



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

**AGENTES POLIAMINÉRGICOS MODULAM A
RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO EM
RATOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Daniela Aymone Ribeiro

**Santa Maria, RS, Brasil
2013**

AGENTES POLIAMINÉRGICOS MODULAM A RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO EM RATOS

Por

Daniela Aymone Ribeiro

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

Orientador: 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**

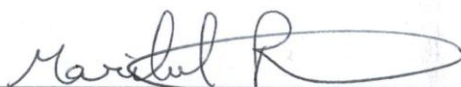
**A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação
de Mestrado**

**AGENTES POLIAMINÉRGICOS MODULAM A RECONSOLIDAÇÃO
DA MEMÓRIA DE MEDO EM RATOS**

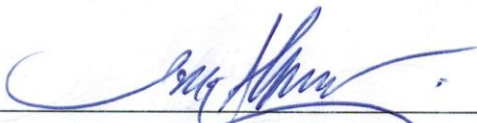
elaborada por
Daniela Aymone Ribeiro

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

COMISSÃO EXAMINADORA:



Profª. Drª. Maribel Antonello Rubin (UFSM)
Presidente/Orientadora



Prof. Dr. Jorge Alberto Quillfeldt (UFRGS)



Profª. Drª. Maria Rosa Chitolina Schetinger (UFSM)

Santa Maria, 19 de agosto de 2013.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por guiar meus caminhos e me dar forças nas horas mais difíceis.

Aos meus pais, Anete e Fernando e a minha avó Belchis, por acreditarem em mim e serem a base de meus princípios e formação profissional.

Ao meu namorado Miguel pelo amor, companheirismo, dedicação e paciência.

À professora Maribel e ao professor Carlos pela orientação, ensinamentos, ideias e apoio durante essa jornada.

Aos estimados colegas do Labneuro que de alguma maneira me ajudaram a crescer e ampliar meus conhecimentos ao longo desses anos.

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

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.

José de Alencar

RESUMO

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

AGENTES POLIAMINÉRGICOS MODULAM A RECONSOLIDAÇÃO DA MEMÓRIA DE MEDO EM RATOS

Autora: Daniela Aymone Ribeiro
Orientadora: Maribel Antonello Rubin
Local e data da Defesa: Santa Maria, 19 de agosto de 2013.

A memória pode ser estudada de acordo com as suas fases, que são a aquisição, a consolidação e a evocação. As memórias, uma vez consolidadas, não podem mais ser modificadas, porém quando reativadas, ou seja, quando recuperadas, muitas destas voltam a se tornar instáveis e vulneráveis e para que persistam precisam passar por um novo processo de estabilização, chamado reconsolidação. Têm sido descrito que as poliaminas endógenas, espermidina e espermina, que se ligam e modulam a atividade do receptor NMDA, estão envolvidas na aquisição e na consolidação da memória. Contudo, não há trabalhos mostrando o efeito destas substâncias na reconsolidação da memória. Desta forma, o objetivo deste estudo foi verificar o efeito das poliaminas na reconsolidação da memória de medo em ratos. Para isso, ratos machos adultos foram treinados na tarefa de medo condicionado contextual, onde receberam três choques de 0,4 mA, com intervalo de 40 seg entre cada choque e, 24 horas após, os animais foram recolocados no aparelho do treino por um período de 3 min, na ausência de choque, para reativar a memória. Após a reativação foi administrado, pela via intraperitoneal, salina, espermidina (1-30 mg/kg), arcaína (0,1-10 mg/kg) ou espermidina mais arcaína e vinte e quatro horas após, os animais foram testados, onde foi avaliado a imobilidade destes durante 6 min. Foram realizados experimentos controles para avaliar a especificidade das drogas no processo de reconsolidação. Além disso, foi avaliado se o possível efeito da arcaína na reconsolidação poderia ser explicado por dependência de estado. Assim, enquanto a espermidina (3 e 10 mg/kg) melhorou, a arcaína (1 e 10 mg/kg) piorou a reconsolidação da memória. Estas drogas não tiveram efeito sobre a memória quando foram administradas na ausência da reativação ou 6 horas após. A arcaína (0,1 mg/kg) preveniu a melhora da reconsolidação da memória induzida pela espermidina (3 mg/kg) e por sua vez, a espermidina (1 mg/kg) preveniu o prejuízo da reconsolidação da memória induzido pela arcaína (10 mg/kg). O efeito amnésico da arcaína não foi revertido pela administração da mesma dose de arcaína antes do teste, descartando a hipótese de dependência de estado para o efeito da arcaína na reconsolidação. Estes resultados sugerem que a administração sistêmica dos ligantes do sítio de ligação das poliaminas do receptor NMDA modulam a reconsolidação da memória, todavia são necessários mais estudos a fim de elucidar o mecanismo pelo qual as poliaminas modulam a reconsolidação da memória.

Palavras-chave: Memória. Reconsolidação. Receptor NMDA. Espermidina. Arcaína. Medo condicionado contextual.

ABSTRACT

Dissertation of Master's degree
Graduation Program in Biological Sciences:
Toxicologic Biochemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil
**POLYAMINERGIC AGENTS MODULATE THE FEAR MEMORY
RECONSOLIDATION IN RATS**

Author: Daniela Aymone Ribeiro

Advisor: Maribel Antonello Rubin

Place and date of defense: Santa Maria, August 19th, 2013

The memory may be studied according with memory's phases, which is acquisition, consolidation and recall. Memories once consolidated, are no more susceptible to interventions, but when reactivated, some of these memories again become labile and vulnerable, and to persist need to have a new stabilization process called reconsolidation. Previous studies described that endogenous polyamines, spermine and spermidine, which bind and modulate the activity of NMDA receptors are involved in memory acquisition and consolidation. However there are no studies showing the effect of these drugs on memory reconsolidation. Accordingly, the aim of this study was investigate the effect of polyamines on fear memory reconsolidation in rats. Male Wistar rats were trained in a fear conditioning apparatus using a 0.4 mA footshock as unconditioned stimulus. Twenty four hours after training, animals were re-exposed to the apparatus in the absence of shock (reactivation session). Immediately after the reactivation session, SPD (1–30 mg/kg, i.p.), the antagonist of the polyamine binding site at the NMDA receptor, arcaine (0.1–10 mg/kg, i.p.) or spermidine plus arcaine were injected, and the animals were tested in the same apparatus 24 h later. Freezing scores at testing were considered a measure of memory. While SPD (3 and 10 mg/kg) improved, arcaine (1 and 10 mg/kg) impaired memory reconsolidation. These drugs had no effect on memory if they were administered in the absence of reactivation, or 6 h after reactivation session. Arcaine (0.1 mg/kg, i.p.) prevented SPD (3 mg/kg)-induced improvement of memory reconsolidation. Accordingly, SPD (1 mg/kg) prevented arcaine (10 mg/kg)-induced impairment of memory reconsolidation. The amnesic effect of arcaine was not reversed by arcaine administration prior to test, ruling out state dependence in this effect. These results suggest that systemic administration of polyamine binding site ligands modulate memory reconsolidation, however further studies are required to elucidate the mechanism by which polyamines modulate memory reconsolidation.

Keywords: Memory. Reconsolidation. NMDA receptor. Spermidine. Arcaine. Contextual fear conditioning.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Desenho esquemático dos tipos de memória	13
Figura 2- Ativação do receptor NMDA.....	14
Figura 3- Fases da memória	19
Figura 4- Estrutura do receptor NMDA.....	20
Figura 5- Estrutura química das poliaminas	21
Figura 6- Metabolismo das poliaminas.....	23
Figura 7- Estrutura química da arcaína.....	25
Figura 8- Ações da espermidina sobre o receptor NMDA	26

LISTA DE ABREVIATURAS

ADC	Arginina descarboxilase
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico
AP5	Ácido-D-2-amino-5-fosfonopentanóico
BDNF	Fator neurotrófico neuronal
C/EBP β	Proteína beta intensificadora de ligação a CCAAT
CPP	Ácido (\pm)3-(2-carboxipiperazina-4-il-)propil-1-fosfônico
CREB	Proteína ligante do elemento responsivo ao AMPc
EC	Estímulo condicionado
EI	Estímulo incondicionado
ERK	Cinase reguladora de sinalização extracelular
MK-801	(+)-5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,b]-ciclohepteno-5-10-amino
MTA	Metiltioadenosina
NMDA	<i>N</i> -Metil-D-Aspartato
ODC	Ornitina descarboxilase
PAO	Poliamina oxidase
PKA	Proteína cinase dependente de AMPc
PKC	Proteína cinase dependente de cálcio
SAMDC	S-adenosil-metionina descarboxilase
SNC	Sistema nervoso central
SSAT	Espermidina/espermina acetiltransferase

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
1. Memória.....	12
2. Reconsolidação da memória.....	14
3. Receptor NMDA.....	17
4. Poliaminas	20
4.1 Metabolismo das poliaminas	22
4.2 Funções das poliaminas.....	24
5. Receptor NMDA, poliaminas e memória.....	25
6. Receptor NMDA e reconsolidação da memória.....	28
7. Medo condicionado.....	30
OBJETIVOS.....	31
1. Objetivo geral	32
2. Objetivos específicos	32
ARTIGO	34
CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS.....	44

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 artigo científico publicado 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.

INTRODUÇÃO

1. Memória

Do ponto de vista prático, a memória dos homens e dos animais é o armazenamento e a evocação, ou seja, a recuperação de informações adquiridas através de experiências. De acordo com Iván Izquierdo “somos aquilo que recordamos”, literalmente. Não podemos fazer aquilo que não sabemos como fazer, nem comunicar nada que desconheçamos, isto é, nada que não esteja em nossa memória (IZQUIERDO, 2002; 2011).

Para que uma memória seja formada é necessário que ocorra a aquisição de uma informação, ou seja, o aprendizado. Esta informação será processada e retida temporariamente e se esta for útil para o desenvolvimento e sobrevivência do indivíduo, ela será armazenada, de forma mais estável, através de um processo chamado consolidação. Uma vez armazenada esta informação pode ser recuperada sempre que necessário (BADDELY AND NAVARRO, 1999; IZQUIERDO, 2002).

Devido a sua complexidade, a memória pode ser classificada de acordo com o seu conteúdo e o seu tempo de duração (figura 1). Quanto ao conteúdo, podemos classificar as memórias em declarativas (explícitas) ou não declarativas (procedurais). As memórias que registram fatos, eventos ou conhecimentos são chamadas declarativas. São aquelas memórias que podem ser evocadas pelo consciente e as quais conseguimos verbalizar. As memórias declarativas podem ser divididas em episódicas e semânticas. Aquelas referentes a eventos aos quais assistimos ou dos quais participamos, como a lembrança de nossa formatura, de um rosto ou de um filme são denominadas episódicas e as de conhecimentos gerais, como o conhecimento de português, medicina ou do perfume das rosas, são memórias denominadas semânticas. Denominam-se memórias não declarativas ou de procedimento as memórias de capacidades ou habilidades motoras ou sensoriais, são aquelas memórias evocadas pelo inconsciente e que não conseguimos verbalizar, como o fato de sabermos andar de bicicleta, nadar, saltar (IZQUIERDO, 2002; SQUIRE ET AL., 1993; STICKGOLD, 2005).

Em relação ao tempo de duração, ou seja, de acordo com o tempo em que permanecem disponíveis para a evocação após serem adquiridas, as memórias podem ser classificadas como de curta duração, que duram minutos ou poucas horas após serem adquiridas, ou como de longa duração, que podem durar meses ou anos (IZQUIERDO ET AL., 1998; MCGAUGH, 1966; 2000).

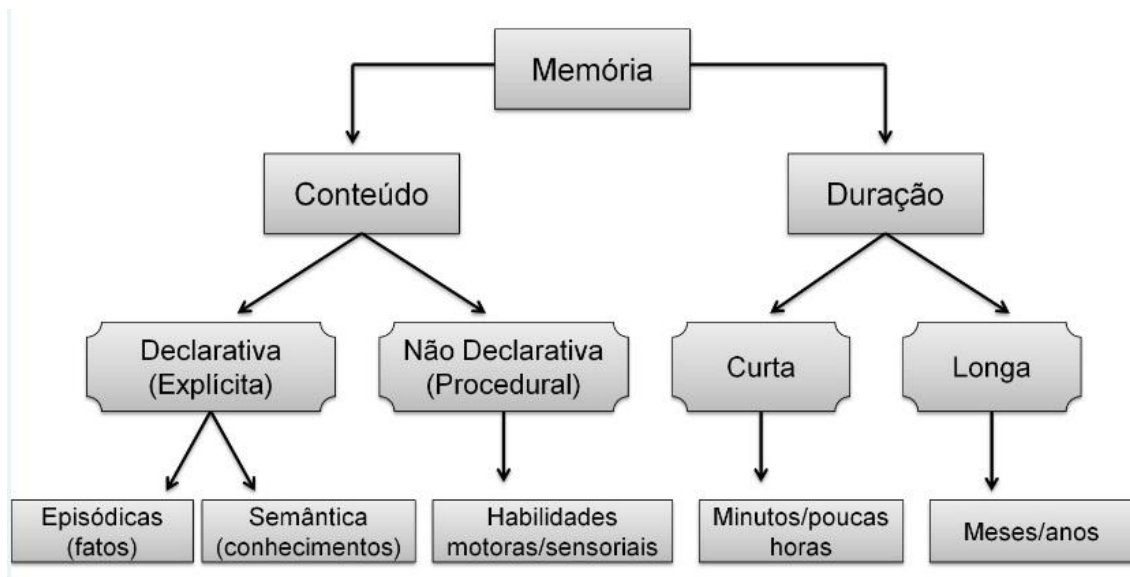


Figura 1- Desenho esquemático dos tipos de memória (adaptado de IZQUIERDO, 2002).

As memórias não são formadas instantaneamente. Como pode ser visto na figura 2, logo após o aprendizado ocorrem modificações moleculares e celulares que culminam em uma progressiva estabilização dessas informações após elas terem sido adquiridas. Este processo, conhecido como consolidação, inicia imediatamente após o aprendizado e é dependente do tempo (DUDAI, 2004; MCGAUGH, 1966; 2000). Durante este processo de estabilização, as memórias encontram-se lábeis, ou seja, instáveis, estando susceptíveis a intervenções por diferentes meios, incluindo agentes farmacológicos, fazendo com que a informação adquirida possa ser alterada (MCGAUGH, 1966; 2000).

Durante décadas acreditou-se que as memórias, uma vez consolidadas, não poderiam mais ser modificadas (MCGAUGH, 2000). Estudos posteriores, no entanto, mostram que memórias consolidadas tornam-se novamente lábeis e susceptíveis a intervenções quando reativadas, ou seja, quando recuperadas, e para que persistam

precisam passar por um novo processo de estabilização, conhecido como reconsolidação (NADER ET AL., 2000; SARA, 2000).

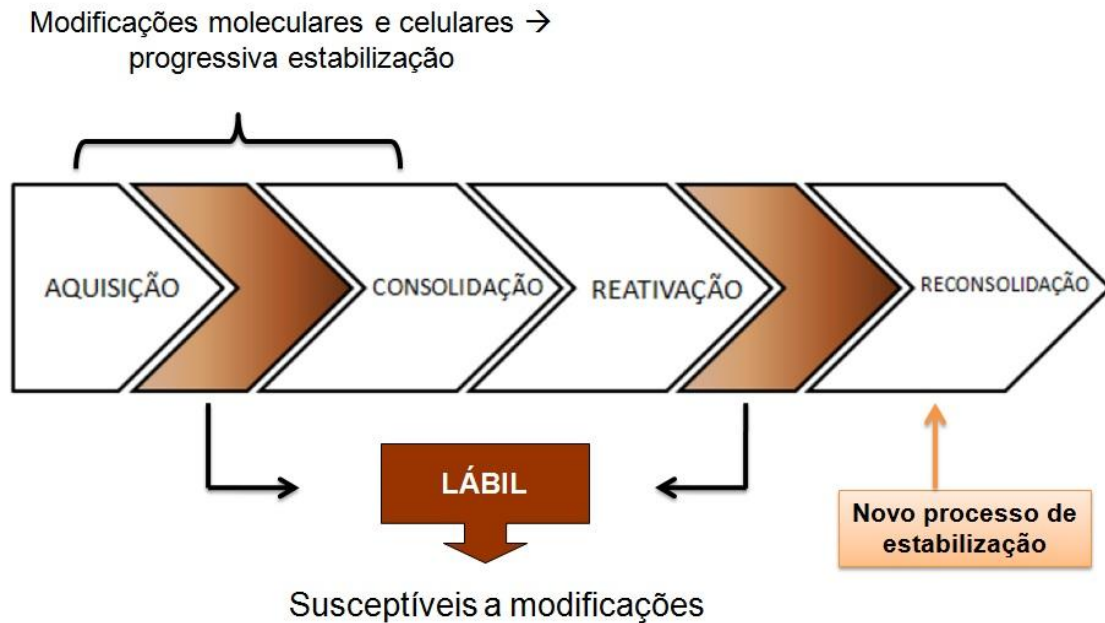


Figura 2- Fases da memória (adaptado de TRONSON E TAYLOR, 2007).

