kinases C and A. **Journal of Neurochemistry** 122, 363–373, 2012.

GUERRA, G. P. et al. Nitric oxide is involved in the memory facilitation induced by spermidine in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, 186, 150-158, 2006.

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

GUIJARRO, J. Z. et al. Effects of brief and long maternal separations on the HPA axis activity and the performance of rats on context and tone fear conditioning. **Behav Brain Res**, 184, 101-108, 2007.

HALL, J. et al. Cellular imaging of zif268 expression in the hippocampus and amygdala during contextual and cued fear memory retrieval: selective activation of hippocampal CA1 neurons during the recall of contextual memories. **J. Neurosci**, 21, 2186 –2193, 2001.

HARTLEY, C. A. et al. Brain structure correlates of individual differences in the acquisition and inhibition of conditioned fear. **Cereb Cortex**, 21, 1954-1962, 2011.

HEDEGAARD, M. et al. Molecular pharmacology of human NMDA receptors. **Neurochem Int**, 2011.

HERTZEN, L. S. V., GIESE, K. P. Memory Reconsolidation Engages Only a Subset of Immediate-Early Genes Induced during Consolidation. **The Journal of Neuroscience**, 25, 1935–1942, 2005.

HOLMSTROM, L. et al. Responses to social vocalizations in the inferior colliculus of the mustached bat are influenced by secondary tuning curves. **J Neurophysiol**, 98, 3461-3472, 2007.

HU, N. W. et al. Glutamate receptors in preclinical research on Alzheimer's disease: Update on recent advances. **Pharmacol Biochem Behav**, 100, 855-862, 2011.

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

IGAZ, L. M. et al. One-trial aversive learning induces late changes in hippocampal CaMKIIalpha, Homer 1a, Syntaxin 1a and ERK2 protein levels. **Brain Res Mol Brain Res**, 1, 1-12, 2004.

INOUE, N. et al. Requirement of the immediate early gene vesl-1S/homer-1a for fear memory formation. **Mol Brain**, 5, 2-7, 2009.

IWATA, J., LEDOUX, J. E. Dissociation of associative and nonassociative concomitants of classical fear conditioning in the freely behaving rat. **Behav Neurosci**, 102, 66-76, 1988.

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

IZQUIERDO, I. et al. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. **Trends Neurosci**, 29, 496-505, 2006.

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

IZQUIERDO, I., MEDINA, J. H. The biochemistry of memory and its regulation by hormones and neuromodulators. **Psychobiology**, 25, 1-11, 1997a.

IZQUIERDO, I., MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiol Learn Mem**, 68, 285-316, 1997b.

JACKSON, A. et al. NMDA antagonists make learning and recall state-dependent. **Behav Pharmacol**, 3, 415-421, 1992.

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

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

KALAC P, K. P. A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods. . **Food Chem** 90, 219-230, 2005.

KALISCH, R. et al. The NMDA agonist D-cycloserine facilitates fear memory consolidation in humans. **Cereb Cortex**, 19, 187-196, 2009.

KANDEL, E. R. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. **Science**, 294, 1030-1038, 2001.

KERCHNER, G. A., NICOLL, R. A. Silent synapses and the emergence of a postsynaptic mechanism for LTP. **Nat Rev Neurosci**, 9, 813-825, 2008.

KIM, J. J., JUNG, M. W. Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: a critical review. **Neurosci Biobehav Rev**, 30, 188-202, 2006.

KISHI, A. et al. Concurrent activation of hippocampal glycine and polyamine sites of the N-methyl-D-aspartate receptor synergistically reverses working memory deficits in rats. **Neurosci Lett**, 257, 131-134, 1998a.

KISHI, A. et al. Spermidine, a polyamine site agonist, attenuates working memory deficits caused by blockade of hippocampal muscarinic receptors and mGluRs in rats. **Brain Res**, 793, 311-314, 1998b.

LAMPRECHT, R., LEDOUX, J. Structural plasticity and memory. **Nat Rev Neurosci**, 5, 45–54, 2004.

LEDOUX, J. Fear and the brain: where have we been, and where are we going? **Biol Psychiatry**, 44, 1229-1238, 1998.

LENZEN, S. et al. Interactions between spermine and Mg²⁺ on mitochondrial Ca²⁺ transport. **J Biol Chem**, 261, 16478-16483, 1986.

LINDHOLM, D. et al. Brain-derived neurotrophic factor is a survival factor for cultured rat cerebellar granule neurons and protects them against glutamate-induced neurotoxicity. **Eur. J. Neurosci**, 5, 1455–1464, 1993.

LIU, I. Y. et al. Brain Derived Neurotrophic Factor Plays a Critical Role in Contextual Fear Conditioning. *The Journal of Neuroscience*, 7958 –7963, 2004.

LIU, J. L. et al. A NMDA receptor antagonist, MK-801 impairs consolidating extinction of auditory conditioned fear responses in a Pavlovian model. **PLoS One**, 4, e7548, 2009.

LIU, R. et al. Determination of polyamines in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled with Q-TOF mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, 47, 1341–1346, 2012.

MAREN, S. Synaptic mechanisms of associative memory in the amygdala. **Neuron**, 47, 783-786, 2005.

MAREN, S. et al. NMDA receptors in the basolateral amygdala are required for both acquisition and expression of conditional fear in rats. **Behav. Neurosci**, 110, 1365–1374, 1996.

MARIANI, R. K. et al. Effect of naloxone and morphine on arcaine-induced state-dependent memory in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, 2011.

MARTON, L. J., PEGG, A. E. Polyamines as targets for therapeutic intervention. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, 35, 55-91, 1995.

MARTY, S. et al. Brain-derived neurotrophic factor promotes the differentiation of various hippocampal nonpyramidal neurons, including Cajal-Retzius cells, in organotypic slice cultures. **J. Neurosci**, 16, 675–687, 1996.

MASUKO, T. et al. Synthesis of water-soluble polyamine derivatives effective as N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, 58, 862-867, 2010.

MCGAUGH, J. L. Time-dependent processes in memory storage. **Science**, 8, 153:1351, 1966.

MCGAUGH, J. L. Memory--a century of consolidation. **Science**, 287, 248-251, 2000.

MCGAUGH, J. L., IZQUIERDO, I. The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. **Trends Pharmacol Sci**, 21, 208-210, 2000.

MEDINA, J. H. et al. Do memories consolidate to persist or do they persist to consolidate? **Behavioural Brain Research**, 192, 61–69, 2008.

MEYER, R. C. et al. Combined stimulation of the glycine and polyamine sites of the NMDA receptor attenuates NMDA blockade-induced learning deficits of rats in a 14-unit T-maze. **Psychopharmacology (Berl)**, 135, 290-295, 1998.

MIKOLAJCZAK, P. et al. Effects of acamprosate and some polyamine site ligands of NMDA receptor on short-term memory in rats. **Eur J Pharmacol**, 444, 83-96, 2002.

MOINARD, C. et al. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. **Clin Nutr**, 24, 184-197, 2005.

MONAGHAN, D. T., COTMAN, C. W. Distribution of N-methyl-D-aspartate-sensitive L-[3H]glutamate-binding sites in rat brain. **J Neurosci**, 5, 2909-2919, 1985.

MONY, L. et al. Molecular basis of positive allosteric modulation of GluN2B NMDA receptors by polyamines. **EMBO J**, 30, 3134-3146, 2011.

MONYER, H. et al. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. **Science**, 256, 1217-1221, 1992.

MORGAN, D. M. Polyamines. An overview. **Mol Biotechnol**, 11, 229-250, 1999.

MURER, M. G. et al. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. **Prog Neurobiol** 63, 71-124, 2001.

NEWPHER, T. M., EHLERS, M. D. Spine microdomains for postsynaptic signaling and plasticity. **Trends Cell Biol**, 19, 218-227, 2009.