2. Reconsolidação da memória

A ideia de reconsolidação foi primeiramente proposta pelo grupo de Donald Lewis em 1968. Os animais submetidos ao treino de condicionamento aversivo eram reexpostos ao mesmo aparelho vinte e quatro horas após (reativação da memória) e logo em seguida recebiam o tratamento com choque eletroconvulsivo, para posteriormente serem testados para retenção da memória. O choque era capaz de prejudicar a memória de medo dos animais, porém se este choque fosse apresentado na ausência da reativação, tal prejuízo não ocorria, mostrando que a reativação poderia induzir a memória a um estado instável e susceptível a interferências.

Devido a forte crença no meio científico, naquela época, de que uma vez consolidada a memória não seria mais susceptível a mudanças, este trabalho não teve a repercussão merecida. O tema voltou à tona em 2000, com um trabalho publicado na Nature (NADER ET AL., 2000), onde foi demonstrado que a infusão na

amígdala de anisomicina, um inibidor de síntese proteica, após a sessão de reativação, prejudicava a memória de ratos quando testados na tarefa de medo condicionado, mesmo uma memória consolidada a duas semanas. Assim como no trabalho de Lewis (1968), a memória tinha que ser reativada para tornar-se sensível ao tratamento.

Com a evocação da memória podem ocorrer dois processos distintos que, metodologicamente, dependem do tempo de reativação da memória, que são a reconsolidação e a extinção. Caso a reativação seja por um período curto, a memória será labilizada e conseqüentemente reconsolidada, porém, se a reativação for por um período longo, ou seja, tempo suficiente para formar uma nova memória inibitória e competitiva com a original, o processo que prevalecerá será o de extinção da memória (PEDREIRA ET AL., 2004; SUZUKI ET AL., 2004).

Para entendermos melhor a diferença entre o processo de reconsolidação e o de extinção, imaginemos a seguinte situação: o animal é submetido a um treinamento em que ele é exposto a um tom e recebe um choque logo em seguida; assim, o animal aprende a associar o tom ao choque e no momento em que ele for reexposto ao mesmo tom por um período curto, porém dessa vez sem o choque, o tom irá gerar uma resposta de medo no animal. Esta breve exposição permite que a memória seja labilizada e conseqüentemente reconsolidada, possibilitando um fortalecimento da memória evocada; entretanto, se a reexposição ao tom for prolongada, o animal passará a associar o tom à ausência do choque, formando uma nova memória, que substituirá a anterior, fenômeno conhecido como extinção (LEE ET AL., 2006; QUIRK AND MUELLER, 2008).

Muitas pesquisas com o objetivo de determinar os mecanismos envolvidos na reconsolidação da memória têm encontrado semelhanças entre os processos de consolidação e reconsolidação, como por exemplo, a necessidade de síntese proteica (DEBIEC ET AL., 2002; NADER ET AL., 2000), a ativação do fator de transcrição como a proteína ligante do elemento responsivo ao AMPc (CREB) (KIDA ET AL., 2002) e a ativação da cinase reguladora de sinalização extracelular (ERK) (KELLY ET AL., 2003).

Apesar de envolverem mecanismos semelhantes, a reconsolidação não é uma simples reiteração da consolidação. Um dos primeiros estudos que apoiam a hipótese da reconsolidação e da consolidação serem processos distintos foi o realizado por Taubenfeld e colaboradores (2001), que mostra que a memória na

esquiva inibitória pode ser prejudicada pela administração sistêmica de um inibidor de síntese proteica após a reativação, porém, quando o mesmo é infundido no hipocampo não tem efeito, evidenciando que a síntese proteica no hipocampo é crucial para a consolidação (QUEVEDO ET AL., 1999), mas não para a reconsolidação. Além disso, neste mesmo estudo eles demonstraram que a expressão do fator de transcrição C/EBP β no hipocampo é importante apenas para a consolidação da memória na tarefa de esquiva inibitória, já que a infusão de oligonucleotídeos antisense para C/EBP β não interferiu com a consolidação da memória reativada. Entretanto, um estudo realizado posteriormente mostrou que a expressão do C/EBP β na amígdala é importante para a reconsolidação da memória nesta mesma tarefa (MILEKIC ET AL., 2007).

Outros trabalhos também têm demonstrado que a consolidação e a reconsolidação da memória não envolvem os mesmos mecanismos (ALBERINI, 2005; DEBIEC AND LEDOUX, 2004; DUDAI, 2004). Lee e colaboradores (2004) mostraram que a consolidação e a reconsolidação são processos dissociáveis, pois utilizam substratos cerebrais diferentes. Foi demonstrado que a consolidação do medo contextual envolve o fator neurotrófico BDNF, porém não o fator de transcrição Zif-268 no hipocampo. A reconsolidação, ao contrário, requer Zif-268, mas não BDNF. Esta diferença entre os papéis do BDNF e do Zif-268 não só esclarece a necessidade destas proteínas em fases distintas da memória dependente do hipocampo, mas também mostra que os mecanismos envolvidos na reconsolidação da memória de medo não são idênticos aos da consolidação. Sendo assim, o processo de reconsolidação pode ser encarado como uma janela de oportunidades para a manutenção, o fortalecimento e a atualização do traço mnemônico evocado (NADER ET AL., 2000).

Diversos estudos têm utilizado inibidores da síntese de proteínas para investigar a natureza do processo de reconsolidação da memória (DEBIEC ET AL., 2002; MILEKIC AND ALBERINI, 2002; NADER ET AL., 2000; SUZUKI ET AL., 2004). Estes estudos têm demonstrado que a administração de inibidores de síntese proteica, após a reativação de uma memória consolidada, prejudica a memória original e reafirmam a hipótese de que a evocação de uma memória consolidada induz um novo período de instabilidade que requer um processo que estabilize e mantenha a memória para uma futura recuperação (TRONSON AND TAYLOR, 2007). Além disso, os inibidores de síntese proteica também têm sido utilizados para mostrar a dissociação

que existe entre o processo de reconsolidação e o de extinção, uma vez que a infusão de inibidores da síntese proteica na amígdala causa prejuízo da reconsolidação, mas não da extinção, de uma memória de medo ao tom (DUVARCI ET AL., 2006).

Além da utilização de inibidores de síntese proteica, estudos utilizando injeções sistêmicas ou intracerebrais de distintos agentes farmacológicos têm mostrado que a reconsolidação pode ser prejudicada ou facilitada quando as drogas são administradas durante a reativação da memória. Entre estas substâncias, destacam-se as drogas que prejudicam a reconsolidação da memória, como agonista (clonidina) (GAMACHE ET AL., 2012) e antagonista dos receptores noradrenérgicos (propranolol) (ACHTERBERG ET AL., 2012; DEBIEC AND LEDOUX, 2004; PRZYBYSLAWSKI ET AL., 1999), antagonista dos receptores de glicocorticoides (mifepristona) (TRONEL AND ALBERINI, 2007) e antagonistas do receptor *N*-Metil-D-Aspartato (NMDA) [dizocilpina (MK-801) e ácido (\pm)-3-(2-carboxipiperazina-4-il)propil-1-fosfônico (CPP)] (CHARLIER AND TIRELLI, 2011; LEE ET AL., 2006; SUZUKI ET AL., 2004), além de drogas que facilitam a reconsolidação, como benzodiazepínico (clonazepam) (RODRIGUEZ ET AL., 2013) e agonista (D-cicloserina) (LEE ET AL., 2006; PORTERO-TRESSERRA ET AL., 2012) do receptor NMDA, entre outros.

3. Receptor NMDA

Diferentes sistemas de neurotransmissores têm sido implicados na reconsolidação da memória, entre eles o receptor NMDA tem um papel importante neste processo (NADER AND HARDT, 2009; SARA, 2000; TRONSON AND TAYLOR, 2007).

O receptor NMDA é um subtipo de receptor glutamatérgico, amplamente distribuído no Sistema Nervoso Central (SNC). Este receptor é um tetrâmero formado pelas subunidades denominadas NR1 (possui oito isoformas), NR2 (NR2A-D) e raramente pela NR3 (NR3A-B), que agrupadas formam um canal iônico que apresenta alta permeabilidade aos íons cálcio (Ca^{2+}), sódio (Na^+) e potássio (K^+) (CIABARRA ET AL., 1995; MORI AND MISHINA, 1995; NISHI ET AL., 2001; SCHULER ET AL., 2008).

A subunidade NR1 pode formar receptores homoméricos (compostos pelas mesmas subunidades) *in vitro*, porém os receptores NMDA funcionais são heteroméricos (compostos por subunidades diferentes) (RIEDEL ET AL., 2003), sendo

a maioria deles formados pelas subunidades NR1 e NR2, as quais formam um complexo tetramérico de duas subunidades NR1 e duas subunidades NR2 (MONY ET AL., 2009).

Além de ser um canal iônico dependente de ligante, é também dependente de voltagem devido à presença de um íon magnésio, que tem como função bloquear o canal deste receptor. No potencial de repouso da célula, o canal está bloqueado pelo magnésio, impedindo a passagem de outros íons pelo canal (RIEDEL ET AL., 2003).

Para que o receptor NMDA seja ativado deve haver dois fenômenos simultâneos, que é a despolarização da célula, pois este canal é bloqueado pelo íon magnésio de maneira voltagem-dependente, e concomitante a isto é necessário a ligação do agonista glutamato e do co-agonista glicina (CULL-CANDY AND LESZKIEWICZ, 2004). O glutamato e a glicina não competem pela mesma subunidade do receptor, em função deles se ligarem a sítios distintos; o glutamato liga-se a subunidade NR2, enquanto o sítio de ligação da glicina se encontra na subunidade NR1 (SCHELL ET AL., 1997). Ambos, quando ligados ao receptor NMDA, modulam positivamente a sua atividade (CULL-CANDY AND LESZKIEWICZ, 2004).

Como pode ser visto na figura 3, a ativação do receptor NMDA inicialmente ocorre com um impulso nervoso com conseqüente despolarização da membrana do neurônio pré-sináptico e liberação do glutamato das vesículas por exocitose. O glutamato liberado se liga aos receptores glutamatérgicos ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA) e cainato, fazendo com que ocorra influxo de íons Na^+ . Desta forma, vai ocorrer uma despolarização na membrana do neurônio pós-sináptico, fazendo com que o magnésio seja deslocado e o receptor NMDA possa ser ativado pelo agonista glutamato e pelo seu co-agonista glicina, resultando no influxo de íons Na^+ e Ca^{2+} e no efluxo de íons K^+ (OZAWA ET AL., 1998; PAOLETTI AND NEYTON, 2007; SCATTON, 1993). O influxo de Ca^{2+} aumenta a intensidade e prolonga a duração da despolarização da membrana do neurônio pós-sináptico, promove a ativação de proteínas cinases responsáveis por algumas respostas celulares, como o aumento da expressão dos fatores de transcrição e o aumento da transmissão de informações entre os neurônios (plasticidade sináptica) que são importantes para a formação da memória (BLISS AND COLLINGRIDGE, 1993; ELGERSMA AND SILVA, 1999; IZQUIERDO AND MEDINA, 1997).

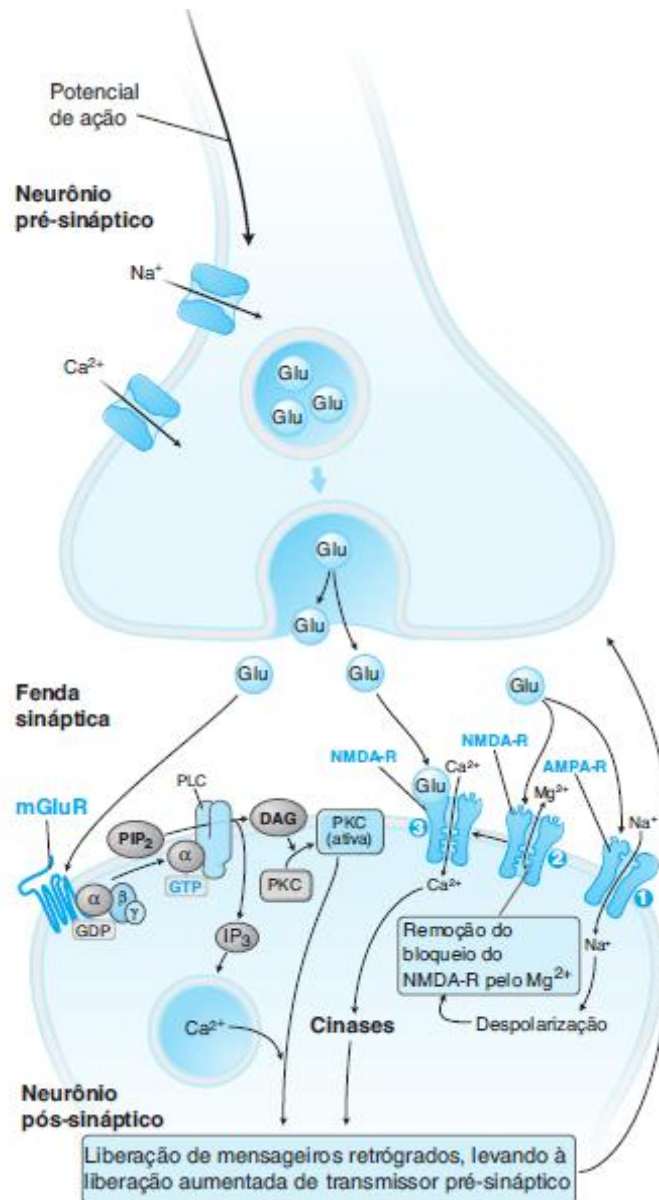


Figura 3- Ativação do receptor NMDA (adaptado de GOLAN ET AL., 2011).

O receptor NMDA possui vários sítios de ligação (figura 4) para compostos que modulam sua atividade, tais como glutamato/NMDA, sítio onde se liga a o MK-801, sítio modulatório para a glicina, zinco, bem como sítio de ligação para as poliaminas (RANSOM AND STEC, 1988; RIEDEL ET AL., 2003; WILLIAMS ET AL., 1991).

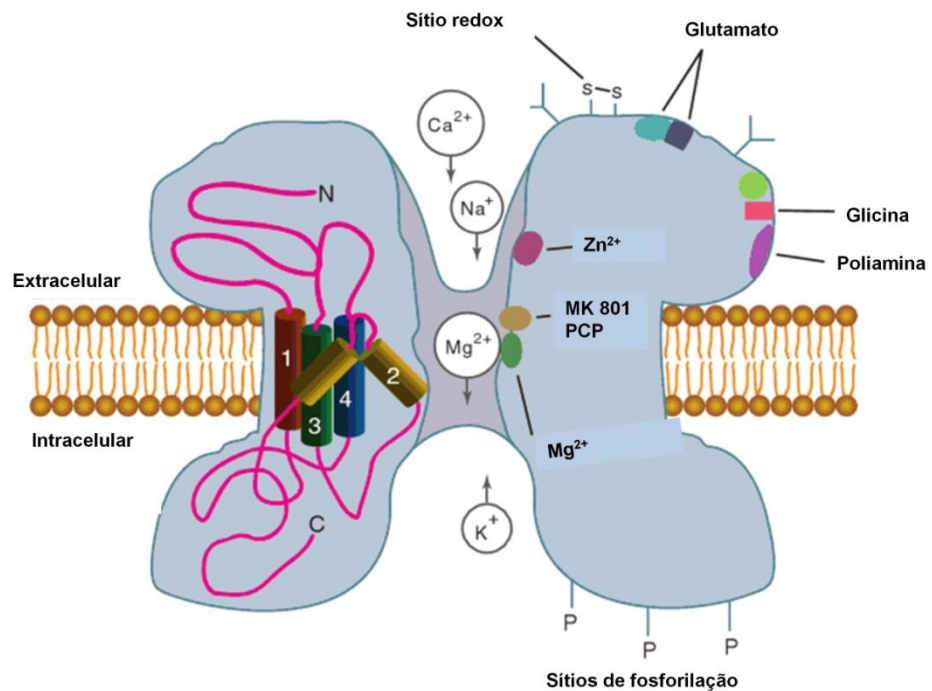


Figura 4- Estrutura do receptor NMDA (adaptado de SQUIRE ET AL., 2002).

4. Poliaminas

As poliaminas são aminas alifáticas simples que estão presentes em todas as células vivas, incluindo plantas e animais, entretanto, apenas as poliaminas putrescina, espermidina e espermina são sintetizadas pelos mamíferos (THOMAS AND THOMAS, 2001). A quantidade de poliaminas na célula aumenta à medida que ocorre a proliferação celular (IGARASHI AND KASHIWAGI, 2010).

As poliaminas são solúveis em água, possuem baixo peso molecular e encontram-se completamente protonadas em pH fisiológico, devido aos grupamentos amino primário nas extremidades da cadeia carbonada (CARTER, 1994). A putrescina, a espermidina e a espermina são compostas por uma, duas ou três cadeias carbonadas flexíveis, respectivamente, as quais são conectadas por átomos de nitrogênio. Como mostra a figura 5, a putrescina (1,4-dianobutano) é uma diamina, a espermidina (mono-*N*-3-aminopropil-1,4-dianobutano) é uma triamina e a

espermina (bis-*N*-3-aminopropil-1,4-dianobutano) é uma tetraamina (TETI ET AL., 2002).

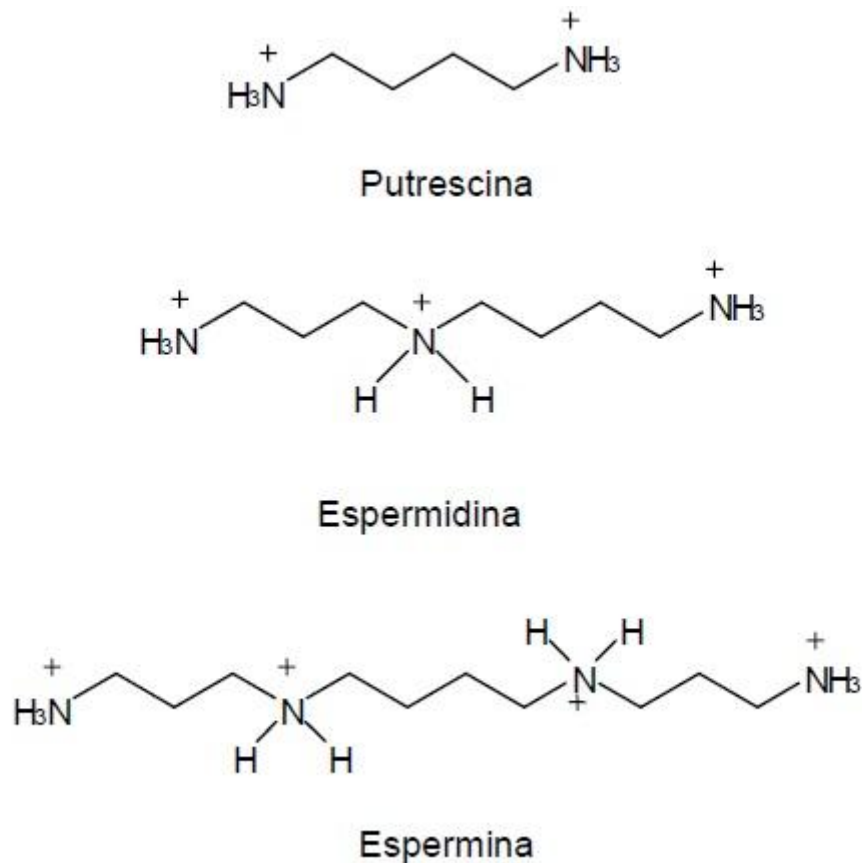


Figura 5- Estrutura química das poliaminas (adaptado de TETI ET AL., 2002).

As poliaminas estão amplamente distribuídas no SNC de seres humanos, sendo as maiores concentrações de espermidina, seguida pela espermina e putrescina, cada qual estando distribuída diferentemente em cada região. As concentrações de putrescina são maiores no córtex temporal e occipital (1,0 e 1,2 nmol/mg de proteína, respectivamente), e menores no córtex cerebelar e tálamo (0,3 e 0,5 nmol/mg de proteína, respectivamente). Já as concentrações de espermidina são especialmente altas na substância branca (20 nmol/mg de proteína), porém também foram encontradas concentrações altas de espermidina no tálamo (9,3 nmol/mg de proteína). Para a espermina a maior concentração foi encontrada no córtex cerebelar (3,4 nmol/mg de proteína) (MORRISON AND KISH, 1995).

4.1 Metabolismo das poliaminas

As poliaminas encontradas nos seres humanos são sintetizadas no organismo ou provém da flora gastrintestinal capaz de metabolizar os 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. O aminoácido ornitina é o principal precursor das poliaminas endógenas. No encéfalo, a ornitina é formada a partir da clivagem hidrolítica do aminoácido arginina, através da enzima arginase (SEILER, 1981).

Como pode ser visto na figura 6, a ornitina é descarboxilada, através da enzima ornitina descarboxilase, formando a putrescina. A putrescina serve como precursor imediato para a síntese das outras duas poliaminas, espermidina e espermina. Para que a putrescina forme a espermidina deve haver a doação de um grupamento aminopropil para a putrescina, o qual é derivado da descarboxilação da S-adenosilmetionina através da ação da enzima S-adenosilmetionina descarboxilase. A enzima espermidina sintase, uma enzima aminopropil transferase, catalisa a transferência do grupamento aminopropil para a putrescina, formando a espermidina. A espermina é formada pela doação de um segundo grupamento aminopropil para a espermidina, catalisada pela outra enzima transferase, a espermina sintase, formando então a espermina (MOINARD ET AL., 2005; TABOR AND TABOR, 1984).

Embora as reações catalisadas pelas aminopropil-transferases sejam irreversíveis, a espermina e a espermidina podem ser convertidas em espermidina e putrescina, respectivamente, na rota de interconversão. O encéfalo contém a enzima espermidina/espermina acetiltransferase (SSAT) que acetila a espermina ou espermidina na posição N1, transformando as poliaminas em derivados monoacetil. Através da ação da SSAT, a espermina é transformada em N1-acetilespermina e a espermidina em N1-acetilespermidina. As poliaminas acetiladas sofrem, então, uma clivagem oxidativa, catalisada pela enzima poliamina oxidase (PAO), liberando os grupamentos aminopropil, e formando a espermidina e putrescina, respectivamente (PEGG, 2009; SEILER, 1987; URDIALES ET AL., 2001).

O catabolismo final das poliaminas é realizado por amino-oxidases dependentes de cobre. Cada intermediário da rota de interconversão pode ser

transformado em um aldeído, através da desaminação oxidativa do grupamento amino primário, o qual é posteriormente oxidado a um aminoácido ou a um grupamento gama-lactâmico. Os produtos finais do catabolismo das poliaminas não podem ser reconvertidos em poliaminas novamente, sendo então excretados através da urina como poliaminas inalteradas, na forma de produtos acetilados e oxidados (CARTER, 1994; SEILER ET AL., 1996; SEILER AND KNODGEN, 1983; TETI ET AL., 2002; URDIALES ET AL., 2001).

As enzimas chaves na regulação da biossíntese das poliaminas são a ornitina descarboxilase (meia-vida de 10 min-1h), a S-adenosilmetionina descarboxilase e a espermidina/espermina N-acetiltransferase (meia-vida de 20-40 min). Estas enzimas regulam os mecanismos envolvendo os três passos do metabolismo das poliaminas, que são a síntese, a rota de interconversão e o catabolismo, os quais regulam os níveis de poliaminas no organismo (MORGAN, 1999; SEILER, 2004).

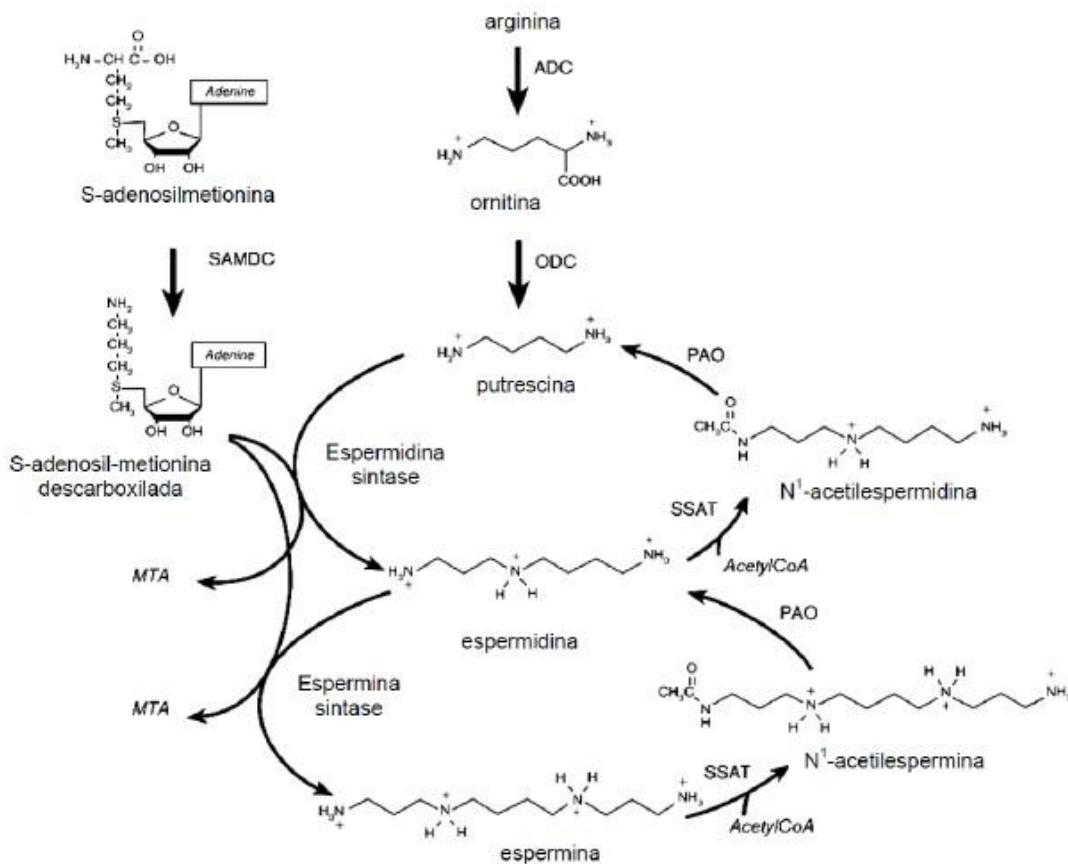


Figura 6- Metabolismo das poliaminas. Arginina descarboxilase (ADC); ornitina descarboxilase (ODC); S-adenosil-metionina descarboxilase (SAMDC);

espermidina/espermina N1 acetil-transferase (SSAT); poliamina oxidase (PAO); metiltioadenosina (MTA) (adaptado de URDIALES ET AL., 2001).

4.2 Funções das poliaminas

Devido à sua carga positiva, as poliaminas interagem com sítios aniônicos de diversas macromoléculas, como o DNA, RNA, proteínas e lipídios de membrana, sendo estas interações eletrostáticas responsáveis pela maioria de suas funções (OUAMEUR AND TAJMIR-RIahi, 2004). Estudos também mostram que elas podem agir como neurotransmissores e neuromoduladores, devido ao fato delas serem armazenadas em vesículas sinápticas e liberadas de maneira cálcio-dependente, através de um estímulo químico ou elétrico (CARTER, 1994; MONY ET AL., 2009; WILLIAMS ET AL., 1991).

As poliaminas também têm sido implicadas em processos como modulação do crescimento e diferenciação celular, apoptose, regulação da expressão gênica, além de interagirem com diversos canais iônicos, tais como canais de K^+ retificadores de entrada, receptores AMPA permeáveis ao Ca^{2+} , receptores cainato e o receptor NMDA (AIZENMAN ET AL., 2002; CELANO ET AL., 1989; IGARASHI AND KASHIWAGI, 2010; MOTT ET AL., 2003; TABOR AND TABOR, 1984; THOMAS AND THOMAS, 2001). Um dos principais interesses do estudo das poliaminas se deve a sua interação com o sítio de ligação das poliaminas do receptor NMDA (COUGHENOUR AND BARR, 2001).

A arcaína (sulfato 1,4-diguanidinobutano) é um antagonista competitivo do sítio de ligação das poliaminas do receptor NMDA (LYNCH ET AL., 1995). Ela é um análogo das poliaminas, possuindo estrutura semelhante a estas (Figura 7) (REYNOLDS, 1990).

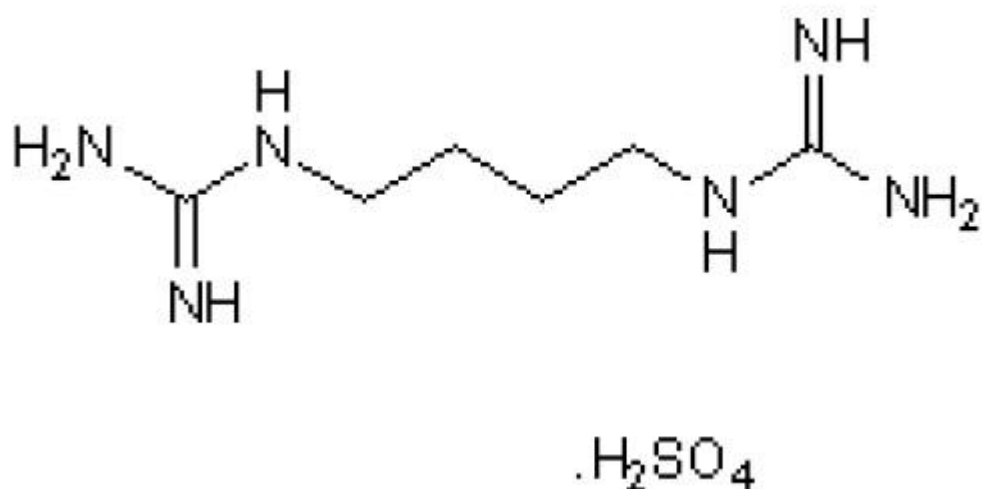


Figura 7- Estrutura química da arcaína (adaptado de REYNOLDS, 1990).

5. Receptor NMDA, poliaminas e memória

Estudos mostram que a espermidina e a espermina aumentam a afinidade do receptor NMDA pela dizocilpina, na presença e na ausência de concentrações saturantes de glutamato e glicina, sendo proposto que o efeito estimulatório das poliaminas seja devido a sua ligação no receptor NMDA (RANSOM AND STEC, 1988; WILLIAMS ET AL., 1991). Também foi demonstrado que as poliaminas agem sobre o receptor de maneira bifásica, ou seja, em baixas concentrações a espermina e a espermidina potencializam a ligação do MK-801 no receptor NMDA, enquanto em altas concentrações elas não são eficazes (JOHNSON, 1996; ROCK AND MACDONALD, 1995; WILLIAMS, 1997). A arcaína, antagonista das poliaminas, provoca o deslocamento da curva de ligação do MK-801, produzida pela espermidina, para a direita, mostrando sua competitividade com as poliaminas pelo sítio de ligação do receptor NMDA (LYNCH ET AL., 1995; SACAAN AND JOHNSON, 1990).