NICHOLSON, A. M. et al. Membrane cholesterol modulates {beta}-amyloid-dependent tau cleavage by inducing changes in the membrane content and localization of N-methyl-D-aspartic acid receptors. **J Biol Chem**, 286, 976-986, 2011.

PARFITT, G. M. et al. Participation of hippocampal cholinergic system in memory persistence for inhibitory avoidance in rats. **Neurobiology of Learning and Memory** 97, 183-188, 2012.

PATOCKA, J., KUEHN, G. D. Natural polyamines and their biological consequence in mammals. **Acta Medica (Hradec Kralove)**, 43, 119-124, 2000.

QUEVEDO, J. et al. The N-methyl-D-aspartate receptor blocker MK-801 prevents the facilitatory effects of naloxone and epinephrine on retention of inhibitory avoidance task in rats. **Behav Pharmacol**, 8, 471-474, 1997.

QUINN, J. J. et al. Inverse temporal contributions of the dorsal hippocampus and medial prefrontal cortex to the expression of long-term fear memories. **Learn. Mem**, 15, 368-372, 2008.

RANGANATH, C., BLUMENFELD, R. S. Doubts about double dissociations between short- and long-term memory. **Trends Cogn Sci**, 9, 374-380, 2005.

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

RAYMOND, L. A. et al. Pathophysiology of Huntington's disease: time-dependent alterations in synaptic and receptor function. **Neuroscience**, 198, 252-273, 2011.

REYNOLDS, I. J. Arcaine uncovers dual interactions of polyamines with the N-methyl-D-aspartate receptor. **J Pharmacol Exp Ther**, 255, 1001-1007, 1990.

RIEDEL, G. et al. Glutamate receptor function in learning and memory. **Behav Brain Res**, 140, 1-47, 2003.

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

ROESLER, R. et al. NMDA receptors mediate consolidation of contextual memory in the hippocampus after context preexposure. **Neurochem Res**, 30, 1407-1411, 2005.

ROESLER, R. et al. Differential involvement of hippocampal and amygdalar NMDA receptors in contextual and aversive aspects of inhibitory avoidance memory in rats. **Brain Res**, 975, 207-213, 2003.

ROSEN, J. B. The Neurobiology of Conditioned and Unconditioned Fear: A Neurobehavioral System Analysis of the Amygdala. **Behavioral and Cognitive Neuroscience Reviews**, 3, 23-41, 2004.

ROSSATO, J. I. et al. Dopamine controls persistence of long-term memory storage. **Science**, 5943, 1017–1020, 2009.

RUBIN, M. A. et al. Intra-amygdala administration of polyamines modulates fear conditioning in rats. **J Neurosci**, 24, 2328-2334, 2004.

RUBIN, M. A. et al. Intrahippocampal spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. **Behav Pharmacol**, 11, 57-61, 2000.

RUBIN, M. A. et al. Intrahippocampal GMP administration improves inhibitory avoidance performance through GABAergic and glutamatergic mechanisms in rats. **Neuroreport**, 8, 3713-3716, 1997.

RUBIN, M. A. et al. Intra-amygdala spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. **Eur J Pharmacol**, 423, 35-39, 2001.

SACCHETTI, B. et al. Auditory Thalamus, Dorsal Hippocampus, Basolateral Amygdala, and Perirhinal Cortex Role in the Consolidation of Conditioned Freezing to Context and to Acoustic Conditioned Stimulus in the Rat. **The Journal of Neuroscience**, 19, 9570–9578, 1999.

SALMINA, A. B. et al. Perinatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury Affects the Glutamatergic Signal Transduction Coupled with Neuronal ADP-Ribosyl Cyclase Activity. **Bull Exp Biol Med**, 150, 583-586, 2011.

SALTER, M. W., PITCHER, G. M. Dysregulated Src upregulation of NMDA receptor activity: a common link in chronic pain and schizophrenia. **Febs J**, 279, 2-11, 2011.