Estudos mostram que as poliaminas não agem diretamente no receptor NMDA, e sim potencializando ou inibindo as respostas induzidas pelo glutamato (JOHNSON, 1996). As poliaminas podem apresentar um efeito estimulatório ou inibitório sobre o receptor NMDA, como pode ser visto na figura 8. Os efeitos estimulatórios sobre o receptor podem ser independentes de glicina, onde a

espermina aumenta as correntes de íons pelo receptor induzidas pelo glutamato, na presença de concentrações saturantes de glicina (sítio 1), ou podem ser dependentes de glicina, onde a espermina aumenta a afinidade do receptor pela glicina na presença de concentrações subsaturantes de glicina (sítio 2). Já os efeitos inibitórios das poliaminas sobre o receptor NMDA podem ser através de uma inibição dependente de voltagem, devido a um bloqueio do canal, semelhante ao realizado pelo Mg^{2+} (sítio 3), ou ainda devido a uma diminuição da afinidade do receptor pelo glutamato (sítio 4) (IGARASHI AND KASHIWAGI, 2010; JOHNSON, 1996; MONY ET AL., 2009; WILLIAMS, 1997).

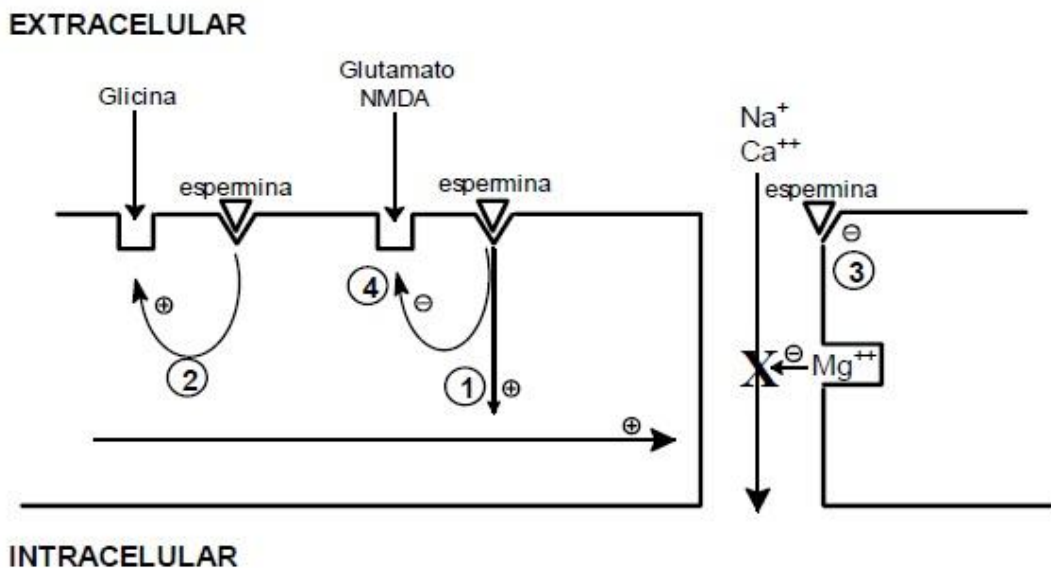


Figura 8- Ações modulatórias da espermina sobre o receptor NMDA. + efeito estimulatório das poliaminas; - efeito inibitório das poliaminas; 1-4: sítios 1-4 (adaptado de JOHNSON, 1996).

A ativação do receptor NMDA está associada com diferentes formas de plasticidade sináptica, como Potenciação de Longa Duração, aprendizado e memória (LEE AND SILVA, 2009). Existem vários estudos que mostram o envolvimento das poliaminas e do receptor NMDA em diferentes tarefas cognitivas (BERLESE ET AL., 2005; CAMERA ET AL., 2007; GUERRA ET AL., 2006; KISHI ET AL., 1998; MIKOLAJCZAK

ET AL., 2003; RUBIN ET AL., 2004; RUBIN ET AL., 2000; RUBIN ET AL., 2001; SHIMADA ET AL., 1994; TADANO ET AL., 2004).

As poliaminas possuem um efeito bifásico sobre a memória, ou seja, em baixas doses elas melhoram a memória, enquanto em altas doses elas prejudicam o desempenho dos animais em tarefas cognitivas. Assim, altas doses de poliaminas (125-250 nmol), administradas pela via intracerebroventricular, causam dano hipocampal, déficit de aprendizado, além de potencializar o déficit de memória causado pelo MK-801 em ratos, nas tarefas do labirinto aquático de Morris e do labirinto em T de 14 braços (CONWAY, 1998; SHIMADA ET AL., 1994). Por outro lado, baixas doses de espermidina são eficazes em atenuar o déficit de memória induzido pelos antagonistas do receptor NMDA, MK-801 e CPP, bem como pelo antagonista muscarínico escopolamina e pelo antagonista do sítio da glicina no receptor NMDA, ácido 7-cloroquinurénico (KISHI ET AL., 1998; MEYER ET AL., 1998; NISHIGA AND KAMEI, 2003). Além disso, baixas doses de espermina revertem a piora da memória induzida por ácido quinolínico (VELLOSO ET AL., 2009).

Foi demonstrado que a administração sistêmica, intra-hipocampal e intra-amígdala de espermidina melhora o desempenho de ratos nas tarefas de esquiva inibitória (BERLESE ET AL., 2005; GUERRA ET AL., 2006; RUBIN ET AL., 2000; RUBIN ET AL., 2001) e de medo condicionado (CAMERA ET AL., 2007; RUBIN ET AL., 2004), sendo que este efeito facilitatório na esquiva é tempo-dependente, uma vez que a espermidina modula a aquisição e o início da consolidação, não apresentando efeito sobre a consolidação tardia e a evocação da memória (BERLESE ET AL., 2005). Ainda, foi visto que a administração sistêmica (CAMERA ET AL., 2007) e intra-amígdala (RUBIN ET AL., 2004) de arcaína prejudica a memória de medo dos animais e que em uma dose que não apresenta efeito *per se*, reverte a melhora da memória causada pela espermidina, mostrando o envolvimento do sítio de ligação das poliaminas do receptor NMDA no efeito destas drogas.

Estudos recentes do nosso grupo mostraram que a administração intra-hipocampal de espermidina facilita a extinção da memória de medo e que os antagonistas do receptor NMDA arcaína, ifenprodil e traxoprodil prejudicam e revertem o efeito facilitatório da espermidina sobre a extinção (GOMES ET AL., 2010). Outras evidências também sugerem que a melhora da memória induzida pela espermidina na esquiva inibitória envolve ativação sequencial das vias da proteína

cinase C (PKC) e proteína cinase A (PKA)/CREB no hipocampo (GUERRA ET AL., 2011; GUERRA ET AL., 2012).

Além disso, outros trabalhos do nosso grupo mostraram que o efeito amnésico causado pela administração sistêmica de arcaína após o treino, na tarefa de esquiwa inibitória, é revertido pela administração da mesma droga antes do teste, sugerindo que este efeito seja causado por dependência de estado (CERETTA ET AL., 2008; MARIANI ET AL., 2011). A dependência de estado é caracterizada como um fenômeno que ocorre fisiologicamente em situações de medo, estresse ou extrema aversão, onde há uma forte liberação de hormônios do estresse. O conjunto destas alterações neuro-humorais incorporam-se ao aprendizado, tornando-se, então, parte da experiência vivida e sendo memorizados junto com ela, assim sendo os animais e as pessoas acabam evocando melhor uma memória de aversão ou estressante quando colocados novamente em uma situação similar à do aprendizado (IZQUIERDO, 2002).

6. Receptor NMDA e reconsolidação da memória

O envolvimento dos receptores NMDA no processo de reconsolidação da memória é bem descrito. Przybyslawski e Sara (1997) demonstraram que a reativação de uma memória espacial consolidada desencadeia eventos celulares que dependem do receptor NMDA durante até 2h após a reativação. Neste estudo eles mostraram que o bloqueio do receptor NMDA com o antagonista não competitivo MK-801 causa um prejuízo na memória dos ratos quando a droga é administrada até 90 minutos após a reativação da memória no labirinto radial de oito braços. Apenas os animais cujo tratamento com o MK-801 foi adiado por 120 min ou mais foram capazes de realizar a tarefa normalmente 24h mais tarde.

O prejuízo da reconsolidação da memória, através do bloqueio do receptor NMDA com MK-801 também foi encontrado em caranguejos *Chasmagnathus*, em que o efeito amnésico da droga só foi visto quando os animais foram reexpostos ao mesmo contexto de treinamento. Neste mesmo trabalho foi mostrado que o MK-801 prejudica a reconsolidação quando administrado dentro de uma janela de tempo que varia de 1h até 2h após a reativação, confirmando o envolvimento do receptor NMDA neste período (PEDREIRA ET AL., 2002).

Além desses trabalhos, outros estudos posteriores também demonstraram o envolvimento dos receptores NMDA no processo de reconsolidação da memória, utilizando diferentes tarefas experimentais (BEN MAMOU ET AL., 2006; BUSTOS ET AL., 2010; CHARLIER AND TIRELLI, 2011; FLINT ET AL., 2013; MILTON ET AL., 2013; MILTON ET AL., 2012; TORRAS-GARCIA ET AL., 2005; WANG ET AL., 2009).

Diversos estudos mostram que os antagonistas do receptor NMDA, como MK-801, AP5 e CPP prejudicam, enquanto o agonista parcial D-cicloserina melhora a reconsolidação da memória de medo em camundongos e ratos (CHARLIER AND TIRELLI, 2011; FLINT ET AL., 2013; LEE AND HYNDS, 2013; LEE ET AL., 2006; SUZUKI ET AL., 2004). Além disso, um estudo recente mostrou que o efeito amnésico do MK-801 na reconsolidação da memória é revertido pela administração da mesma droga antes do teste, mostrando evidências para um efeito de reconsolidação dependente de estado (FLINT ET AL., 2013).

Ainda, tem sido descrito que o receptor NMDA, particularmente a subunidade NR2B desempenha um papel importante na reconsolidação da memória. Foi relatado que esta subunidade é fundamental para que as memórias de medo ao tom, consolidadas e estáveis, retornem a um estado lábil durante a reativação. Assim, Ben Mamou e colaboradores (2006) demonstraram que a anisomicina prejudica a reconsolidação da memória de medo ao tom e que a administração de ifenprodil, um antagonista seletivo da subunidade NR2B, previne a piora da memória causada pela anisomicina. Este resultado foi confirmado por Milton e colaboradores (2013) que mostraram que a subunidade NR2B é necessária para a desestabilização da memória de medo ao tom consolidada, enquanto a subunidade NR2A para a reestabilização.

No entanto, não é sempre que o processo de reconsolidação ocorre, há condições em que ele parece não ocorrer, como por exemplo, quando é utilizado um protocolo de treinamento forte (WANG ET AL., 2009). Neste trabalho foi mostrado que as memórias de medo fortes, ou seja, animais submetidos a protocolos de treinamento intenso (utilizando pareamentos de tom com choque de alta intensidade), precisam de um tempo maior para serem labilizadas e consequentemente reconsolidadas. Neste caso, a anisomicina, que já é conhecida por prejudicar a reconsolidação da memória, não tem efeito quando a memória é reativada 7 dias após o treino, ela só tem efeito amnésico quando a memória é reativada 30 e 60 dias após o treino, confirmando a teoria de que as memórias fortes

precisam de um tempo maior para serem reativadas e reconsolidadas. Além disso, neste trabalho foi mostrado que o treino forte diminui a expressão da subunidade NR2B na amígdala de ratos, o que pode estar relacionado com a dificuldade de labilizar e reconsolidar este tipo de memória.

7. Medo condicionado

O medo condicionado é bastante utilizado para avaliar a base neural da memória emocional. Esta tarefa utiliza memória associativa, onde o animal é exposto, no dia do treino, a um estímulo condicionado (EC) neutro, como um contexto, e este EC é pareado com um estímulo incondicionado (EI), que pode ser aversivo, como um choque nas patas. Quando o animal aprender esta associação (EC-EI), e for exposto apenas ao estímulo condicionado, ou seja, ao contexto, ele vai responder com comportamentos defensivos, congelando os movimentos, seu pêlo fica eriçado, ocorre aumento dos batimentos cardíacos e de sua pressão sanguínea, que são reações caracterizadas como respostas de medo do animal. Esse teste é utilizado para avaliar memórias de medo (MAREN, 2005).

As respostas emocionais a situações aversivas, constrangedoras ou ameaçadoras, como o medo e a ansiedade são bastante comuns em seres humanos, possuindo grande importância para a sua sobrevivência. Entretanto, quando de forma excessiva, essas emoções podem ocasionar patologias, como ocorre nos transtornos de ansiedade, afetando significativamente a qualidade de vida do indivíduo (GROSS AND HEN, 2004). O medo condicionado pode ser utilizado para investigar os mecanismos de aprendizado e memória nos mamíferos e para o conhecimento das origens dos distúrbios relacionados ao medo em humanos (KIM AND JUNG, 2006).

Embora tenha sido mostrado o envolvimento dos receptores NMDA na reconsolidação da memória, nenhum estudo relatou se as poliaminas, moduladores endógenos da atividade destes receptores, agem na reconsolidação da memória de medo. Portanto, no presente estudo foram investigados os efeitos da espermidina e da arcaína na reconsolidação da memória de medo em ratos.

OBJETIVOS

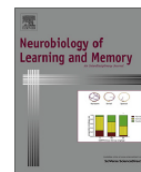
1. Objetivo geral

Avaliar o efeito da administração sistêmica do agonista poliaminérgico, espermidina, e do antagonista do sítio de ligação das poliminas, arcaína, na reconsolidação da memória de medo condicionado contextual em ratos.

2. Objetivos específicos

- 2.1- Avaliar o efeito da administração sistêmica de espermidina em diferentes doses, logo após a reativação, sobre a reconsolidação da memória de medo condicionado contextual.
- 2.2- Avaliar o efeito da administração sistêmica do antagonista do sitio de ligação das poliaminas do receptor NMDA, arcaína, em diferentes doses, logo após a reativação, sobre a reconsolidação da memória de medo condicionado contextual.
- 2.3- Verificar o efeito da administração sistêmica de espermidina e de arcaína, na dose que teve melhor efeito na reconsolidação da memória, na ausência da sessão de reativação sobre a reconsolidação da memória de medo condicionado contextual.
- 2.4- Verificar o efeito da administração sistêmica de espermidina e de arcaína, na dose que teve melhor efeito na reconsolidação da memória, 6 horas após a sessão de reativação sobre a reconsolidação da memória de medo condicionado contextual.
- 2.5- Analisar se a espermidina, em uma dose sem efeito *per se*, previne a piora da reconsolidação da memória causada pela arcaína e se a arcaína, em uma dose sem efeito *per se*, previne a melhora da reconsolidação da memória causada pela espermidina.

- 2.6- Avaliar se o efeito prejudicial da administração de arcaína após a sessão reativação pode ser revertido pela administração da mesma dose de arcaína antes do teste de medo condicionado contextual.