- SANTINI, E. et al. Consolidation of extinction learning involves transfer from NMDA-independent to NMDA-dependent memory. **J Neurosci**, 21, 9009-9017, 2001.
- SCATTON, B. The NMDA receptor complex. **Fundam Clin Pharmacol**, 7, 389-400, 1993.
- SCHENBERG, E. E. et al. Effects of pre- or post-training entorhinal cortex AP5 injection on fear conditioning. **Physiol Behav**, 86, 508-515, 2005.
- SCHWARTZ, B. L. et al. d-Cycloserine enhances implicit memory in Alzheimer patients. **Neurology**, 46, 420-424, 1996.
- SEILER, N. Catabolism of polyamines. **Amino Acids**, 26, 217-233, 2004.
- SEILER, N., RAUL, F. Polyamines and apoptosis. **J Cell Mol Med**, 9, 623-642, 2005.
- SEILER, N., SCHMIDT-GLENEWINKEL, T. Regional distribution of putrescine, spermidine and spermine in relation to the distribution of RNA and DNA in the rat nervous system. **J Neurochem**, 24, 791-795, 1975.
- SHIN, W. W. et al. Limited blood-brain barrier transport of polyamines. **J Neurochem.**, 44, 1056-1059, 1985.
- SIGURDSSON, T. et al. Long-term potentiation in the amygdala: A cellular mechanism of fear learning and memory. **Neuropharmacology**, 2006.
- SQUIRE, L. R., KANDEL, E. R. Memória: da mente às moléculas. **Artmed Editora S.A.**, 2003.
- SUZUKI, A. et al. Upregulation of CREB-mediated transcription enhances both short- and long-term memory. **The Journal of Neuroscience**, 27, 1491-1498, 2011.
- TABOR, C. W., TABOR, H. P. Polyamines. **Annu Review Biochem**, 53, 749-790, 1984.
- TAUBENFELD, S. M. et al. Fornix-dependent induction of hippocampal CCAAT enhancer-binding protein [beta] and [delta] Co-localizes with phosphorylated cAMP response element-binding protein and accompanies long-term memory consolidation. **J Neurosci**, 1, 84-91, 2001.
- TETI, D. et al. Analysis of polyamines as markers of (patho)physiological conditions. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, 781, 107-149, 2002.

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

TRAYNELIS, S. F. et al. Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines. **Science**, 268, 873-876, 1995.

URDIALES, J. L. et al. Polyamine metabolism revisited. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, 13, 1015-1019, 2001.

WALLACE, H. M. The polyamines: past, present and future. **Essays Biochem**, 46, 1-9, 2009.

WANG, C. et al. Defining the molecular requirements for the selective delivery of polyamine conjugates into cells containing active polyamine transporters. **J Med Chem**, 46, 5129-5138, 2003.

WHETSELL, W. O., JR. Current concepts of excitotoxicity. **J Neuropathol Exp Neurol**, 55, 1-13, 1996.

WILLIAMS, K. Interactions of polyamines with ion channels. **Biochem J**, 325 (Pt 2), 289-297, 1997.

WILLIAMS, K. Extracellular Modulation of NMDA Receptors. 2009.

WILLIAMS, K. et al. Modulation of the NMDA receptor by polyamines. **Life Sci**, 48, 469-498, 1991.

WILLIAMS, K. et al. Effects of polyamines on the binding of [3H]MK-801 to the N-methyl-D-aspartate receptor: pharmacological evidence for the existence of a polyamine recognition site. **Mol Pharmacol**, 36, 575-581, 1989.

XIAOPING, G. et al. Involvement of the spinal NMDA receptor/PKCgamma signaling pathway in the development of bone cancer pain. **Brain Res**, 1335, 83-90, 2011.

YOSHIDA, M. et al. Polyamine stimulation of the synthesis of oligopeptide-binding protein (OppA). Involvement of a structural change of the Shine-Dalgarno sequence and the initiation codon aug in oppa mRNA. **J Biol Chem**, 274, 22723-22728, 1999.

ZIGMOND, M. J. et al. **Fundamental Neurocience, London: Academic Press.**, 1999.