Polyaminergic agents modulate the reconsolidation of conditioned fear

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

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

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 February 2013
Revised 18 April 2013
Accepted 19 April 2013
Available online 28 April 2013

Keywords:

Memory reconsolidation
Polyamines
Spermidine
Arcaine
NMDA receptor
Contextual fear conditioning

ABSTRACT

When consolidated memories are reactivated, they become labile and, to persist, must undergo a new stabilization process called reconsolidation. During reactivation, memory is susceptible to pharmacological interventions that may improve or impair it. Spermidine (SPD) is an endogenous polyamine that physiologically modulates the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor in mammals by binding on the polyamine-binding site at the NMDA receptor. While polyamine agonists and antagonists of the polyamine binding site on the NMDA receptor respectively improve and impair early consolidation, it has not been defined whether these agents alter memory reconsolidation. Male Wistar rats were trained in a fear conditioning apparatus using a 0.4 mA footshock as unconditioned stimulus. Twenty four hours after training, animals were re-exposed to the apparatus in the absence of shock (reactivation session). Immediately after the reactivation session, SPD (1–30 mg/kg, i.p.) or the antagonist of the polyamine-binding site at the NMDA receptor, arcaine (0.1–10 mg/kg, i.p.), were injected, and the animals were tested in the same apparatus 24 h later. Freezing scores at testing were considered a measure of memory. While SPD (3 and 10 mg/kg) improved, arcaine (1 and 10 mg/kg) impaired memory reconsolidation. These drugs had no effect on memory if they were administered in the absence of reactivation, or 6 h after reactivation session. Arcaine (0.1 mg/kg, i.p.) prevented SPD (3 mg/kg)-induced improvement of memory reconsolidation. Accordingly, SPD (1 mg/kg) prevented arcaine (10 mg/kg)-induced impairment of memory reconsolidation. The amnesic effect of arcaine was not reversed by arcaine administration prior to test, ruling out state dependence in this effect. These results suggest that systemic administration of polyamine binding site ligands modulate memory reconsolidation.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Memories are not formed instantaneously. After learning (acquisition), a series of molecular and cellular changes occur in different brain regions, such as hippocampus, striatum and amygdala, that lead to a progressive memory stabilization (McGaugh, 2000). This process, which initiates immediately after learning and is time-dependent, has been named “consolidation” (Dudai, 2004; McGaugh, 1966, 2000). During consolidation, memories are labile and susceptible to positive or negative modulation by different means, including pharmacological agents (McGaugh, 1966, 2000). For decades, prevailed the general belief that consolidated memories could not be modified (McGaugh, 2000). Several studies, however, have shown that reactivating or retrieving consolidated memories renders them labile again, thus requiring a new stabilization process, called reconsolidation (Dudai, 2004; Nader, Schafe, & Le Doux, 2000; Sara, 2000).

Different neurotransmitter systems have been implicated in memory reconsolidation (Nader & Hardt, 2009; Sara, 2000; Tronson & Taylor, 2007). Notwithstanding, convincing pharmacological and neurochemical evidence supports that glutamate NMDA receptors, particularly those containing a NR2B subunit, play a major role in this process (Wang, de Oliveira Alvares, & Nader, 2009). Accordingly, while NMDA receptor antagonists MK-801, AP5 and ifenprodil disrupt, the NMDA receptor agonist D-cycloserine improves fear memory reconsolidation in mice and rats (Ben Mamou, Gamache, & Nader, 2006; Lee, Milton, & Everitt, 2006; Przybylski & Sara, 1997; Suzuki et al., 2004). In this regard, it is worth noticing that spermidine (SPD) and spermine, endogenous polyamines that bind to and modulate NR2B subunit activity, have been implicated in memory acquisition and consolidation (Johnson, 1996; Shimada, Spangler, London, & Ingram, 1994; Williams, 1997; Williams, Romano, Dichter, & Molinoff, 1991).

Current evidence suggests that polyamines modulate consolidation by interacting with the polyamine-binding site on the NMDA receptor (Kishi, Ohno, & Watanabe, 1998; Rubin et al., 2004, 2000, 2001; Shimada et al., 1994). In line with this view, the systemic (Camera, Mello, Ceretta, & Rubin, 2007), intrahippocampal (Berlese

* 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.

et al., 2005; Gomes et al., 2010; Guerra et al., 2006; Rubin et al., 2000), and intra-amygdalar (Rubin et al., 2004, 2001) administration of SPD improves the memory of different tasks in rats. SPD-induced memory facilitation of the inhibitory avoidance task involves the sequential activation of PKC and PKA/CREB pathways in the hippocampus (Guerra et al., 2011, 2012).

Although the involvement of NR2B-containing NMDA receptors in memory reconsolidation has been shown, no study has addressed whether polyamines, endogenous agonists of these receptors, modulate memory reconsolidation. Therefore, in the current study we investigated whether SPD and arcaine, respectively an agonist and an antagonist of the polyamine binding site on the NMDA receptors, alter fear memory reconsolidation.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Experimentally naive male Wistar rats (260–360 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 during the light phase of the cycle (from 11:00 a.m. to 4:00 p.m.). 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

Animals were injected with saline (0.9% NaCl), 1,4-diguanidinobutane sulfate (arcaine; Pfaltz & Bauer, Waterbury, CT, USA), or N-(3-aminopropyl)-1,4-butanediamine trihydrochloride (spermidine; Sigma, St. Louis, MO). All drugs solutions were prepared daily in saline 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. Conditioning apparatus

Contextual fear conditioning training, reactivation and test took place in a fear conditioning chamber (30 × 25 × 25 cm), located in a well-lit room. The front wall and ceiling of the chamber were made of clear acrylic plastic, whereas the lateral and rear walls were made of opaque plastic. The floor of the chamber consisted of 32 stainless steel rods (3 mm diameter), spaced 1 cm apart and wired to a shock generator. The chamber was cleaned with 30% ethylic alcohol before and after each rat occupied it.

2.4. Behavioral procedure

2.4.1. Contextual fear conditioning

In the conditioning trial 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 (conditioned stimulus, CS) and habituated to the apparatus (CS) for 3 min. Immediately after habituation, three 1 s, 0.4 mA footshocks (unconditioned stimulus, US) were delivered. The shocks 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.

2.4.2. Reactivation session

Twenty four hours after the conditioning session, the rats were re-exposed to the conditioning apparatus for 3 min, but no footshocks were delivered. During this time, the rat was observed every 4 s to assess whether it was in freezing, or not, by a trained observer who was unaware of the experimental treatment conditions. Behavior was judged as freezing if there was an absence of any visible movement, except for that required for breathing. Data were converted to the percentage of samples scored as freezing.

2.4.3. Test session

Twenty-four hours after reactivation, each rat was placed back in the conditioning chamber and a 6-min test was performed. During this time, the rat was observed every 4 s to assess whether it was in freezing, or not, as described above, and data were converted to the percentage of samples scores as freezing.

2.5. Experimental groups

2.5.1. Experiment 1

This experiment was designed to investigate the effect of SPD on memory reconsolidation. Animals were trained in the fear conditioning apparatus, as described above. Twenty-four hours later, the animals were subjected to the reactivation session. Immediately after reactivation session, the animals were injected with saline or SPD (1, 3, 10 or 30 mg/kg) and, 24 h later, tested in the fear conditioning apparatus where their freezing responses were scored, as described above.

2.5.2. Experiment 2

This experiment was designed to investigate the effect of arcaine on memory reconsolidation. Animals were trained in the fear conditioning apparatus, as described above. Twenty-four after training, the animals were subjected to the reactivation session. Immediately after reactivation session, the animals were injected with saline or arcaine (0.1, 1 or 10 mg/kg) and, 24 h later, tested in the fear conditioning apparatus where their freezing responses were scored, as described above.

2.5.3. Experiment 3

To evaluate whether the systemic administration of SPD and arcaine are specific for reconsolidation of contextual fear memories two control experiments were performed. In the first, animals were trained in the fear conditioning apparatus, as described above, but were not subjected to the memory reactivation session 24 h later (“no reactivation” control). The animals were injected with saline, SPD (3 mg/kg) or arcaine (10 mg/kg) 24 h after training and, 24 h later, were tested in the fear conditioning apparatus and had their freezing responses scored, as described above. The doses of spermidine and arcaine used in this experiment were chosen based on the dose-response curve experiments (Experiments 1 and 2), which determined fully effective and non-effective doses for both compounds.

In order to confirm the specificity of enhanced or disrupted reconsolidation by SPD and arcaine, respectively, a second control experiment was performed. The animals were trained in the fear conditioning apparatus and 24 h later they were subjected to the reactivation session, as described above. Six hours after reactivation session (“delayed infusion” control), the animals were injected with saline, SPD (3 mg/kg) or arcaine (10 mg/kg). Twenty-four hours after reactivation, the animals were tested in the fear conditioning apparatus and their freezing responses were scored, as described above.

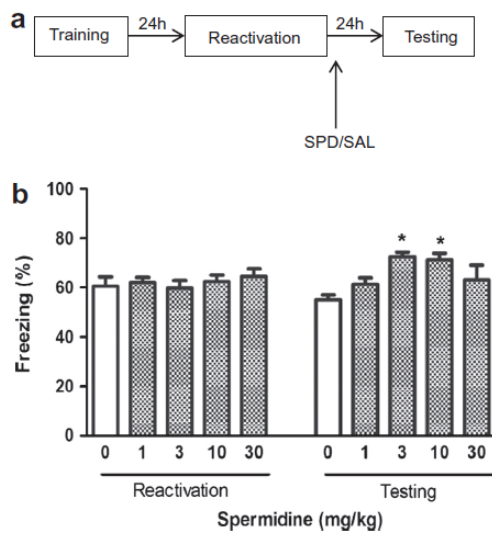


Fig. 1. Postreactivation administration of SPD improves reconsolidation of contextual fear memories. (a) Schematic of the experimental design. Rats received an i.p. injection of SPD (1–30 mg/kg) or saline (0.9% NaCl, 1 ml/kg), immediately after a reactivation session, and were tested for memory reconsolidation 1 day later. The dose of 3 and 30 mg/kg (b) was effective at enhancing memory reconsolidation. * $p < 0.05$ compared with vehicle by the SNK Test. Data are the means + SEM percentage of freezing in reconsolidation testing session ($n = 9–10$ animals in each group).

2.5.4. Experiment 4

In order to investigate the involvement of polyamine-binding sites on the NMDA receptor in the effect of polyamines, we initially administered the polyaminergic agonist, SPD (at a non-effective dose, determined by the dose–effect curve shown in Fig. 1) to prevent the deleterious effect of the polyaminergic antagonist arcaine. The animals were trained in the fear conditioning apparatus and, 24 h later, they were subjected to the reactivation session, as described above. Immediately after reactivation session, the animals were injected with saline or SPD (1 mg/kg) and 15 min later they were injected with saline or arcaine (10 mg/kg) in different flanks. Twenty-four hours after reactivation, the animals were tested in the fear conditioning apparatus and their freezing responses were scored, as described above.

In order to confirm the involvement of polyamine-binding sites on the NMDA receptor in the effect of polyamines, we administered the polyaminergic antagonist arcaine (at a non-effective dose, determined by dose–effect curve shown in Fig. 2) to prevent the facilitatory effect of SPD. The animals were trained in the fear conditioning apparatus and, 24 h later, they were subjected to the reactivation session, as described above. Immediately after reactivation session, the animals were injected with saline or arcaine (0.1 mg/kg), immediately after reactivation, and saline or SPD (3 mg/kg) 15 min later, in different flanks. Twenty-four hours after reactivation, the animals were tested in the fear conditioning apparatus and their freezing responses were scored, as described above.

2.5.5. Experiment 5

This experiment was designed to investigate whether the effect of arcaine on memory reconsolidation involved state dependence. Animals were trained in the fear conditioning apparatus and, 24 h later, they were subjected to the reactivation session, as described above. Immediately after reactivation and 30 min before testing, the animals were injected with saline or arcaine (10 mg/kg). Twenty-four hours after reactivation session, the animals were

tested in the fear conditioning apparatus, where their freezing responses were scored, as described above.

2.6. Statistics

The data were converted to the percentage of samples scored as freezing and analyzed by one- or two-way analysis of variance (ANOVA), depending on the experimental design. Post hoc analyses were carried out by the Student–Newman–Keuls test, when indicated. A $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. Postreactivation SPD improves reconsolidation of contextual fear memories biphasically

Fig. 1 shows the effect of SPD (1–30 mg/kg, i.p.) immediately post-reactivation on the reconsolidation of fear conditioning. As expected, statistical analysis (one-way ANOVA) of reactivation session freezing scores revealed no difference among groups [$F(4,45) = 0.39$, $p > 0.05$], indicating that animals' behavior was similar between groups before drug administration. Statistical analysis (one-way ANOVA) of test freezing scores revealed a significant effect of drug treatment [$F(4,44) = 4.71$, $p < 0.05$]. Post hoc analysis (SNK) revealed that while 3 and 10 mg/kg SPD increased, 1 and 30 mg/kg SPD had no effect on freezing scores at test. These results suggest that SPD facilitates memory reconsolidation in a biphasic manner.

3.2. Postreactivation administration of arcaine impairs reconsolidation of contextual fear memories in a dose-dependent manner

Fig. 2 shows the effect of arcaine (0.1–10 mg/kg, i.p.) immediately post-reactivation on fear conditioning reconsolidation. One-

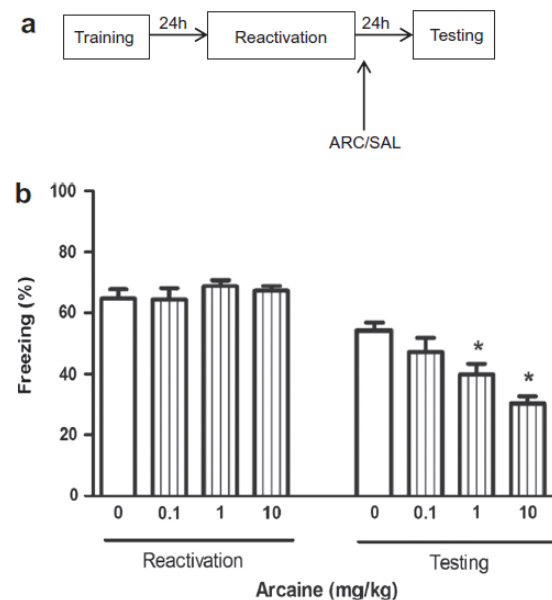


Fig. 2. Postreactivation administration of arcaine impairs the reconsolidation of contextual fear memories. (a) Schematic of the experimental design. Rats received an i.p. injection of arcaine (0.1–10 mg/kg) or saline (0.9% NaCl, 1 ml/kg), immediately after a reactivation session, and were tested for memory reconsolidation 1 day later. * $p < 0.05$ compared with vehicle by the SNK Test. Data are the means + SEM percentage of freezing in reconsolidation testing session ($n = 8$ animals in each group).

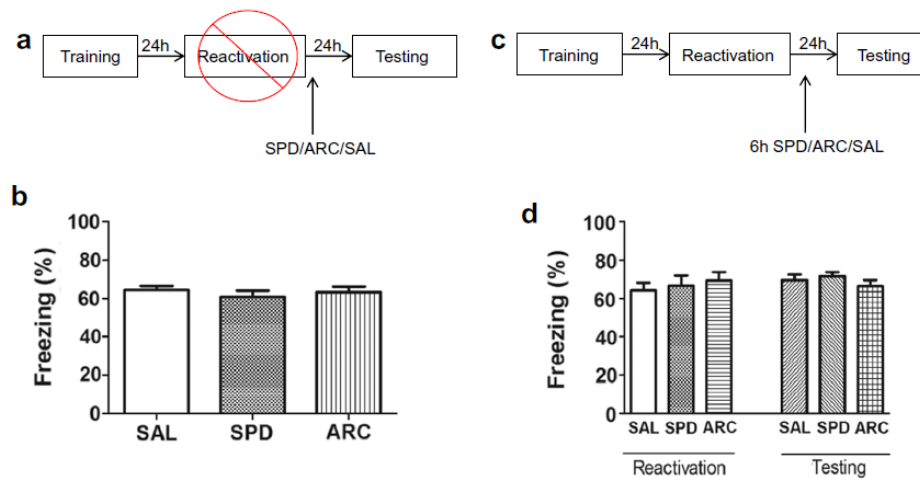


Fig. 3. SPD and arcaine are specific for reconsolidation of contextual fear memories. (a) Schematic of the experimental design in the absence of reactivation session. Rats received an i.p. injection of SPD (3 mg/kg), arcaine (ARC, 10 mg/kg) or saline (0.9% NaCl, 1 ml/kg), 24 h after training in the absence of reactivation session, and were tested for memory reconsolidation 1 day later (b). (c) Schematic of the experimental design in the delayed administration of SPD and arcaine. Rats received an i.p. injection of SPD (3 mg/kg), arcaine (ARC, 10 mg/kg) or saline (0.9% NaCl, 1 ml/kg), 6 h after reactivation session, and were tested for memory reconsolidation 1 day later (d). Data are means + SEM percentage of freezing in the testing session ($n = 7-10$ animals in each group).

way ANOVA of reactivation session freezing scores did not reveal significant differences among groups [$F(3,28) = 0.59, p > 0.05$]. Statistical analysis of test session freezing scores revealed a significant effect of pharmacological treatment [$F(3,28) = 9.15, p < 0.05$]. Post hoc analysis (SNK) revealed that while 1 and 10 mg/kg arcaine decreased, 0.1 mg/kg arcaine did not alter freezing scores. These results suggest that arcaine impairs memory reconsolidation in a dose-dependent manner.

3.3. SPD and arcaine specifically modulate contextual fear reconsolidation

Fig. 3 shows the effect of SPD (3 mg/kg, i.p.) and arcaine (10 mg/kg, i.p.) 24 h after training, in the absence of reactivation session and 6 h after reactivation session, on contextual fear conditioning. Statistical analysis (one-way ANOVA) revealed that SPD and arcaine did not alter contextual fear conditioning in the absence of reactivation [$F(2,18) = 0.41, p > 0.05$, Fig. 3b] and that the delayed injection of SPD and arcaine did not alter contextual fear conditioning [$F(2,26) = 0.84, p > 0.05$, Fig. 3d]. Again, as expected, statistical analysis of reactivation freezing scores revealed no differences among groups [$F(2,26) = 0.28, p > 0.05$, Fig. 3d].

3.4. Involvement of polyamine-binding sites at the NMDA receptor in the effect of polyamines on reconsolidation of contextual fear memories

Fig. 4b shows the effect of SPD, at a non-effective dose (1 mg/kg, immediately post-reactivation) on the impairment of reconsolidation induced by arcaine (10 mg/kg, 15 min post-reactivation). Fig. 4d shows the effect of arcaine, at a non-effective dose (0.1 mg/kg, immediately post-reactivation), on the improvement of reconsolidation of contextual fear conditioning induced by SPD (3 mg/kg, 15 min post-reactivation). Statistical analysis (one-way ANOVA) of reactivation freezing scores revealed no differences among the groups in both experiments [$F(3,16) = 1.20, p > 0.05$; $F(3,16) = 1.60, p > 0.05$, Fig. 4b and d respectively]. On the other hand, statistical analysis of test freezing scores (two-way ANOVA) presented in Fig. 4b revealed a significant pretreatment (saline or SPD) versus treatment (saline or arcaine) interaction

[$F(1,16) = 57.67, p < 0.05$]. Post hoc analysis (SNK) revealed that SPD prevented the impairment of fear conditioning reconsolidation induced by arcaine. Statistical analysis of test freezing scores (two-way ANOVA) presented in Fig. 4d revealed a significant pretreatment (saline or arcaine) versus treatment (saline or SPD) interaction [$F(1,16) = 13.50, p < 0.05$]. Post hoc analysis (SNK) revealed that arcaine prevented SPD-induced improvement of contextual fear conditioning reconsolidation.

3.5. Effect of arcaine on reconsolidation was not caused by state dependence

Fig. 5 shows the effect of arcaine immediately post-reactivation and 30 min before testing on contextual fear conditioning scores at test. Again, statistical analysis of reactivation freezing scores (one-way ANOVA) revealed no differences among groups [$F(3,16) = 0.23, p > 0.05$]. On the other hand, statistical analysis of freezing scores at test (two-way ANOVA) revealed only a significant effect of post-reactivation pharmacological treatment [$F(1,16) = 0.46, p > 0.05$]. Post hoc analysis (SNK) confirmed that administration of arcaine immediately after reactivation impaired reconsolidation regardless whether arcaine was injected again before test or not. These results rule out state dependence as a possible explanation for the currently reported arcaine-induced impairment of reconsolidation.

4. Discussion

The current study showed that while the polyamine SPD improves, arcaine, an antagonist of the polyamine binding site at the NMDA receptor, impairs the reconsolidation of contextual fear conditioning.

In a general sense, the current finding that arcaine disrupts the reconsolidation of the memory of contextual fear conditioning task corroborates those studies that have shown that NMDA receptor antagonists impair memory reconsolidation (Charlier & Tirelli, 2011; Lee et al., 2006; Pedreira, Perez-Cuesta, & Maldonado, 2002). Early studies by Przybylski and Sara (1997) have shown that blocking NMDA receptor with MK-801 up to 1 h after the reactivation session impairs memory reconsolidation, when memory is assessed 24 h or 48 h later, suggesting that NMDA modulators have

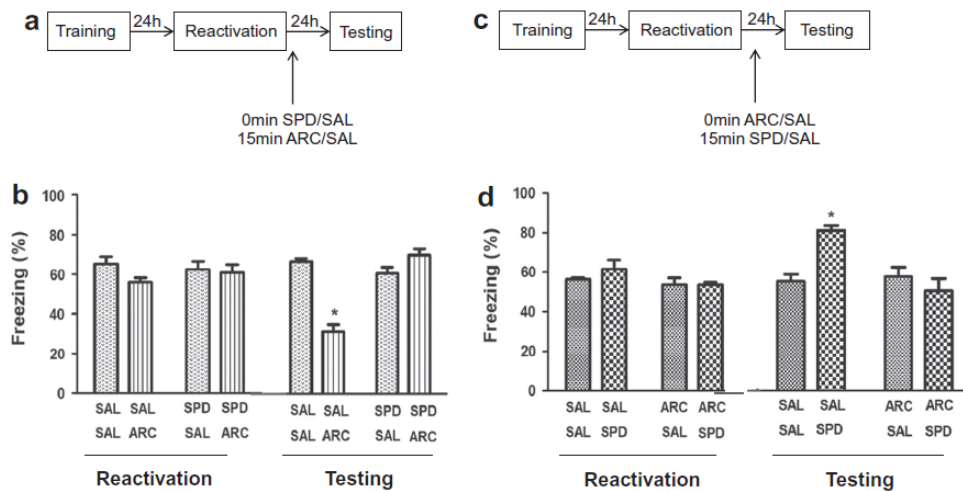


Fig. 4. Involvement of polyamine-binding sites on the NMDA receptor in the effect of polyamines on reconsolidation. (a) Schematic of the experimental design to prevent the amnesic effect of arcaine by SPD. Rats received an i.p. injection of SPD (1 mg/kg) or saline (0.9% NaCl, 1 ml/kg) immediately and saline (0.9% NaCl, 1 ml/kg) or arcaine (ARC, 10 mg/kg) 15 min after the reactivation session, and were tested for memory reconsolidation 1 day later (b). (c) Schematic of the experimental design to prevent the facilitatory effect of SPD by arcaine. Rats received an i.p. injection of arcaine (ARC, 0.1 mg/kg) or saline (0.9% NaCl, 1 ml/kg) immediately and SPD (3 mg/kg, i.p.) or saline (0.9% NaCl, 1 ml/kg) 15 min after the reactivation session, and were tested for memory reconsolidation 1 day later (d). * $p < 0.05$ compared with vehicle by the SNK. Data are means + SEM percentage of freezing in the testing session ($n = 5$ animals in each group).

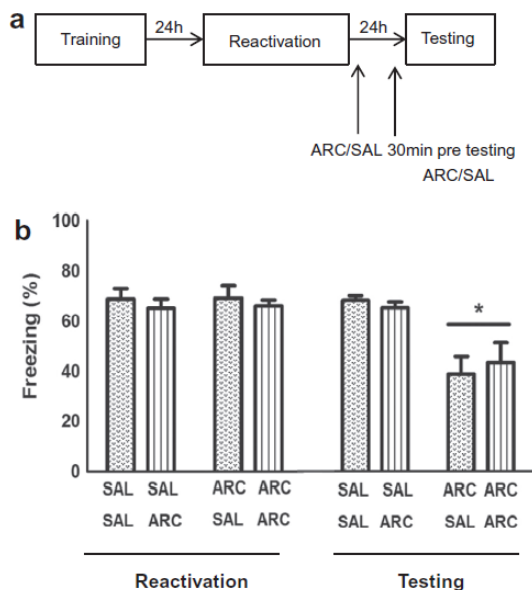


Fig. 5. Effect of arcaine on reconsolidation was not caused by state dependence. (a) Schematic of the experimental design. Rats received an i.p. injection of arcaine (ARC, 10 mg/kg) or saline (0.9% NaCl, 1 ml/kg) immediately after reactivation and 30 min before testing, and were tested for memory reconsolidation. * $p < 0.05$ compared with vehicle by the SNK Test. Data are the means + SEM percentage of freezing in the testing session ($n = 5$ animals in each group).

a limited time window to interfere with memory reconsolidation. More recently, additional evidence has been gathered indicating that NR2B-containing NMDA receptors are critical for reconsolidation. Mamou et al. (2006), have shown that NR2B subunits are necessary for transforming stable fear conditioning memories into labile ones during reactivation in the basolateral amygdala (BLA), and Wang et al. (2009) have shown a relationship between NR2B expression and the ability of an auditory fear memory to undergo

reconsolidation in the BLA. Interestingly, the deleterious effect of arcaine on memory reconsolidation was fully prevented by a non-effective dose of SPD. This is in full agreement with the view that arcaine and SPD compete for the same binding site at the NMDA receptor (Reynolds, 1990). Notwithstanding, arcaine inhibits [3H]MK801 binding in the absence of added polyamines, implying a constitutive role of ligand occupation of the polyamine site for NMDA receptor function (Reynolds, 1990). Therefore, since arcaine may alter NMDA receptor function in the absence of polyamines, one must be cautious while presuming a physiological role for endogenous polyamines on memory based only on data obtained with arcaine.

In the current study we also showed that SPD improves memory reconsolidation. These results are also in agreement with those from Lee et al. (2006) and Yamada, Zushida, Wada, and Sekiguchi (2009), who have shown that enhancing NMDA receptor-mediated glutamatergic transmission with D-cycloserine (DCS), a NMDA receptor partial agonist, facilitates the reconsolidation of fear conditioning memory. The currently described biphasic effect of SPD on memory reconsolidation is also in agreement with the view that polyamines modulate the NMDA receptor biphasically (Rock & Macdonald, 1995; Williams, 1997; Williams et al., 1991). Accordingly, polyamines, at low micromolar concentrations, enhance [3H]MK-801 and [3H]TCP binding to the NMDA receptor channel, whereas higher concentrations of polyamines do not alter the binding of these ligands, resulting in a biphasic concentration dose–response curve (Ransom & Stec, 1988; Sacaan & Johnson, 1990; Williams, 1997). Accordingly, low concentrations of polyamines enhance NMDA-evoked currents, whereas higher concentrations of polyamines produce less enhancement of, or inhibit, NMDA receptor currents (McGurk, Bennett, & Zukin, 1990; Rock & Macdonald, 1995; Sprosen & Woodruff, 1990; Williams, Dawson, Romano, Dichter, & Molinoff, 1990). Moreover, these results agree with previous studies that have shown that intrahippocampal or intra-amygdala administration of SPD improves the memory of the inhibitory avoidance task (Berlese et al., 2005; Rubin et al., 2000) and fear conditioning (Rubin et al., 2004) in a biphasic manner.

One must also outline that the facilitatory role of SPD was fully prevented by the administration of a non-effective dose of arcaine,

providing pharmacological evidence that SPD effects involve the polyamine binding site at the NMDA receptor.

Since we have previously shown that intrahippocampal SPD facilitates the extinction of fear conditioning (Gomes et al., 2010), some important methodological differences between the experimental protocols used to investigate extinction and reconsolidation must be emphasized. Reconsolidation protocols demand a brief exposure of the animal to the conditioning context (Sara, 2000). Such a short exposure strengthens the association between context and shock, as context brings about the vivid recall of the traumatic shock experience. In this case, the duration of exposure is not enough for the animal realize that the conditioned stimulus (CS) does not predict the unconditioned stimulus (US) anymore. Accordingly, longer periods of re-exposure to the training context allow such a dissociation between CS and US. The dissociation between context and shock implies a new learning (Ji & Maren, 2007; Myers & Davis, 2002; Szapiro, Vianna, McGaugh, Medina, & Izquierdo, 2003) and, consequently, the formation of a different memory (engram). In this context, it is reasonable that SPD facilitates extinction of fear conditioning (Gomes et al., 2010), because it depends on the activation of NMDA receptors (Myers & Davis, 2002), particularly those containing the NR2B subunit (Sotres-Bayon, Diaz-Mataix, Bush, & LeDoux, 2009). Therefore, one might argue that our results (this study and Gomes et al., 2010) constitute pharmacological evidence supporting the involvement of the NMDA receptor in fear conditioning reconsolidation and extinction, as proposed by different authors (Bustos, Giachero, Maldonado, & Molina, 2010; Lee et al., 2006; Sotres-Bayon, Bush, & LeDoux, 2007; Suzuki et al., 2004; Weber, Hart, & Richardson, 2007; Yamada et al., 2009).

It is also interesting that the facilitatory effect of SPD on memory reconsolidation did not occur when this polyamine was administered 6 h after the reactivation session. This time window for the effect of SPD on reconsolidation is similar to that determined for SPD on early consolidation of inhibitory avoidance (Berlese et al., 2005). Nader et al. (2000) have shown that reconsolidation is sensitive to protein synthesis inhibition also at a restricted time window (less than 6 h), suggesting that both consolidation and reconsolidation have time windows within which protein synthesis is required. Notwithstanding, it is not known whether the facilitatory effects of SPD on memory depend on protein synthesis, and which cerebral structures are affected by SPD and arcaine, as well. In this context, microinfusion studies may provide experimental evidence to answer these questions.

At last, since previous studies have shown that arcaine causes state-dependent learning (Ceretta, Camera, Mello, & Rubin, 2008; Mariani et al., 2011) one might question whether the effect of arcaine on memory reconsolidation is a form of state dependence, i.e., that retrieval is dependent on a physiological/pharmacological state present during acquisition (Izquierdo & Dias, 1983a,b,c, 1985; Overton, 1964; Shulz, Sosnik, Ego, Haidarliu, & Ahissar, 2000). However, the deleterious effect of arcaine on memory reactivation was not reversed by the administration of arcaine before testing (Fig. 5), ruling out state-dependent learning in the currently reported effects of arcaine.

In summary, this study showed that while the systemic injection of SPD immediately after reactivation improves, the injection of arcaine impairs memory reconsolidation. We also showed that systemic injection of arcaine prevents the improvement of memory reconsolidation induced by SPD and that the injection of SPD prevents arcaine-induced impairment of memory reconsolidation. These findings suggest that ligands of the polyamine binding site at the NMDA receptor modulate memory reconsolidation. Moreover, arcaine-induced impairment of reconsolidation is not related to state dependence. These results indicate a role for polyamines on memory reconsolidation.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Gustavo Petri Guerra for a critical reading of the manuscript and insightful suggestions. C.F. Mello and M.A. Rubin are recipients of productivity CNPq fellowships.

References

- Ben Mamou, C., Gamache, K., & Nader, K. (2006). NMDA receptors are critical for unleashing consolidated auditory fear memories. *Nature Neuroscience*, *9*, 1237–1239.
- Berlese, D. B., Sauzem, P. D., Carati, M. C., Guerra, G. P., Stiegemeier, J. A., Mello, C. F., et al. (2005). Time-dependent modulation of inhibitory avoidance memory by spermidine in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, *83*, 48–53.
- Bustos, S. G., Giachero, M., Maldonado, H., & Molina, V. A. (2010). Previous stress attenuates the susceptibility to Midazolam's disruptive effect on fear memory reconsolidation: Influence of pre-activation D-cycloserine administration. *Neuropsychopharmacology*, *35*, 1097–1108.
- Camera, K., Mello, C. F., Ceretta, A. P., & Rubin, M. A. (2007). Systemic administration of polyaminergic agents modulate fear conditioning in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, *192*, 457–464.
- Ceretta, A. P., Camera, K., Mello, C. F., & Rubin, M. A. (2008). Arcaine and MK-801 make recall state-dependent in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, *201*, 405–411.
- Charlier, Y., & Tirelli, E. (2011). Differential effects of histamine H(3) receptor inverse agonist thioperamide, given alone or in combination with the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist dizocilpine, on reconsolidation and consolidation of a contextual fear memory in mice. *Neuroscience*, *193*, 132–142.
- Dudai, Y. (2004). The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annual Reviews Psychology*, *55*, 51–86.
- Gomes, G. M., Mello, C. F., da Rosa, M. M., Bochi, G. V., Ferreira, J., Barron, S., et al. (2010). Polyaminergic agents modulate contextual fear extinction in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, *93*, 589–595.
- Guerra, G. P., Mello, C. F., Bochi, G. V., Pazini, A. M., Fachinnetto, R., Dutra, R. C., 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., Mello, C. F., Bochi, G. V., Pazini, A. M., Rosa, M. M., Ferreira, J., et al. (2012). Spermidine-induced improvement of memory involves a cross-talk between protein kinases C and A. *Journal of Neurochemistry*.
- Guerra, G. P., Mello, C. F., Sauzem, P. D., Berlese, D. B., Furian, A. F., Tabarelli, Z., et al. (2006). Nitric oxide is involved in the memory facilitation induced by spermidine in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, *186*, 150–158.
- Izquierdo, I., & Dias, R. D. (1983a). Effect of ACTH, epinephrine, beta-endorphin, naloxone, and of the combination of naloxone or beta-endorphin with ACTH or epinephrine on memory consolidation. *Psychoneuroendocrinology*, *8*, 81–87.
- Izquierdo, I., & Dias, R. D. (1983b). Endogenous state-dependency: Memory regulation by post-training and pre-testing administration of ACTH, beta-endorphin, adrenaline and tyramine. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *16*, 55–64.
- Izquierdo, I., & Dias, R. D. (1983c). Memory as a state dependent phenomenon: Role of ACTH and epinephrine. *Behavioral and Neural Biology*, *38*, 144–149.
- Izquierdo, I., & Dias, R. D. (1985). Influence on memory of posttraining or pre-test injections of ACTH, vasopressin, epinephrine, and beta-endorphin, and their interaction with naloxone. *Psychoneuroendocrinology*, *10*, 165–172.
- Ji, J., & Maren, S. (2007). Hippocampal involvement in contextual modulation of fear extinction. *Hippocampus*, *17*, 749–758.
- Johnson, T. D. (1996). Modulation of channel function by polyamines. *Trends in Pharmacological Sciences*, *17*, 22–27.
- Kishi, A., Ohno, M., & Watanabe, S. (1998). Concurrent activation of hippocampal glycine and polyamine sites of the N-methyl-D-aspartate receptor synergistically reverses working memory deficits in rats. *Neuroscience Letters*, *257*, 131–134.
- Lee, J. L., Milton, A. L., & Everitt, B. J. (2006). Reconsolidation and extinction of conditioned fear: Inhibition and potentiation. *Journal of Neuroscience*, *26*, 10051–10056.
- Mariani, R. K., Mello, C. F., Rosa, M. M., Ceretta, A. P., Camera, K., & Rubin, M. A. (2011). Effect of naloxone and morphine on arcaine-induced state-dependent memory in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, *215*, 483–491.
- McGaugh, J. L. (1966). Time-dependent processes in memory storage. *Science*, *153*, 1351–1358.
- McGaugh, J. L. (2000). Memory – A century of consolidation. *Science*, *287*, 248–251.
- McGurk, J. F., Bennett, M. V., & Zukin, R. S. (1990). Polyamines potentiate responses of N-methyl-D-aspartate receptors expressed in xenopus oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, United States*, *87*, 9971–9974.
- Myers, K. M., & Davis, M. (2002). Behavioral and neural analysis of extinction. *Neuron*, *36*, 567–584.
- Nader, K., & Hardt, O. (2009). A single standard for memory: The case for reconsolidation. *Nature Review Neuroscience*, *10*, 224–234.
- Nader, K., Schafe, G. E., & Le Doux, J. E. (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, *406*, 722–726.
- Overton, D. A. (1964). State-dependent or “dissociated” learning produced with pentobarbital. *Journal of Comparative Physiological Psychology*, *57*, 3–12.

- Pedreira, M. E., Perez-Cuesta, L. M., & Maldonado, H. (2002). Reactivation and reconsolidation of long-term memory in the crab *Chasmagnathus*: Protein synthesis requirement and mediation by NMDA-type glutamatergic receptors. *Journal of Neuroscience*, *22*, 8305–8311.
- Przybylski, J., & Sara, S. J. (1997). Reconsolidation of memory after its reactivation. *Behavioural Brain Research*, *84*, 241–246.
- Ransom, R. W., & Stec, N. L. (1988). Cooperative modulation of [³H]MK-801 binding to the N-methyl-D-aspartate receptor-ion channel complex by L-glutamate, glycine, and polyamines. *Journal of Neurochemistry*, *51*, 830–836.
- Reynolds, I. J. (1990). Arcaine is a competitive antagonist of the polyamine site on the NMDA receptor. *European Journal of Pharmacology*, *177*, 215–216.
- Rock, D. M., & Macdonald, R. L. (1995). Polyamine regulation of N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *35*, 463–482.
- Rubin, M. A., Berlese, D. B., Stiegemeier, J. A., Volkweis, M. A., Oliveira, D. M., dos Santos, T. L., et al. (2004). Intra-amygdala administration of polyamines modulates fear conditioning in rats. *Journal of Neuroscience*, *24*, 2328–2334.
- Rubin, M. A., Boemo, R. L., Jurach, A., Rojas, D. B., Zanolla, G. R., Obregon, A. D., et al. (2000). Intra-hippocampal spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. *Behavioural Pharmacology*, *11*, 57–61.
- Rubin, M. A., Stiegemeier, J. A., Volkweis, M. A., Oliveira, D. M., Fenili, A. C., Boemo, R. L., et al. (2001). Intra-amygdala spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. *European Journal of Pharmacology*, *423*, 35–39.
- Sacaan, A. I., & Johnson, K. M. (1990). Characterization of the stimulatory and inhibitory effects of polyamines on [³H]N-(1-[thienyl]cyclohexyl) piperidine binding to the N-methyl-D-aspartate receptor ionophore complex. *Molecular Pharmacology*, *37*, 572–577.
- Sara, S. J. (2000). Retrieval and reconsolidation: Toward a neurobiology of remembering. *Learning & Memory*, *7*, 73–84.
- Shimada, A., Spangler, E. L., London, E. D., & Ingram, D. K. (1994). Spermidine potentiates dizocilpine-induced impairment of learning performance by rats in a 14-unit T-maze. *European Journal of Pharmacology*, *263*, 293–300.
- Shulz, D. E., Sosnik, R., Ego, V., Haidarfiu, S., & Ahissar, E. (2000). A neuronal analogue of state-dependent learning. *Nature*, *403*, 549–553.
- Sotres-Bayon, F., Bush, D. E., & LeDoux, J. E. (2007). Acquisition of fear extinction requires activation of NR2B-containing NMDA receptors in the lateral amygdala. *Neuropsychopharmacology*, *32*, 1929–1940.
- Sotres-Bayon, F., Diaz-Mataix, L., Bush, D. E., & LeDoux, J. E. (2009). Dissociable roles for the ventromedial prefrontal cortex and amygdala in fear extinction: NR2B contribution. *Cerebral Cortex*, *19*, 474–482.
- Sprosen, T. S., & Woodruff, G. N. (1990). Polyamines potentiate NMDA induced whole-cell currents in cultured striatal neurons. *European Journal of Pharmacology*, *179*, 477–478.
- Suzuki, A., Josselyn, S. A., Frankland, P. W., Masushige, S., Silva, A. J., & Kida, S. (2004). Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *Journal of Neuroscience*, *24*, 4787–4795.
- Szapiro, G., Vianna, M. R., McGaugh, J. L., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (2003). The role of NMDA glutamate receptors, PKA, MAPK, and CAMKII in the hippocampus in extinction of conditioned fear. *Hippocampus*, *13*, 53–58.
- Tronson, N. C., & Taylor, J. R. (2007). Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nature Reviews Neuroscience*, *8*, 262–275.
- Wang, S. H., de Oliveira Alvares, L., & Nader, K. (2009). Cellular and systems mechanisms of memory strength as a constraint on auditory fear reconsolidation. *Nature Neuroscience*, *12*, 905–912.
- Weber, M., Hart, J., & Richardson, R. (2007). Effects of D-cycloserine on extinction of learned fear to an olfactory cue. *Neurobiology of Learning and Memory*, *87*, 476–482.
- Williams, K. (1997). Interactions of polyamines with ion channels. *Biochemical Journal*, *325*(Pt 2), 289–297.
- Williams, K., Dawson, V. L., Romano, C., Dichter, M. A., & Molinoff, P. B. (1990). Characterization of polyamines having agonist, antagonist, and inverse agonist effects at the polyamine recognition site of the NMDA receptor. *Neuron*, *5*, 199–208.
- Williams, K., Romano, C., Dichter, M. A., & Molinoff, P. B. (1991). Modulation of the NMDA receptor by polyamines. *Life Science*, *48*, 469–498.
- Yamada, D., Zushida, K., Wada, K., & Sekiguchi, M. (2009). Pharmacological discrimination of extinction and reconsolidation of contextual fear memory by a potentiator of AMPA receptors. *Neuropsychopharmacology*, *34*, 2574–2584.

CONCLUSÕES

Com os resultados do presente estudo podemos concluir que:

- 1- A espermidina melhorou a reconsolidação da memória de medo condicionado contextual em ratos de maneira bifásica, facilitando a reconsolidação nas doses de 3 mg/kg e 10 mg/kg e não tendo efeito nas doses de 1 mg/kg e 30 mg/kg.
- 2- A arcaína prejudicou a reconsolidação da memória de medo condicionado contextual em ratos de maneira dose-dependente, prejudicando a reconsolidação nas doses de 1 mg/kg e 10 mg/kg e não tendo efeito na dose de 0,1 mg/kg.
- 3- O efeito da espermidina e da arcaína foi específico para a reconsolidação da memória, uma vez que estes compostos não apresentaram efeito na ausência da reativação ou quando foram administrados 6 horas após a reativação da memória.
- 4- O efeito da espermidina e da arcaína na reconsolidação da memória envolveu o sítio de ligação das poliaminas do receptor NMDA, uma vez que a arcaína, em uma dose sem efeito *per se*, preveniu a melhora da reconsolidação da memória induzida pela espermidina e a espermidina, sem efeito *per se*, preveniu o prejuízo da reconsolidação da memória induzido pela arcaína.
- 5- O efeito amnésico da arcaína na reconsolidação da memória não é causado por dependência de estado, uma vez que este efeito não foi revertido pela administração da mesma dose de arcaína antes do teste.

Conclusão geral

As poliaminas modulam a reconsolidação da memória de medo em ratos.

REFERÊNCIAS

- ACHTERBERG, E. J., TREZZA, V., & VANDERSCHUREN, L. J. beta-Adrenoreceptor stimulation mediates reconsolidation of social reward-related memories. **PLoS One**, 7, e39639, 2012.
- AIZENMAN, C. D., MUNOZ-ELIAS, G., & CLINE, H. T. Visually driven modulation of glutamatergic synaptic transmission is mediated by the regulation of intracellular polyamines. **Neuron**, 34, 623-634, 2002.
- ALBERINI, C. M. Mechanisms of memory stabilization: are consolidation and reconsolidation similar or distinct processes? **Trends Neurosci**, 28, 51-56, 2005.
- BADDELY, A. D., & NAVARRO, G. E. Memoria humana: teoría y práctica: McGraw-Hill Interamericana de España S.L., 1999.
- BEN MAMOU, C., GAMACHE, K., & NADER, K. NMDA receptors are critical for unleashing consolidated auditory fear memories. **Nat Neurosci**, 9, 1237-1239, 2006.
- BERLESE, D. B., SAUZEM, P. D., CARATI, M. C., GUERRA, G. P., STIEGEMEIER, J. A., MELLO, C. F., & RUBIN, M. A. Time-dependent modulation of inhibitory avoidance memory by spermidine in rats. **Neurobiol Learn Mem**, 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.
- BUSTOS, S. G., GIACHERO, M., MALDONADO, H., & MOLINA, V. A. Previous stress attenuates the susceptibility to Midazolam's disruptive effect on fear memory reconsolidation: influence of pre-reactivation D-cycloserine administration. **Neuropsychopharmacology**, 35, 1097-1108, 2010.
- CAMERA, K., MELLO, C. F., CERETTA, A. P., & RUBIN, M. A. Systemic administration of polyaminergic agents modulate fear conditioning in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, 192, 457-464, 2007.
- CARTER, C. Neuropharmacology of polyamines: Academic Press, 1994.
- CELANO, P., BAYLIN, S. B., & CASERO, R. A., JR. Polyamines differentially modulate the transcription of growth-associated genes in human colon carcinoma cells. **J Biol Chem**, 264, 8922-8927, 1989.
- CERETTA, A. P., CAMERA, K., MELLO, C. F., & RUBIN, M. A. Arcaine and MK-801 make recall state-dependent in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, 201, 405-411, 2008.
- CHARLIER, Y., & TIRELLI, E. Differential effects of histamine H(3) receptor inverse agonist thioperamide, given alone or in combination with the N-methyl-d-

aspartate receptor antagonist dizocilpine, on reconsolidation and consolidation of a contextual fear memory in mice. **Neuroscience**, 193, 132-142, 2011.

- CIABARRA, A. M., SULLIVAN, J. M., GAHN, L. G., PECHT, G., HEINEMANN, S., & SEVARINO, K. A. Cloning and characterization of chi-1: a developmentally regulated member of a novel class of the ionotropic glutamate receptor family. **J Neurosci**, 15, 6498-6508, 1995.
- CONWAY, E. L. Brain lesions and delayed water maze learning deficits after intracerebroventricular spermine. **Brain Res**, 800, 10-20, 1998.
- 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.
- CULL-CANDY, S. G., & LESZKIEWICZ, D. N. Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. **Sci STKE**, 2004, re16, 2004.
- DEBIEC, J., & LEDOUX, J. E. Disruption of reconsolidation but not consolidation of auditory fear conditioning by noradrenergic blockade in the amygdala. **Neuroscience**, 129, 267-272, 2004.
- DEBIEC, J., LEDOUX, J. E., & NADER, K. Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. **Neuron**, 36, 527-538, 2002.
- DUDAI, Y. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? **Annu Rev Psychol**, 55, 51-86, 2004.
- DUVARCI, S., MAMOU, C. B., & NADER, K. Extinction is not a sufficient condition to prevent fear memories from undergoing reconsolidation in the basolateral amygdala. **Eur J Neurosci**, 24, 249-260, 2006.
- ELGERSMA, Y., & SILVA, A. J. Molecular mechanisms of synaptic plasticity and memory. **Curr Opin Neurobiol**, 9, 209-213, 1999.
- FLINT, R. W., JR., NOBLE, L. J., & ULMEN, A. R. NMDA receptor antagonism with MK-801 impairs consolidation and reconsolidation of passive avoidance conditioning in adolescent rats: evidence for a state dependent reconsolidation effect. **Neurobiol Learn Mem**, 101, 114-119, 2013.
- GAMACHE, K., PITMAN, R. K., & NADER, K. Preclinical evaluation of reconsolidation blockade by clonidine as a potential novel treatment for posttraumatic stress disorder. **Neuropsychopharmacology**, 37, 2789-2796, 2012.
- GOMES, G. M., MELLO, C. F., DA ROSA, M. M., BOCHI, G. V., FERREIRA, J., BARRON, S., & RUBIN, M. A. Polyaminergic agents modulate contextual fear extinction in rats. **Neurobiol Learn Mem**, 93, 589-595, 2010.

- GROSS, C., & HEN, R. The developmental origins of anxiety. **Nat Rev Neurosci**, 5, 545-552, 2004.
- GUERRA, G. P., MELLO, C. F., BOCHI, G. V., PAZINI, A. M., FACHINETTO, R., DUTRA, R. C., CALIXTO, J. B., FERREIRA, J., & RUBIN, M. A. Hippocampal PKA/CREB pathway is involved in the improvement of memory induced by spermidine in rats. **Neurobiol Learn Mem**, 96, 324-332, 2011.
- GUERRA, G. P., MELLO, C. F., BOCHI, G. V., PAZINI, A. M., ROSA, M. M., FERREIRA, J., & RUBIN, M. A. Spermidine-induced improvement of memory involves a cross-talk between protein kinases C and A. **J Neurochem**, 122, 363-373, 2012.
- GUERRA, G. P., MELLO, C. F., SAUZEM, P. D., BERLESE, D. B., FURIAN, A. F., TABARELLI, Z., & RUBIN, M. A. Nitric oxide is involved in the memory facilitation induced by spermidine in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, 186, 150-158, 2006.
- IGARASHI, K., & KASHIWAGI, K. Modulation of cellular function by polyamines. **Int J Biochem Cell Biol**, 42, 39-51, 2010.
- IZQUIERDO, I. *Memória: Iván Izquierdo*: Artmed Editora, 2002.
- IZQUIERDO, I. *Memória*: Artmed Editora, 2011.
- IZQUIERDO, I., IZQUIERDO, L. A., BARROS, D. M., MELLO E SOUZA, T., DE SOUZA, M. M., QUEVEDO, J., RODRIGUES, C., SANT'ANNA, M. K., MADRUGA, M., & MEDINA, J. H. Differential involvement of cortical receptor mechanisms in working, short-term and long-term memory. **Behav Pharmacol**, 9, 421-427, 1998.
- 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, 1997.
- JOHNSON, T. D. Modulation of channel function by polyamines. **Trends Pharmacol Sci**, 17, 22-27, 1996.
- KELLY, A., LAROCHE, S., & DAVIS, S. Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in hippocampal circuitry is required for consolidation and reconsolidation of recognition memory. **J Neurosci**, 23, 5354-5360, 2003.
- KIDA, S., JOSSELYN, S. A., PENA DE ORTIZ, S., KOGAN, J. H., CHEVERE, I., MASUSHIGE, S., & SILVA, A. J. CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. **Nat Neurosci**, 5, 348-355, 2002.
- 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., OHNO, M., & WATANABE, S. Spermidine, a polyamine site agonist, attenuates working memory deficits caused by blockade of hippocampal muscarinic receptors and mGluRs in rats. **Brain Res**, 793, 311-314, 1998.

- LEE, J. L., EVERITT, B. J., & THOMAS, K. L. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. **Science**, 304, 839-843, 2004.
- LEE, J. L., & HYND, R. E. Divergent cellular pathways of hippocampal memory consolidation and reconsolidation. **Hippocampus**, 23, 233-244, 2013.
- LEE, J. L., MILTON, A. L., & EVERITT, B. J. Reconsolidation and extinction of conditioned fear: inhibition and potentiation. **J Neurosci**, 26, 10051-10056, 2006.
- LEE, Y. S., & SILVA, A. J. The molecular and cellular biology of enhanced cognition. **Nat Rev Neurosci**, 10, 126-140, 2009.
- LYNCH, D. R., LAWRENCE, J. J., LENZ, S., ANEGAWA, N. J., DICHTER, M., & PRITCHETT, D. B. Pharmacological characterization of heterodimeric NMDA receptors composed of NR 1a and 2B subunits: differences with receptors formed from NR 1a and 2A. **J Neurochem**, 64, 1462-1468, 1995.
- MAREN, S. Synaptic mechanisms of associative memory in the amygdala. **Neuron**, 47, 783-786, 2005.
- MARIANI, R. K., MELLO, C. F., ROSA, M. M., CERETTA, A. P., CAMERA, K., & RUBIN, M. A. Effect of naloxone and morphine on arcaine-induced state-dependent memory in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, 215, 483-491, 2011.
- MCGAUGH, J. L. Time-dependent processes in memory storage. **Science**, 153, 1351-1358, 1966.
- MCGAUGH, J. L. Memory--a century of consolidation. **Science**, 287, 248-251, 2000.
- MEYER, R. C., KNOX, J., PURWIN, D. A., SPANGLER, E. L., & INGRAM, D. K. 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., OKULICZ-KOZARYN, I., KAMINSKA, E., SZULC, M., DYR, W., & KOSTOWSKI, W. Lack of ifenprodil anxiolytic activity after its multiple treatment in chronically ethanol-treated rats. **Alcohol Alcohol**, 38, 310-315, 2003.
- MILEKIC, M. H., & ALBERINI, C. M. Temporally graded requirement for protein synthesis following memory reactivation. **Neuron**, 36, 521-525, 2002.
- MILEKIC, M. H., POLLONINI, G., & ALBERINI, C. M. Temporal requirement of C/EBPbeta in the amygdala following reactivation but not acquisition of inhibitory avoidance. **Learn Mem**, 14, 504-511, 2007.
- MILTON, A. L., MERLO, E., RATANO, P., GREGORY, B. L., DUMBRECK, J. K., & EVERITT, B. J. Double dissociation of the requirement for GluN2B- and GluN2A-containing

- NMDA receptors in the destabilization and restabilization of a reconsolidating memory. **J Neurosci**, 33, 1109-1115, 2013.
- MILTON, A. L., SCHRAMM, M. J., WAWRZYNSKI, J. R., GORE, F., OIKONOMOU-MPEGETI, F., WANG, N. Q., SAMUEL, D., ECONOMIDOU, D., & EVERITT, B. J. Antagonism at NMDA receptors, but not beta-adrenergic receptors, disrupts the reconsolidation of pavlovian conditioned approach and instrumental transfer for ethanol-associated conditioned stimuli. **Psychopharmacology (Berl)**, 219, 751-761, 2012.
- MISANIN, J. R., MILLER, R. R., & LEWIS, D. J. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. **Science**, 160, 554-555, 1968.
- MOINARD, C., CYNOBER, L., & DE BANDT, J. P. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. **Clin Nutr**, 24, 184-197, 2005.
- MONY, L., KEW, J. N., GUNTHORPE, M. J., & PAOLETTI, P. Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors: molecular mechanisms and therapeutic potential. **Br J Pharmacol**, 157, 1301-1317, 2009.
- MORGAN, D. M. Polyamines. An overview. **Mol Biotechnol**, 11, 229-250, 1999.
- MORI, H., & MISHINA, M. Structure and function of the NMDA receptor channel. **Neuropharmacology**, 34, 1219-1237, 1995.
- MORRISON, L. D., & KISH, S. J. Brain polyamine levels are altered in Alzheimer's disease. **Neurosci Lett**, 197, 5-8, 1995.
- MOTT, D. D., WASHBURN, M. S., ZHANG, S., & DINGLEDINE, R. J. Subunit-dependent modulation of kainate receptors by extracellular protons and polyamines. **J Neurosci**, 23, 1179-1188, 2003.
- NADER, K., & HARDT, O. A single standard for memory: the case for reconsolidation. **Nat Rev Neurosci**, 10, 224-234, 2009.
- NADER, K., SCHAFE, G. E., & LE DOUX, J. E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. **Nature**, 406, 722-726, 2000.
- NISHI, M., HINDS, H., LU, H. P., KAWATA, M., & HAYASHI, Y. Motoneuron-specific expression of NR3B, a novel NMDA-type glutamate receptor subunit that works in a dominant-negative manner. **J Neurosci**, 21, RC185, 2001.
- NISHIGA, M., & KAMEI, C. Ameliorative effects of histamine on 7-chlorokynurenic acid-induced spatial memory deficits in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, 166, 360-365, 2003.
- OUAMEUR, A. A., & TAJMIR-RIAAHI, H. A. Structural analysis of DNA interactions with biogenic polyamines and cobalt(III)hexamine studied by Fourier transform infrared and capillary electrophoresis. **J Biol Chem**, 279, 42041-42054, 2004.

- OZAWA, S., KAMIYA, H., & TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Prog Neurobiol**, 54, 581-618, 1998.
- PAOLETTI, P., & NEYTON, J. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. **Curr Opin Pharmacol**, 7, 39-47, 2007.
- PEDREIRA, M. E., PEREZ-CUESTA, L. M., & MALDONADO, H. Reactivation and reconsolidation of long-term memory in the crab *Chasmagnathus*: protein synthesis requirement and mediation by NMDA-type glutamatergic receptors. **J Neurosci**, 22, 8305-8311, 2002.
- PEDREIRA, M. E., PEREZ-CUESTA, L. M., & MALDONADO, H. Mismatch between what is expected and what actually occurs triggers memory reconsolidation or extinction. **Learn Mem**, 11, 579-585, 2004.
- PEGG, A. E. Mammalian polyamine metabolism and function. **IUBMB Life**, 61, 880-894, 2009.
- PORTERO-TRESSERRA, M., MARTI-NICOLOVIUS, M., GUILLAZO-BLANCH, G., BOADAS-VAELLO, P., & VALE-MARTINEZ, A. d-cycloserine in the basolateral amygdala prevents extinction and enhances reconsolidation of odor-reward associative learning in rats. **Neurobiol Learn Mem**, 100C, 1-11, 2012.
- PRZYBYSLAWSKI, J., ROULLET, P., & SARA, S. J. Attenuation of emotional and nonemotional memories after their reactivation: role of beta adrenergic receptors. **J Neurosci**, 19, 6623-6628, 1999.
- PRZYBYSLAWSKI, J., & SARA, S. J. Reconsolidation of memory after its reactivation. **Behav Brain Res**, 84, 241-246, 1997.
- QUEVEDO, J., VIANNA, M. R., ROESLER, R., DE-PARIS, F., IZQUIERDO, I., & ROSE, S. P. Two time windows of anisomycin-induced amnesia for inhibitory avoidance training in rats: protection from amnesia by pretraining but not pre-exposure to the task apparatus. **Learn Mem**, 6, 600-607, 1999.
- QUIRK, G. J., & MUELLER, D. Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. **Neuropsychopharmacology**, 33, 56-72, 2008.
- 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.
- REYNOLDS, I. J. Arcaine is a competitive antagonist of the polyamine site on the NMDA receptor. **Eur J Pharmacol**, 177, 215-216, 1990.
- RIEDEL, G., PLATT, B., & MICHEAU, J. 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.
- RODRIGUEZ, M. L., CAMPOS, J., FORCATO, C., LEIGUARDA, R., MALDONADO, H., MOLINA, V. A., & PEDREIRA, M. E. Enhancing a declarative memory in humans: the effect of clonazepam on reconsolidation. **Neuropharmacology**, 64, 432-442, 2013.
- RUBIN, M. A., BERLESE, D. B., STIEGEMEIER, J. A., VOLKWEIS, M. A., OLIVEIRA, D. M., DOS SANTOS, T. L., FENILI, A. C., & MELLO, C. F. Intra-amygdala administration of polyamines modulates fear conditioning in rats. **J Neurosci**, 24, 2328-2334, 2004.
- RUBIN, M. A., BOEMO, R. L., JURACH, A., ROJAS, D. B., ZANOLLA, G. R., OBREGON, A. D., SOUZA, D. O., & MELLO, C. F. Intrahippocampal spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. **Behav Pharmacol**, 11, 57-61, 2000.
- RUBIN, M. A., STIEGEMEIER, J. A., VOLKWEIS, M. A., OLIVEIRA, D. M., FENILI, A. C., BOEMO, R. L., JURACH, A., & MELLO, C. F. Intra-amygdala spermidine administration improves inhibitory avoidance performance in rats. **Eur J Pharmacol**, 423, 35-39, 2001.
- SACAAN, A. I., & JOHNSON, K. M. Characterization of the stimulatory and inhibitory effects of polyamines on [3H]N-(1-[thienyl]cyclohexyl) piperidine binding to the N-methyl-D-aspartate receptor ionophore complex. **Mol Pharmacol**, 37, 572-577, 1990.
- SARA, S. J. Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. **Learn Mem**, 7, 73-84, 2000.
- SCATTON, B. The NMDA receptor complex. **Fundam Clin Pharmacol**, 7, 389-400, 1993.
- SHELL, M. J., BRADY, R. O., JR., MOLLIVER, M. E., & SNYDER, S. H. D-serine as a neuromodulator: regional and developmental localizations in rat brain glia resemble NMDA receptors. **J Neurosci**, 17, 1604-1615, 1997.
- SCHULER, T., MESIC, I., MADRY, C., BARTHOLOMAUS, I., & LAUBE, B. Formation of NR1/NR2 and NR1/NR3 heterodimers constitutes the initial step in N-methyl-D-aspartate receptor assembly. **J Biol Chem**, 283, 37-46, 2008.
- SEILER, N. Polyamine metabolism and function in brain. **Neurochem Int**, 3, 95-110, 1981.
- SEILER, N. Functions of polyamine acetylation. **Can J Physiol Pharmacol**, 65, 2024-2035, 1987.
- SEILER, N. Catabolism of polyamines. **Amino Acids**, 26, 217-233, 2004.

- SEILER, N., DELCROS, J. G., & MOULINOX, J. P. Polyamine transport in mammalian cells. An update. **Int J Biochem Cell Biol**, 28, 843-861, 1996.
- SEILER, N., & KNODGEN, B. N-(3-aminopropyl)pyrrolidin-2-one: a physiological excretory product deriving from spermidine. **Int J Biochem**, 15, 907-915, 1983.
- SHIMADA, A., SPANGLER, E. L., LONDON, E. D., & INGRAM, D. K. Spermidine potentiates dizocilpine-induced impairment of learning performance by rats in a 14-unit T-maze. **Eur J Pharmacol**, 263, 293-300, 1994.
- SQUIRE, L. R., KNOWLTON, B., & MUSEN, G. The structure and organization of memory. **Annu Rev Psychol**, 44, 453-495, 1993.
- STICKGOLD, R. Sleep-dependent memory consolidation. **Nature**, 437, 1272-1278, 2005.
- SUZUKI, A., JOSSELYN, S. A., FRANKLAND, P. W., MASUSHIGE, S., SILVA, A. J., & KIDA, S. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. **J Neurosci**, 24, 4787-4795, 2004.
- TABOR, C. W., & TABOR, H. Polyamines. **Annu Rev Biochem**, 53, 749-790, 1984.
- TADANO, T., HOZUMI, S., YAMADERA, F., MURATA, A., NIIJIMA, F., TAN-NO, K., NAKAGAWASAI, O., & KISARA, K. Effects of NMDA receptor-related agonists on learning and memory impairment in olfactory bulbectomized mice. **Methods Find Exp Clin Pharmacol**, 26, 93-97, 2004.
- TAUBENFELD, S. M., MILEKIC, M. H., MONTI, B., & ALBERINI, C. M. The consolidation of new but not reactivated memory requires hippocampal C/EBPbeta. **Nat Neurosci**, 4, 813-818, 2001.
- TETI, D., VISALLI, M., & MCNAIR, H. 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.
- TORRAS-GARCIA, M., LELONG, J., TRONEL, S., & SARA, S. J. Reconsolidation after remembering an odor-reward association requires NMDA receptors. **Learn Mem**, 12, 18-22, 2005.
- TRONEL, S., & ALBERINI, C. M. Persistent disruption of a traumatic memory by postretrieval inactivation of glucocorticoid receptors in the amygdala. **Biol Psychiatry**, 62, 33-39, 2007.
- TRONSON, N. C., & TAYLOR, J. R. Molecular mechanisms of memory reconsolidation. **Nat Rev Neurosci**, 8, 262-275, 2007.

- URDIALES, J. L., MEDINA, M. A., & SANCHEZ-JIMENEZ, F. Polyamine metabolism revisited. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, 13, 1015-1019, 2001.
- VELLOSO, N. A., DALMOLIN, G. D., GOMES, G. M., RUBIN, M. A., CANAS, P. M., CUNHA, R. A., & MELLO, C. F. Spermine improves recognition memory deficit in a rodent model of Huntington's disease. **Neurobiol Learn Mem**, 92, 574-580, 2009.
- WANG, S. H., DE OLIVEIRA ALVARES, L., & NADER, K. Cellular and systems mechanisms of memory strength as a constraint on auditory fear reconsolidation. **Nat Neurosci**, 12, 905-912, 2009.
- WILLIAMS, K. Interactions of polyamines with ion channels. **Biochem J**, 325 (Pt 2), 289-297, 1997.
- WILLIAMS, K., ROMANO, C., DICHTER, M. A., & MOLINOFF, P. B. Modulation of the NMDA receptor by polyamines. **Life Sci**, 48, 469-498, 1991.